



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPLEMENTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MÉTODO
DE BURBUJEO PARA PRODUCCIÓN DE NIOSOMAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

JOSÉ ANTONIO RAMÍREZ RODRÍGUEZ

TUTOR

M. EN C. ALMA MIRIAM NOVELO TORRES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Alma Miriam Novelo Torres
Vocal: María Guadalupe Lemus Barajas
Secretario: Jorge Esteban Miranda Calderón
1er Suplente: Carlos Juárez Osornio
2do Suplente: José Luis López Cervantes

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Superfices , Laboratorio 331, Edificio F, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

M. en C. Alma Miriam Novelo Torres
ASESOR

Dr. José Luis López Cervantes
SUPERVISOR TÉCNICO

José Antonio Ramírez Rodríguez
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

A mis papás por la confianza que siempre me han tenido, por el cariño y por todos los consejos, pláticas y enseñanzas que me han ayudado a desarrollarme como persona.

A mis abuelitos por el cariño y educación que me brindaron.

A la Maestra en Ciencias Alma Miriam Novelo Torres y al Doctor José Luis López Cervantes por el apoyo, asesorías y paciencia durante el desarrollo del proyecto.

A los compañeros y profesores del Laboratorio de Superficies en el Edificio F de la Facultad de Química por el apoyo, ayudas y experiencias.

Al Dr. Jesús Gracia Fadrique responsable del Laboratorio de Superficies por los equipos e instalaciones proporcionados para el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Rafael Iván Puente Lee de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) en el edificio Mario Molina por la obtención de microscopías.

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM <<IN-113918>>, DGAPA, UNAM. Se agradece el apoyo para presentar el trabajo en el 38 Congreso Nacional de Educación Química, SQM, en la BUAP, Puebla.

Índice general

Resumen	6
Objetivos	7
General	7
Particulares	7
Hipótesis	7
1. Antecedentes	8
1.1. Interfase	8
1.1.1. Tensión Superficial	9
1.2. Tensoactivos	9
1.2.1. Clasificación de Tensoactivos	12
1.2.2. Tensoactivos no iónicos	13
1.3. Agregados Moleculares	14
1.3.1. Micelas	14
1.3.2. Sistemas Vesiculares	17
1.4. Niosomas	19
1.4.1. Termodinámica de formación de niosomas	19
1.4.2. Factores que afectan la formación de Niosomas	20
1.4.3. Teorías involucradas	21
1.4.4. Estabilidad	24
1.4.5. Métodos de preparación	25
1.4.6. Importancia en la Industria Farmacéutica	27
1.5. Método de Burbujeo	28
1.5.1. Fundamento	29
2. Desarrollo experimental	30
2.1. Reactivos	30
2.1.1. Tensoactivos	30
2.1.2. Colesterol	33
2.1.3. Gases	34
2.1.4. Medios de disolución	35
2.2. Técnicas Exp	36
2.2.1. DLS	36
2.2.2. Microscopía	37
2.2.3. Anillo de Du Noüy	37
2.2.4. Densidad	39

2.3. Equipos	39
2.4. Metodologías	40
2.4.1. Formación de niosomas	40
2.4.2. Tensión Superficial	41
2.4.3. Mediciones de Densidad	41
2.4.4. Tamaño de partícula	42
2.4.5. Determinación de morfología por SEM	42
3. Resultados	43
3.1. Condiciones de Operación	43
3.1.1. Método de agitado	43
3.1.2. Tiempo de agitado	44
3.1.3. Tiempo de burbujeo	44
3.1.4. Flujo de nitrógeno	46
3.1.5. Gas	47
3.1.6. Medio de disolución	48
3.2. Efecto de las op unitarias	50
3.3. Presencia de colesterol	51
3.4. Estabilidad física	52
3.5. Estructura del tensoactivo	54
3.5.1. Longitud de cadena hidrofóbica	54
3.5.2. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas	55
3.5.3. Efecto de saturación de cadena hidrofóbica	56
3.5.4. Efecto de la cabeza hidrofílica	57
3.6. Microscopías	58
3.7. Tensión Superficial	61
3.7.1. Span 20	62
3.7.2. Span 20 + Colesterol	66
3.7.3. Span 60	68
3.7.4. Span 60 + Colesterol	70
3.7.5. Span 65	72
3.7.6. Relación entre parámetros sup y tamaño de niosomas.	74
4. Conclusiones	79
Índice de Figuras	82
Índice de Tablas	83
Referencias	89

RESUMEN

En el presente estudio se evaluaron y establecieron las condiciones óptimas de operación del método de burbujeo para la formación de agregados (niosomas) constituidos por tensoactivos no iónicos. Los productos vesiculares obtenidos fueron caracterizados midiendo el tamaño de partícula con la técnica DLS (Dispersión Dinámica de la Luz). Se determinó el efecto de la estructura química de los tensoactivos en el tamaño de los agregados formados, efectuando comparaciones entre tensoactivos, provenientes de la familia de los ésteres de sorbitán, seleccionados para este estudio. También se analizó el efecto de la presencia de colesterol en el tamaño de partícula de los agregados. Para confirmar la formación de niosomas se realizaron estudios de microscopía electrónica de barrido donde se observó su morfología.

Adicionalmente, se efectuó la caracterización de las propiedades superficiales de los tensoactivos en estudio (en algunos casos con colesterol), en solución acuosa, para determinar el área superficial ocupada por éstos en la interfase líquido/gas. Este tratamiento, permitió fundamentar la formación y tamaño de estos agregados.

OBJETIVOS

General

Estudiar y adecuar un método innovador para la formación de niosomas.

Particulares

- Determinar las condiciones óptimas en el método, para la producción de niosomas.
- Determinar el efecto de la estructura del tensoactivo en el tamaño de partícula del niosoma, mediante la técnica DLS.
- Determinar el efecto de colesterol en la formación y tamaño de partícula de los niosomas, mediante la técnica DLS.
- Determinar la estructura de los niosomas formados, mediante microscopía electrónica.
- Establecer la relación cuantitativa entre la estructura del tensoactivo y el tamaño del agregado formado, por medio de mediciones de tensión superficial.

HIPÓTESIS

El tamaño de los niosomas formados por este método depende de la estructura de los tensoactivos y de los aditivos usados en su elaboración.

Antecedentes

1.1. Interfase

La interfase se define como la región que delimita dos fases homogéneas no miscibles, si una de estas dos fases es un gas o vapor entonces se le conoce comúnmente como superficie. Las interfases existentes son las siguientes^{1,2} :

- Sólido – Gas/Vapor (Superficie)
- Sólido – Líquido
- Sólido – Sólido
- Líquido – Gas/Vapor (Superficie)
- Líquido – Líquido

En la Figura 1.1 se muestra un ejemplo común de fases homogéneas (α y β) no miscibles entre si y se observa la interfase (ψ) representada como una capa entre ellas.



Figura 1.1. Ejemplo común de interfase. Imagen modificada de López³ .

1.1.1. Tensión Superficial

Una propiedad de la superficie líquida es la tensión superficial (en el caso de la interfase se conoce como tensión interfacial), para explicar esta propiedad el ejemplo más común es en donde las fases homogéneas son líquido y gas/vapor.

En la Figura 1.2 se representa la atracción entre las moléculas del líquido. Las moléculas que se encuentran en la superficie tienen fuerzas de atracción hacia los laterales y por debajo, pero no sobre la parte superior, lo que resulta en una mayor fuerza de intramolecular ejercida sobre las moléculas en la superficie desde moléculas en el seno de la solución, esto hace que la superficie tenga una tendencia a contraerse, la contracción representa un estado mínimo de energía libre, la fuerza de contracción por el trabajo requerido para aumentar el área de la superficie en 1m^2 se conoce como tensión superficial $(\frac{mN}{m})^4$.

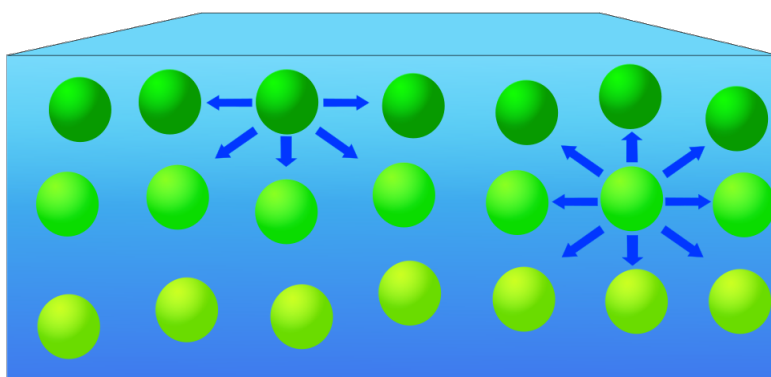


Figura 1.2. Representación esquemática de tensión superficial.

1.2. Tensoactivos

Los tensoactivos son moléculas anfífilas, es decir tienen una porción hidrófila (con afinidad por el agua), también llamado cabeza hidrófila y una lipófila (sin afinidad por el agua), conocido como cola hidrófoba (Figura 1.3)⁵⁻⁷. Son capaces de modificar la tensión superficial y además, pueden formar agregados espontáneamente, cuando se alcanza la concentración micelar crítica.



Figura 1.3. Representación esquemática de un tensoactivo.

Estas moléculas migran y se adsorben en la superficie (Figura 1.4). Dado que las fuerzas de atracción entre tensoactivo y molécula de líquido, son más débiles que entre dos moléculas de líquido la fuerza de contracción disminuye y, en consecuencia, también el valor de la tensión superficial⁴.

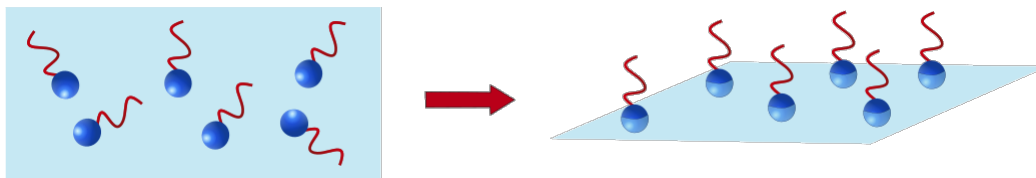


Figura 1.4. Las moléculas de tensoactivo se acomodan en la superficie dependiendo de la afinidad de su cola y cabeza con el solvente. Imagen modificada de Sandoval⁶.

Entre mayor cantidad de tensoactivo se adsorba en la superficie líquida, mayor será la disminución de tensión superficial, sin embargo la superficie es finita, por lo que eventualmente se llega a cierto límite de ocupación, conocido como concentración superficial de saturación, esto se puede observar en gráficas de presión superficial vs concentración de tensoactivo (Figura 1.9).

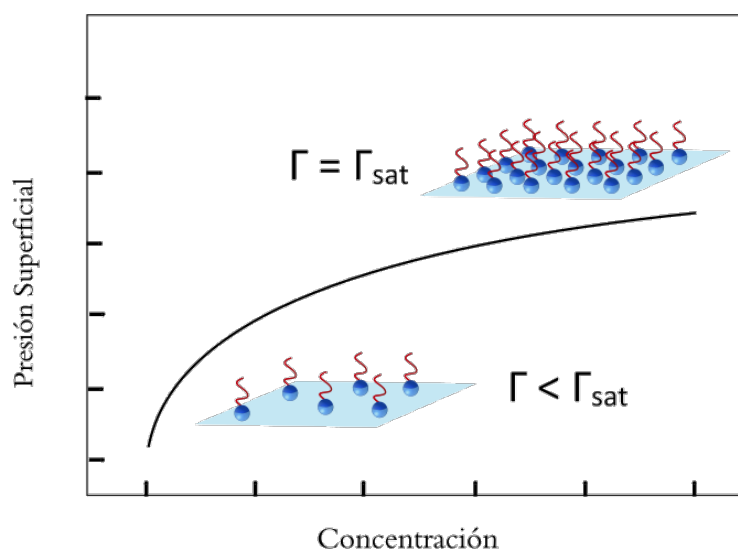


Figura 1.5. Ejemplo de gráfica Presión Superficial vs Concentración.

Para comprender el comportamiento del tensoactivo en la superficie se requieren ciertos modelos que determinan parámetros con los que se describe la adsorción, entre ellos se encuentra el Modelo de Adsorción de Gibbs y el Modelo de Adsorción de Langmuir. El Modelo de Adsorción de Gibbs es empleado en interfases líquido-vapor, se expresa de la siguiente manera

$$\Gamma = \frac{x}{RT} \left(\frac{d\pi}{dx} \right) \quad (1.1)$$

dónde Γ se refiere a la concentración de tensoactivo en la superficie, x la concentración del tensoactivo en disolución, R la constante de los gases, T la temperatura absoluta y π la presión superficial de la solución, que se expresa como la diferencia entre la tensión superficial del líquido puro y el de la disolución.

Este modelo indica que la concentración en la superficie del tensoactivo depende de la concentración de la disolución y de la variación de la presión superficial respecto a la composición de la disolución. A partir del tratamiento lineal de este modelo se puede determinar la CMC de los tensoactivos y su $\Gamma_{máx}$ ⁸.

El Modelo de Adsorción de Langmuir es usado cuando el proceso de adsorción se produce sobre un sólido. Langmuir estableció tres postulados que ayudan a la descripción del fenómeno:

- Formación de una monocapa de moléculas adsorbidas.
- Todos los sitios de la superficie tienen la misma probabilidad de ser ocupados.
- No hay interacción entre moléculas adsorbidas.

Como se explica en la literatura⁶, del acoplamiento de la isoterma de adsorción de Gibbs y Langmuir se obtienen algunos parámetros superficiales.

Para este estudio en particular, el interés radicó en determinar el Área mínima que ocupa el tensoactivo en la superficie (A_{min}), que se calcula con el inverso de la concentración superficial de saturación (Γ_s),

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma_s} \quad (1.2)$$

la energía estándar de adsorción (ΔG_{ads}^0), que es la medida de la tendencia de un anfífilo para situarse en la interfase, es decir la energía necesaria para que un soluto se transporte del seno de una solución hacia la interfase, esta se calcula cuando sólo se presentan interacciones del soluto con el disolvente, cuando la concentración del soluto tiende a cero ($x \rightarrow 0$) (cuando la disolución está muy diluida) y la energía de micelización (ΔG_{mic}), la cual es la energía necesaria para llevar una molécula de tensoactivo desde la solución hasta la superficie de la micela cuando se satura la superficie.

1.2.1. Clasificación de Tensoactivos

Los tensoactivos se pueden clasificar dependiendo de su comportamiento en solución (Figura 1.6)^{9,10}.

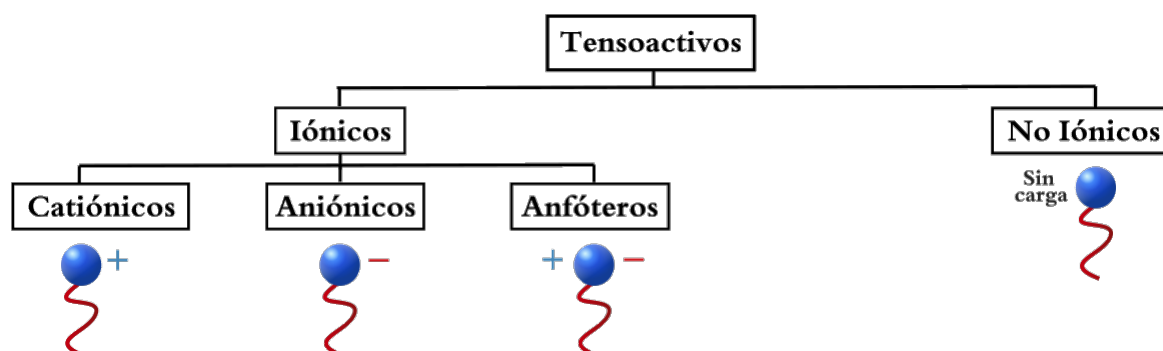


Figura 1.6. Clasificación de tensoactivos.

- Los tensoactivos iónicos son aquellos que se disocian en solución acuosa y se pueden subclassificar en:
 - **Tensoactivos catiónicos** (*donde el grupo hidrófilo libera un anión en solución acuosa*). Lo más comunes tienen la carga en un átomo de nitrógeno; por ejemplo compuestos amina o grupo amonio cuaternario, son usados en soluciones acuosas para limpieza debido a su actividad bactericida contra bacterias Gram positiva y algunas Gram negativa.
 - **Tensoactivos aniónicos** (*donde el grupo hidrófilo libera un catión en solución acuosa*). Los más comunes tienen grupos polares de carboxilato, sulfato, sulfonato y fosfato en combinación con sodio y potasio (solubilidad en agua) o calcio y magnesio (solubilidad en aceite), son usados en los procesos químicos de EOR (recuperación mejorada de petróleo).
 - **Tensoactivos anfóteros** (*donde el grupo hidrófilo activa la carga del anión o del catión o ambas dependiendo del pH de la solución*). La carga positiva frecuentemente se encuentra en un grupo amonio y la carga negativa es comúnmente un carboxilato en la estructura del tensoactivo; son parte de la formulación de champús y productos para la piel, presentan propiedades antimicrobianas.
- Los tensoactivos no iónicos presentan un gradiente de solubilidad de acuerdo al grado de etoxilación, hidrogenación o hidroxilación de la molécula (porción hidrofílica).

1.2.2. Tensoactivos no iónicos

Tensoactivos con un grupo hidrófilo sin carga eléctrica, su color depende del proceso de producción, cambia entre transparente a diferentes tonalidades de amarillo. En comparación con los tensoactivos iónicos su solubilidad es menor, el valor de CMC generalmente es más alto, esto representa una ventaja en algunos casos, pues permite que se agregue una mayor cantidad de tensoactivo sin que se formen micelas^{11,12}.

Algunos tipos de tensoactivos no iónicos son:

- **Etoxilados.** Se obtienen generalmente por la adición de óxido de etileno en alcoholes, aminas y fenoles, actúan como emulsificantes, solubilizantes y agentes humectantes.
- **Etoxilados bloqueados.** Se obtienen al sustituir el átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo terminal de un etoxilato por residuos hidrófobos, dando mayor resistencia en medios alcalinos, se usan en procesos de limpieza que implican una acción mecánica fuerte.
- **Ésteres de ácidos grasos de compuestos polihidroxiados.** Un ejemplo de estos son los ésteres de sorbitan, también conocidos como Span.

1.3. Agregados Moleculares

El proceso de agregación es el resultado de la unión de varias moléculas, mediante enlaces físicos, para formar una partícula de mayor peso molecular. Existen numerosos tipos de agregados moleculares, desde nivel microscópico a macroscópico; en este y los siguientes capítulos, se describirán algunos agregados usados con mayor frecuencia en la industria farmacéutica.

1.3.1. Micelas

Agregados solubles en agua, cuya formación es espontánea y reversible, constituidos por moléculas anfifílicas, el término fue innovado por James William McBain en 1913¹³. Cuando las moléculas anfipáticas se disponen en agua bajo ciertas condiciones, la parte hidrófila entra en contacto con el medio de dispersión por afinidad, mientras que la parte hidrófoba se reúne formando un núcleo.

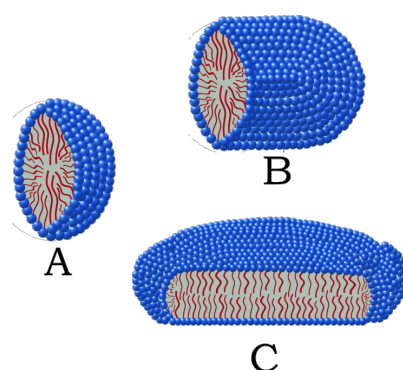


Figura 1.7. Tipos de micelas. Las micelas pueden ser esféricas (A), cilíndricas (B) o tener forma de disco (C). Imagen modificada de Hashidzume¹⁴.

Estos agregados se forman a partir de una determinada concentración de monómeros (anfifilo), esta concentración se conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC), antes de alcanzar esta concentración, los monómeros se mantendrán en un equilibrio de adsorción-desorción, regresando al medio como una especie libre. Cuando se supera el valor de CMC, los monómeros habrán saturado la superficie líquida (interfase gas/líquido) de tal forma que ya no ocurre la adsorción de los monómeros libres e inicia el ensamble de micelas¹⁵ (Figura 1.8).

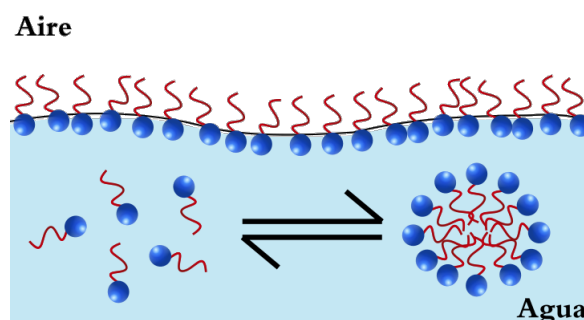


Figura 1.8. Equilibrio Dinámico entre micelas y monómeros.

A la concentración micelar crítica, algunas propiedades del sistema se modifican en forma evidente, como la tensión superficial e intensidad de luz dispersada, entre otras. Debido a ese efecto, el valor de CMC se determina experimentalmente, para lo cual se efectúa la medición de alguna de éstas propiedades en función de la concentración, a temperatura constante. Trazando el gráfico: Propiedad (presión superficial, detergencia, presión osmótica, etc) en función de la Concentración del anfífilo, se observa un cambio notorio de comportamiento, donde se revela el valor de CMC(Figura 1.9).

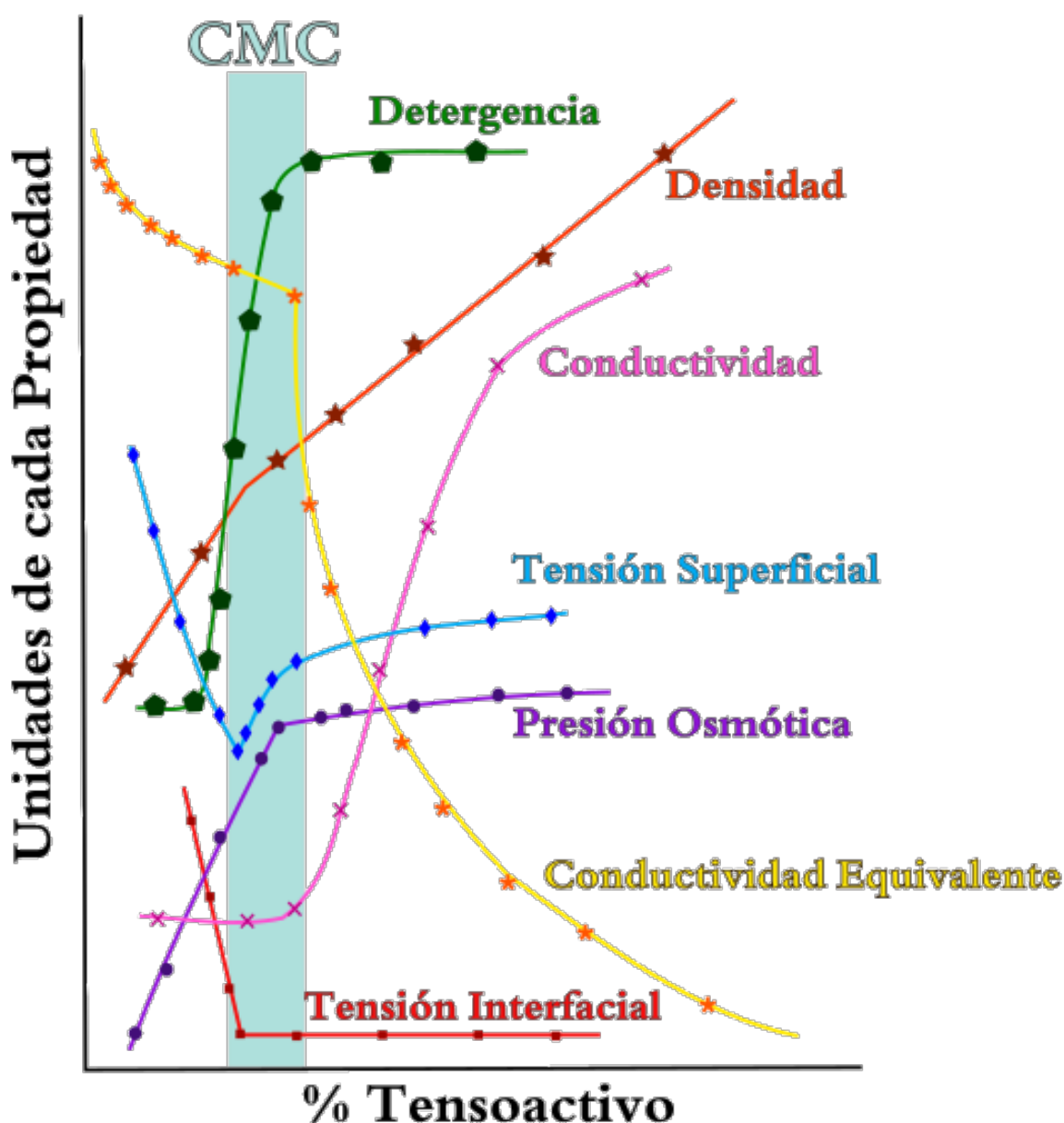


Figura 1.9. Ejemplo de una gráfica Propiedad vs Concentración. Se puede observar como en todas las propiedades en un intervalo de concentración existe una variación notoria en la propiedad medida, a este intervalo se le conoce como Concentración Micelar Crítica. Imagen modificada de Presto¹⁶.

En una dispersión acuosa, pueden existir diferentes comportamientos de la molécula en el medio, dependiendo de su naturaleza. En el caso de una molécula hidrofílica esta tenderá a solubilizarse, mientras que una molécula hidrófoba mostrará una propensión a migrar a la interfase. Si hubiera una dispersión de ambas moléculas, se detectaría un comportamiento diferenciado, la molécula hidrófoba migraría a alguna de las interfaces (g/l o l/s) y la hidrófila permanecería soluble. Como ya se mencionó los anfifilos contienen en su estructura tanto la porción hidrofílica (cabeza) como la porción hidrofóbica (cola), como un todo, su separación no es posible. Sin embargo, la repulsión entre el medio y la parte hidrófoba existe, lo que causa la reorganización de las moléculas: las colas hidrófobas se unirán para impedir el contacto con el medio, quedando rodeadas de las cabezas solubles, esta “capa” de cabezas protegerá al núcleo interior hidrofóbico del medio^{15,17}.

La formación de micelas se produce por dos interacciones moleculares opuestas¹⁸:

- Una atractiva, conocida como efecto hidrofóbico, lo cual se explica como la tendencia de las sustancias hidrófobas a agregarse para evitar el contacto con el agua.
- Y la otra debida a las interacciones repulsivas entre las cabezas hidrófilas (estas pueden ser estéricas, electrostáticas, dependiendo cual sea la molécula hidrofílica) que previene el crecimiento de las micelas hasta llegar a una separación de fases.

En diversas referencias^{15,19,20} se plantean distintas expresiones matemáticas que relacionan las variables del proceso de agregación, la presente tesis sólo presenta la que se considera más representativas del fenómeno.

$$\Delta G_{mic}^o = RT \times \ln(x_{cmc}) \quad (1.3)$$

donde ΔG_{mic}^o es la energía libre de Gibbs de micelización, x_{cmc} es la concentración micelar crítica en fracción molar, R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta, de la definición de energía libre de Gibbs se obtiene:

$$\ln(x_{cmc}) = -\frac{\Delta S_{mic}^o}{R} + \frac{\Delta H_{mic}^o}{RT} \quad (1.4)$$

donde ΔS_{mic}^o y ΔH_{mic}^o es la entropía y la entalpía de micelización.

1.3.2. Sistemas Vesiculares

Cuando la bicapa del agregado separa el solvente, la estructura se denomina vesícula, dependiendo de su tamaño se nombran o clasifican como vesículas unilaminares pequeñas o grandes (SUV y LUV, respectivamente por sus siglas en inglés), mientras que el término vesículas multilaminares (MLV) se aplica en el caso de varias bicapas que atrapan parte del solvente^{21,22} (Figura 1.10).

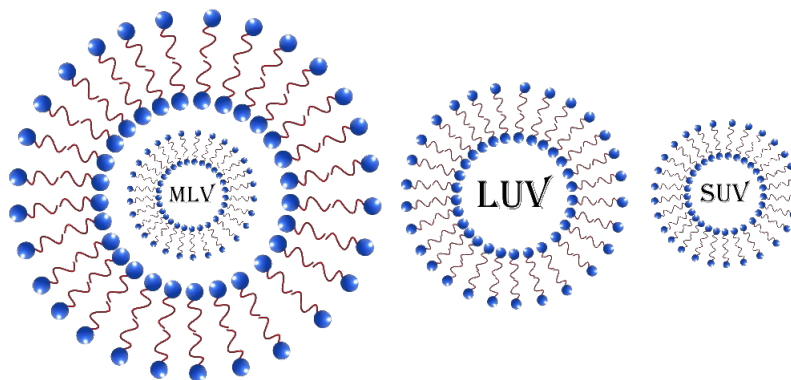


Figura 1.10. Tipos de vesículas.

Tabla 1.1. Clasificación de vesículas por tamaño

Tipo de Vesícula	Tamaño de partícula ²³	Tamaño de partícula ²⁴	Tamaño de partícula ²⁵
SUV	10- 100 nm	20 - 100 nm	20 - 100 nm
LUV	100 - 3000 nm	100 - 1000 nm	100 - 250 nm
MLV	>3000 nm	>100 nm	1000 - 5000 nm

Estas vesículas tienen una gran importancia en diversas áreas de la ciencia y tecnología:

- En investigación básica son usadas como modelos de membranas celulares y se estudia su comportamiento.
- En las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria, se usan como acarreadores de fármacos, material genético, enzimas y otras moléculas en células vivas, atravesando barreras corporales.

Los liposomas se describen por primera vez en los años 60s²⁶, como vesículas esféricas cerradas con una corteza exterior, formada por cabezas hidrófilas, una región hidrófoba (formada por la bicapa) y un núcleo interno hidrófilo (Figura 1.11).

Debido a esta estructura encapsulan moléculas tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Adicionalmente, son materiales biodegradables y no presentan toxicidad, sin embargo, presentan problemas de baja estabilidad fisicoquímica debido a la oxidación de sus componentes durante la etapa de producción y transporte¹⁸.

Por estas razones, otro tipo de monómeros se han estudiado para su obtención: los tensoactivos no iónicos, las vesículas preparadas por estos tensoactivos se conocen como niosomas, de estos agregados se hablará con más detalle en el siguiente subcapítulo.

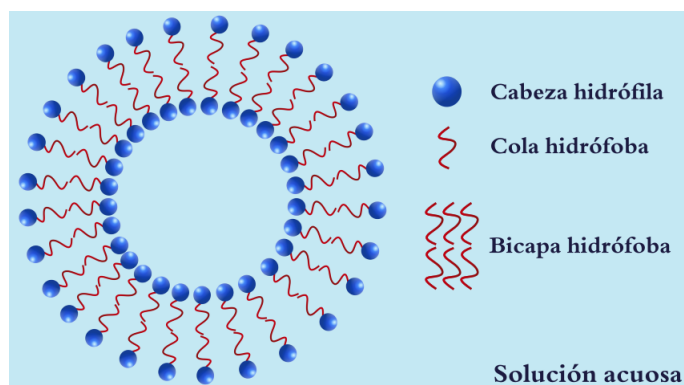


Figura 1.11. Representación esquemática de la estructura de un liposoma.

1.4. Niosomas

Los niosomas son vesículas esféricas (Figura 1.12) conformadas por tensoactivos no iónicos, pueden contener ciertos aditivos (agentes inductores de carga, estabilizadores de membrana) que aumentan su estabilidad. El proceso de producción para su uso cosmético se desarrolló y patentó por la empresa L'Oréal, se introdujo al mercado como el producto "Lancôme"²⁷.

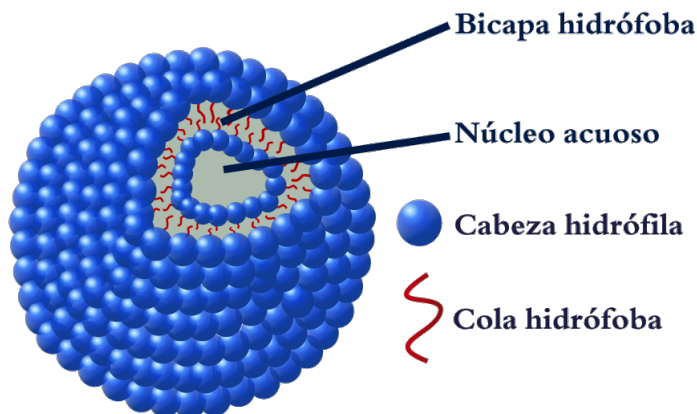


Figura 1.12. Representación esquemática de un niosoma.

1.4.1. Termodinámica de formación de niosomas

La formación de vesículas no es un mecanismo espontáneo. Para que un proceso se considere espontáneo, el valor de energía libre de Gibbs debe ser negativo, para ello se requiere que la entalpía y/o la entropía del proceso tengan una contribución favorable²⁸.

Durante el proceso de producción de niosomas, al añadir el tensoactivo en agua, la porción hidrófoba del tensoactivo provoca una interrupción en las interacciones de la red molecular de agua, restringiendo su movimiento (disminuyendo la entropía), al añadirse mayor cantidad de moléculas, estas se agregan (debido al efecto hidrófobo²⁰), el área de contacto entre la parte hidrófoba disminuye, provocando la disminución del número de moléculas de agua con movimiento restringido, sin embargo, al estar agregadas las moléculas del tensoactivo, disminuye el número posible de acomodo (descenso de entropía), por lo que el proceso no se ve favorecido entrópicamente. Para competir con el componente de entropía adverso, se requiere un aporte de energía, ya sea mediante agitación, ultrasonido, etcétera²¹. Este aporte de energía produce un aumento de temperatura que modifica el estado en que se encuentra el tensoactivo, puede encontrarse en estado gel (temperaturas bajas) o en estado líquido (temperaturas altas), siendo el estado líquido el que tiene una mayor entropía. Cuando el tensoactivo se encuentra en estado líquido el proceso de formación de niosomas se ve favorecido tanto por entropía como por entalpía.

1.4.2. Factores que afectan la formación de Niosomas

Para inducir la formación de vesículas termodinámicamente estables, se debe considerar la existencia de los factores que afectan el proceso: como lo es la composición óptima de la mezcla de tensoactivos y aditivos; así como el aporte de energía requerido para favorecer el ensamble. Como se mencionó en el subcapítulo 1.3.1 , la formación de agregados es el resultado de dos interacciones:

- La repulsión intermolecular entre la cola hidrófoba del tensoactivo y el agua (factor responsable de la formación de los agregados).
- La repulsión intramolecular entre las cabezas hidrófobas del tensoactivo (que limitan el tamaño de los agregados y evitan la segregación de fases).

Balance Hidrófilico-Lipófilico (HLB)

El concepto de HLB propuesto por Griffin²⁹ , es un método semi-empírico utilizado para la correcta elección de tensoactivo, dependiendo de su aplicación. Inicialmente el método se desarrolló para evaluar tensoactivos no iónicos y se basa, principalmente, en el tamaño de las partes hidrofílicas e hidrófobas de los tensoactivos. Para calcular el HLB de un tensoactivo no iónico se determinaron algunas fórmulas³⁰ , pero la utilizada comunmente es:

$$HLB = 20 \times \frac{M_H}{M} \quad (1.5)$$

Donde M_H es la masa molecular del grupo hidrófilo, mientras que M es la masa molar de la molécula completa.

El valor de HLB sirve para pronosticar ciertas propiedades de los tensoactivos, por ejemplo, su solubilidad en ciertos medios:

- $HLB < 10$: Tensoactivo liposoluble.
- $HLB > 10$: Tensoactivo hidrosoluble.

También es útil para determinar el posible modo de aplicación de los tensoactivos:

Tabla 1.2. Usos de los tensoactivos dependiendo su valor de HLB.

Intervalo de HLB	Uso
4-6	Agente emulsificante (w/o)
7-9	Agente humectante
8-18	Agente emulsificante (o/w)
13-15	Detergente
15-18	Solubilizante

Se ha demostrado que este factor afecta la formación de vesículas, en un estudio con monoestearato de sorbitan (Span 60), se encontró que el intervalo de HLB entre 4 y 8 está en consonancia con la formación de vesículas. En el caso de los tensoactivos hidrófilos (valores de HLB entre 14 y 17) no presentan la capacidad de formar vesículas, en este caso los monómeros se asocian sin formar niosomas. Para tensoactivos con un valor de HLB cercano a 10, se debe hacer estudios más detallados (por ejemplo, el efecto de aditivos estabilizadores de membrana como lo es el colesterol)²⁸ .

Parámetro de Empaquetamiento Crítico (CPP)

Descrito por Israelachvili³¹, el parámetro plantea la idea sobre la geometría que puede tener una vesícula o si es posible su formación. El CPP se define con la ecuación 1.6

$$CPP = \frac{V}{lc \times A_o} \tag{1.6}$$

A_o es el área del grupo hidrófilo, V es el volumen de la cadena hidrófoba y lc es la longitud crítica de la cadena hidrófoba. Esta definición se puede explicar claramente en forma gráfica (Figura 1.13), en donde además se muestra la relación entre el parámetro y la geometría posible del monómero y del agregado.

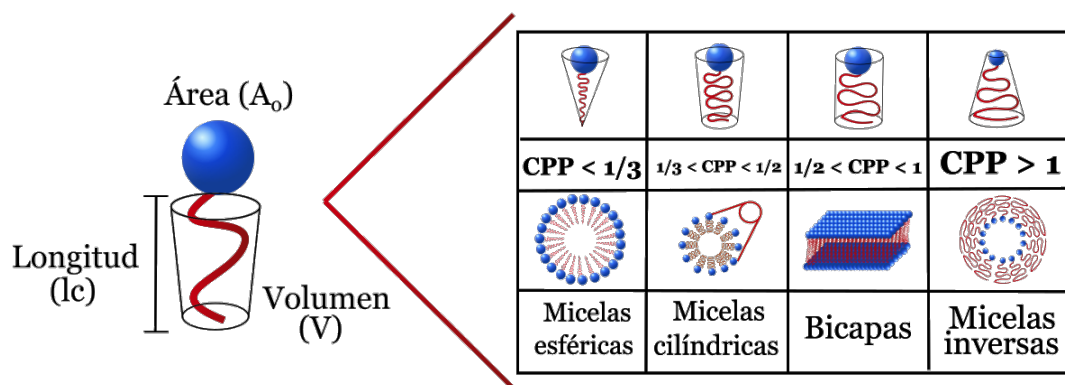


Figura 1.13. Geometrías adquiridas de acuerdo al CPP.

1.4.3. Teorías involucradas

Para explicar la formación de estos agregados se han desarrollado numerosas teorías, a continuación, se presentan algunas de ellas.

Enfoque de energía de flexión elástica

Lasic³² señaló que las membranas simétricas son planas y para curvarse, se requiere un aporte de energía (esto ya se ha mencionado en la sección 1.4.1). En algunos estudios se plantea la formación espontánea de vesículas, Lasic define este fenómeno como un proceso en el cual la simple adición de agua a la mezcla de compuestos adecuados, da como resultado vesículas. En la literatura se reporta la obtención espontánea de bicapas, sin embargo, al hacer una detenida lectura de los métodos, en lo general se emplea algún tipo de proceso que contribuye con energía (sonicación, homogenización, extrusión, entre otros). La única característica que se plantea para la formación espontánea de liposomas o niosomas, es que la bicapa que los estructura sea extremadamente flexible, es decir que su curvatura espontánea es diferente a cero ($C_0 \neq 0$), lo que puede ser causado por interacciones hidrófobas, estéricas o electroestáticas.

Enfoque de Fragmentos de Bicapa (BPF)

Al comienzo de la década de los 80s, se propuso un modelo de formación de vesículas usando el método de agotamiento de detergente, esto debido a que a comparación de otros métodos, donde la formación de vesículas ocurre casi instantáneamente, en este método las estructuras intermedias tienen una mayor estabilidad.

La solución de partida para estas técnicas de preparación es una solución micelar mixta de fosfolípidos, disueltos en micelas de detergente (se puede disolver MLVs con detergente), al retirar el detergente de las pequeñas micelas mixtas de detergente/fosfolípido, estas crecen por fusión. Cuando no hay suficientes moléculas de detergente para proteger la bicapa hidrófoba expuesta al ambiente polar, las micelas se doblan para eliminar esta exposición desfavorable, lo que ocasiona que se cierren.

Usando esta información, se puede dilucidar como se producen las vesículas con otros métodos²². Dado que en estos no se usa detergente, las pequeñas micelas que funcionan como estructura intermedia no existen como tal, existe una estructura similar conocida como fragmento de bicapa. Estos fragmentos se producen en los diversos métodos de varias maneras, un ejemplo es la extrucción de una dispersión con MLVs. Estos fragmentos en un medio acuoso, presentan una inestabilidad debido a sus bordes expuestos, cuando estos se cierran sobre si mismos (a veces se requiere que se fusionen primero), eliminan esta interacción y forman las vesículas.

Los fragmentos de bicapa se forman en los métodos de inyección y burbujeo, debido a que el anfifilo se adsorbe en la interfase de la burbuja (gas/medio acuoso) mientras la burbuja existe; las bicapas se despegan formando los fragmentos. En el caso de las técnicas que usan emulsiones agua en aceite (W/O), la existencia de los fragmentos no es tan evidente. Las micelas inversas formadas al inicio se transforman en vesículas al eliminar la fase orgánica, estas micelas crecen en tamaño, formando una estructura de superficies curvadas con bicapa que al agregar agua se rompen y se cierran o en algunos casos, se descomponen en fragmentos de bicapa que forman las vesículas inmediatamente, en cualquier caso, una bicapa plana es una estructura intermedia necesaria para que se dé la formación de vesículas.

La introducción de fragmentos de bicapa como estructura intermedia común en el proceso de formación de vesículas permite la unificación de todas las técnicas en un esquema (Figura 1.14). El seguimiento experimental directo de la mayoría de técnicas de preparación es prácticamente imposible, las estructuras de transición en estos procesos son causadas por influencias externas (energía mecánica, eléctrica, gradientes de concentración, cambio en condiciones de solubilidad, evaporación) que generalmente no permiten el monitoreo simultáneo. Las estructuras de transición son altamente inestables y cuando el método de preparación puede interrumpirse para un análisis los resultados no son completamente concluyentes. Es debido a esto que se toma el método de agotamiento de detergente como base para desarrollar el modelo.

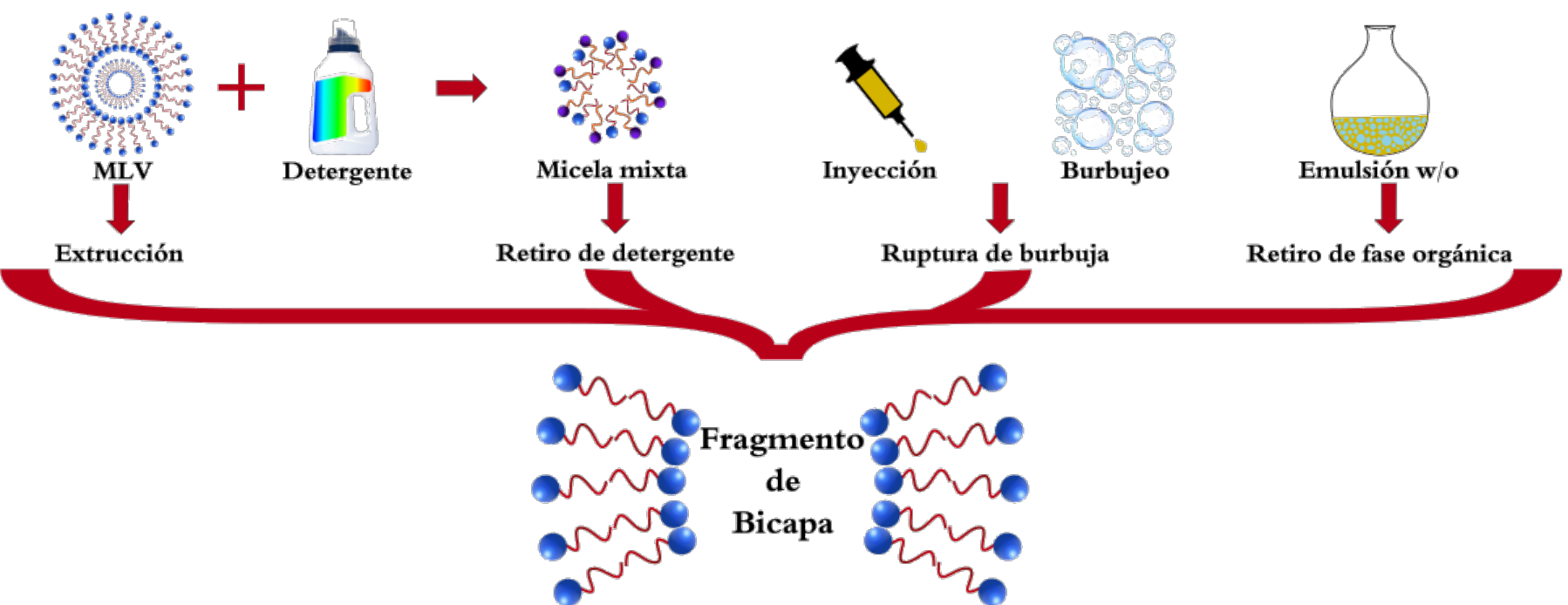


Figura 1.14. Representación esquemática de la formación de Fragmentos de Bicapa.
Imagen modificada de Lasic²².

Área efectiva por cadena lipídica (A_c)

En un estudio reciente³³ se informa que el tomar en cuenta sólo ciertos factores (como lo es el valor de HLB o el de CPP) es incorrecto, pues en diversas ocasiones estos son contradictorios o no dan un enfoque completo. Es por esto que Cevc, propone un nuevo enfoque: el área efectiva por cadena lipídica (sección transversal de la cola), la cual parece relacionarse adecuadamente con la facilidad para la formación de vesículas. Cevc traza el gráfico de tiempo de vesicularización (tiempo de sonicación necesario para formar una solución con una turbidez específica) contra el área efectiva por cadena lipídica (A_c), concluyendo que a bajos tiempos de vesicularización se forman las vesículas “espontáneamente”, mientras que a tiempos altos solo se obtienen soluciones micelares. De acuerdo a lo obtenido en este estudio, un valor de A_c por encima de 0.43nm^2 identificara micelas, un área menor a esta implica la formación de vesículas con bicapa, mientras que los anfifilos con A_c de 0.43nm^2 formara estructuras multilaminares.

1.4.4. Estabilidad

Los principales factores que determinan la estabilidad de los niosomas son³⁴ :

- Tipo de tensoactivo. Influye en la fluidez de la membrana, a una mayor temperatura de transición gel-líquido, mayor será la capacidad de retención de fármacos por parte de los niosomas, además también determina la temperatura a la que se debe trabajar, pues comúnmente las vesículas se forman arriba de la temperatura de transición.
- Tamaño de niosoma. Tamaños muy pequeños de niosomas no son estables, debido a la tendencia de estos a agregarse.
- Temperatura de almacenamiento. Es un factor importante en la estabilidad de los agregados, pues un cambio en esta temperatura a menudo da como resultado un cambio en las membranas de la bicapa.

Otro factor a considerar es la magnitud del potencial zeta, esto da una predicción del sistema coloidal, si las partículas en suspensión tienen un gran potencial zeta (negativo o positivo), tenderán a repelerse entre sí con lo cual se evita que se agreguen. En cambio si los valores de potencial zeta son bajos, no hay fuerza repulsiva y las partículas se agregaran. En general, se considera que un valor de potencial zeta mayor a 30mV (negativo o positivo) es estable.^{35,36}

Uno de los métodos utilizados para estabilizar los niosomas se basa en la adición de moléculas cargadas a la bicapa, el decetilfosfato (DCP)³⁷ y ácido fosfatídico son moléculas con carga negativa, mientras que la estearilamina (SA) y cloruro de cetilpiridinio son moléculas con carga positiva que se usan comúnmente en la preparación de niosomas como aditivos para prevenir su agregación^{28,38}. En estudios realizados por C. Cable³⁹, se observó que en formulaciones con DCP o SA en la bicapa, el potencial zeta se ve modificado con la variación de pH.

Otro factor importante a considerar es el Índice de Polidispersidad (IPd), el cual es básicamente una representación de la distribución de poblaciones de tamaño en una muestra. El valor numérico de IPd varía de 0.0 (muestra perfectamente uniforme, sin poblaciones múltiples) a 1.0 (muestra con poblaciones múltiples). En el caso que los niosomas se requieran para la administración de fármacos se considera aceptable un IPd de 0.3⁴⁰.

Tabla 1.3. Parámetros que influyen en la estabilidad de niosomas.

Parámetro	Estabilidad	Inestabilidad
Temperatura de transición	Altas	Bajas
Potencial zeta	Valor lejano a 0	Valor cercano a 0
Índice de Polidispersidad	Menores a 0.3	Cercano a 1.0
Valor de HLB	De 4 a valores cercanos a 10	Entre 14 a 17

1.4.5. Métodos de preparación

Los métodos que se utilizan frecuentemente para la preparación de niosomas son los de hidratación debido a su facilidad.¹⁸ En términos simples, para la preparación de niosomas se requiere de hidratar el tensoactivo a temperaturas elevadas, posteriormente se realiza una reducción de tamaño si es necesario. A continuación, se describirán brevemente los métodos usados con mayor frecuencia en la preparación de niosomas.

Método de inyección

En el método de inyección, los tensoactivos con aditivos se disuelven en un solvente orgánico (por ejemplo éter) y se inyectan, lentamente en una solución acuosa (puede contener fármaco) a una temperatura constante. El disolvente orgánico se evapora con la ayuda de un rotavapor, durante la evaporación ocurre la formación de vesículas³⁷.

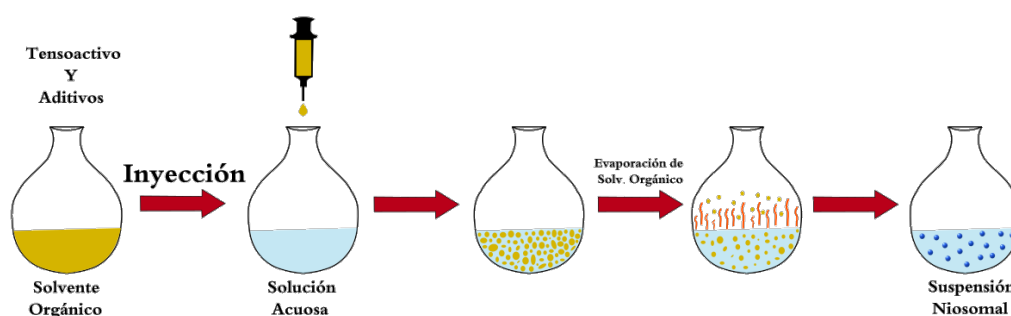


Figura 1.15. Método de Inyección. Imagen modificada de Moghassemi³⁷.

Hidratación de película

Es un método simple, aquí los tensioactivos y aditivos se disuelven en un solvente orgánico, dentro de un matraz de fondo redondo (matraz bola), posteriormente, se elimina el solvente usando un rotavapor formando una película delgada, a la que se le agregara una solución acuosa (puede llevar fármaco), es importante que la hidratación se haga por encima de la temperatura de transición del tensioactivo³⁷.

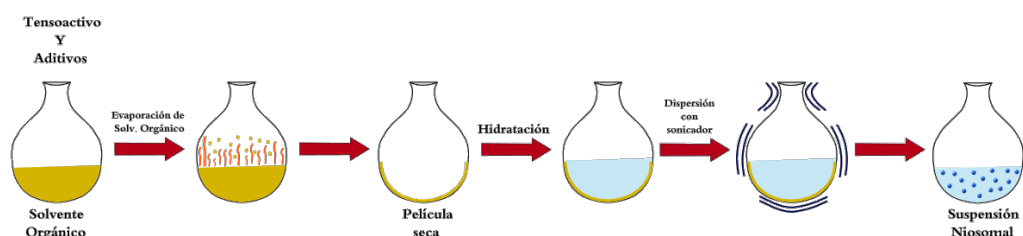


Figura 1.16. Método de Hidratación de película. Imagen modificada de Moghassemi³⁷.

Método de Evaporación en fase inversa (REV)

En este método los tensioactivos y aditivos, también se disuelven en solvente orgánico (éter), a esta mezcla se le añade una fase acuosa (puede tener fármaco), y es sonicada para formar una emulsión, se le agrega buffer de fosfato (PBS) provocando la formación de un gel. Después se elimina lentamente la fase orgánica usando un rotavapor. La suspensión viscosa de niosomas se diluye con PBS en un baño de agua caliente.

Este método tiene la ventaja de controlar el tamaño de los niosomas, sin embargo tiene como principal inconveniente, la dificultad en la eliminación completa del solvente³⁷.

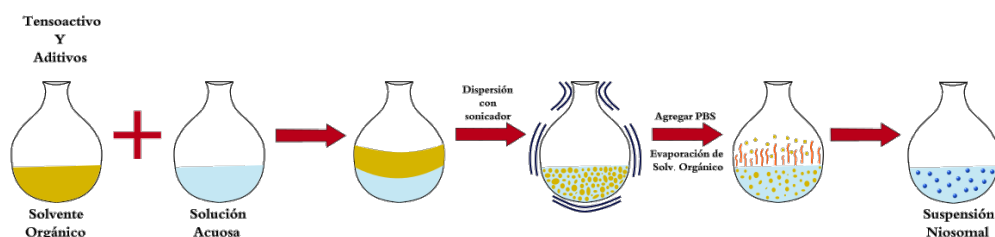


Figura 1.17. Método de Evaporación en fase inversa (REV). Imagen modificada de Moghassemi³⁷.

Tabla 1.4. Solventes usados en los métodos de producción de liposomas y niosomas convencionales.

Método de preparación	Solventes usados (Liposomas)	Solventes usados (Niosomas)
Inyección	Etanol ⁴¹ , Isopropanol ⁴² , Éter ⁴³	Etanol ⁴⁴ , Éter ^{28, 37, 45, 46}
Hidratación de película	Cloroformo/Metanol ^{47, 48} , Cloroformo ⁴⁹	Cloroformo ⁵⁰⁻⁵²
Evaporación en fase inversa (REV)	Éter etílico/Isopropil éter/Halotano/Trifluorotricloroetano con Éter, Cloroformo o Metanol ⁵³ Éter etílico ⁵⁴ , Etanoato de etilo ⁵⁴ , Etanoato de etilo/Etanol ⁵⁴ , Agua ⁵⁴	Éter/Cloroformo ^{28, 46, 55} , Cloroformo/Metanol ⁵⁶

Otros Métodos

Existen otros métodos que no son tan populares como los mencionados anteriormente, sin embargo estos presentan diversas ventajas que pueden facilitar la producción de niosomas como es la optimización de tiempos, costos o la posibilidad de evitar el uso de solventes orgánicos. Entre estos destacan dos: el método de burbujeo (el cual se explicará en la sección 1.5) y el método de Micro fluidización.

En el método de Micro fluidización dos corrientes fluidizadas (una contiene el tensoactivo y la otra fármaco) interactúan a velocidades altas. Con este método se mejora el tamaño y la distribución de poblaciones de los niosomas²¹.

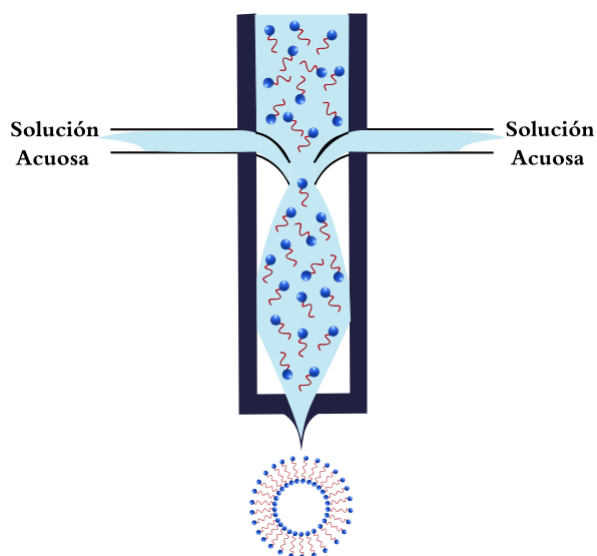


Figura 1.18. Método de Micro fluidización. Imagen modificada de Marianecci²⁸.

1.4.6. Importancia en la Industria Farmacéutica

Muchos de los problemas de la industria farmacéutica actual son causados por la naturaleza de los fármacos, pues varios de ellos son, según el sistema de clasificación biofarmacéutica, en clase II o IV, los cuales tienen baja solubilidad, permeabilidad, o ambos⁵⁷. Debido a esto se buscan estrategias para mejorar su biodisponibilidad, ya sea modificando la molécula o con nuevos sistemas de liberación, esta última estrategia ha tomado bastante relevancia debido al desarrollo en tecnología que permite la disminución de tamaño (nanoescala) para los acarreadores de fármacos³⁷.

Para que un nano transportador/acarreador sea considerado exitoso, idealmente debe ser capaz de cumplir los siguientes requisitos²⁸:

- Biocompatibles, biodegradables.
- Alta capacidad de carga de fármaco.
- Mecanismo de entrega específico para evitar daño a células o tejidos.
- Mecanismo de liberación controlada.

Hasta la fecha existe un número muy limitado de nano transportadores que alcanzan estos requisitos, uno de éstos son los sistemas vesiculares bilaminares, pues al tener un núcleo hueco pueden encapsular grandes cantidades de fármacos y debido a que sus componentes son anfífilos, permite la carga de fármacos tanto hidrófilos como lipófilos²⁸ .

Tanto los niosomas como los liposomas han llamado la atención de la industria debido a que, además de ser usados como sistemas liberadores de fármacos (por su capacidad de circular en fluidos biológicos y proteger al fármaco durante el tiempo necesario para llegar al sitio diana), también pueden ser útiles en la industria cosmética^{21,58} .

1.5. Método de Burbujeo

Este método no necesita el uso de disolventes orgánico, se requiere un matraz con tres cuellos, en el cual se colocan los tensoactivos, aditivos (si son necesarios), y un medio acuoso (agua destilada, buffer de fosfatos, entre otros). En las bocas del matraz se coloca un condensador de reflujo, un termómetro y un suministro de nitrógeno, el matraz se coloca en un baño de agua para controlar la temperatura. Los reactivos requieren homogenizarse como paso previo, después se burbujea el gas nitrógeno para la producción de niosomas³⁷ .

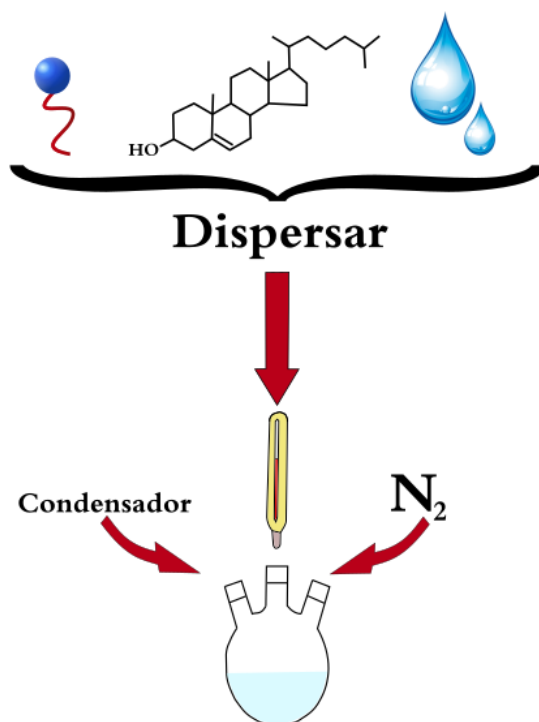


Figura 1.19. Método de Burbujeo. Imagen modificada de Yeo³⁶ .

1.5.1. Fundamento

El mecanismo propuesto por Talsma et. al.⁵⁹ de formación de niosomas mediante el burbujeo con nitrógeno es el siguiente:

- Primero ocurre la formación de una monocapa de tensoactivo en la interfase aire-disolución, por la interacción entre el tensoactivo y el medio acuoso (A).
- Una vez que se adiciona el nitrógeno en la disolución, se genera una nueva interfase nitrógeno-agua por el burbujeo. El tensoactivo en solución se adsorbe en esta nueva superficie formando una monocapa (B).
- Posteriormente, la burbuja migra a la superficie, al pasar esto, la monocapa de la burbuja entra en contacto con la monocapa de la superficie (C).
- Al romperse la burbuja, se establece la unión de las monocapas, dando como resultado la formación de una bicapa (D); el movimiento inducido por el burbujeo fragmenta la bicapa.
- Debido a la exposición de sus extremos hidrófobos y la formación de una bicapa plana en el medio acuoso, estos fragmentos son inestables (E).
- La inestabilidad de los fragmentos de bicapa conduce a la formación de vesículas (F) (Esto se basa en el enfoque de fragmentos de bicapa, explicado en la sección 1.4.3).

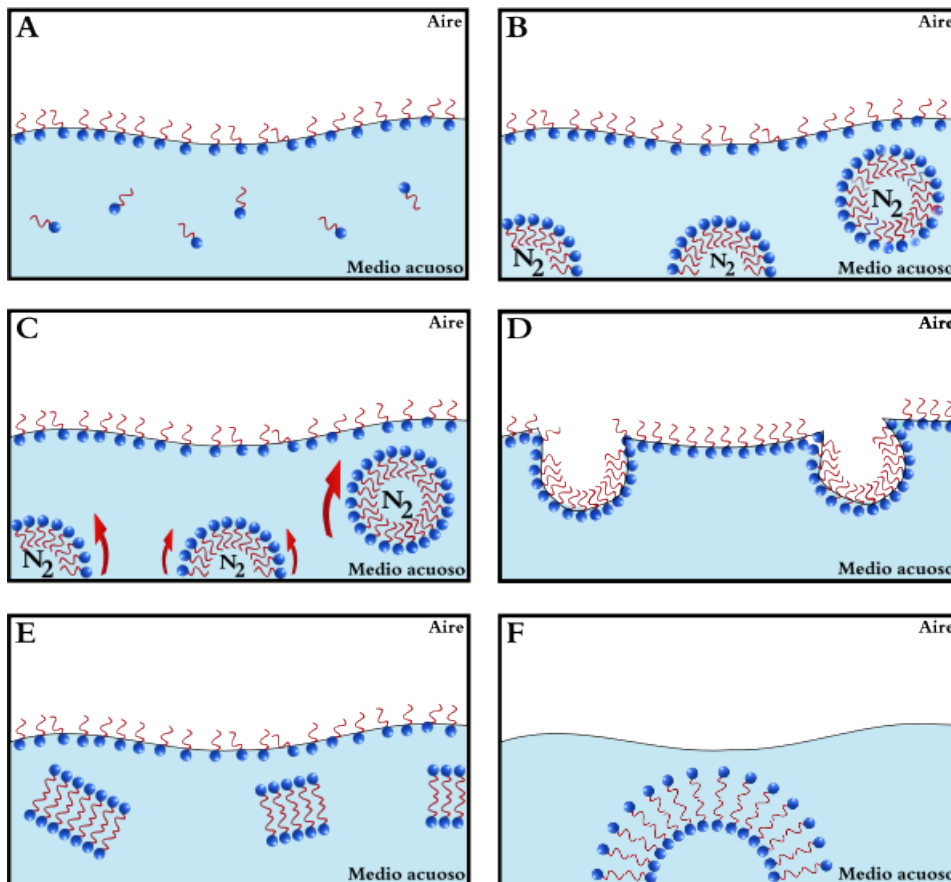


Figura 1.20. Fundamento de formación de niosomas por el Método de Burbujeo. Imagen modificada de Talsma et.al.⁵⁹

Desarrollo experimental

2.1. Reactivos

2.1.1. Tensoactivos

Ésteres de sorbitán (Spans)

Los ésteres de sorbitán se preparan en reacciones de uno o dos pasos. En la reacción de una etapa, el sorbitol y el donante acilo se convierten simultáneamente en el éster de sorbitán. Por otro lado, en la reacción de dos pasos, primero el sorbitol se deshidrata a sorbitán, en el segundo paso, el sorbitán formado se esterifica con un donante acilo^{60,61} (Figura 2.1).

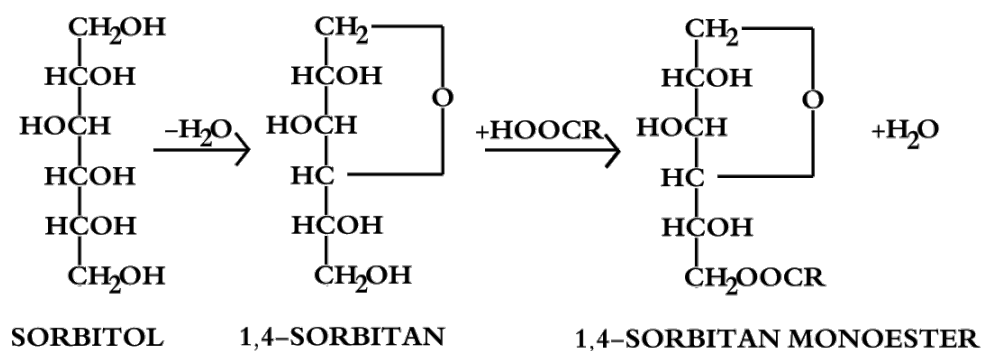


Figura 2.1. Reacción de síntesis de ésteres de sorbitán.

Los tensoactivos basados en sorbitol, muestran propiedades diferentes en comparación a los basados en otros azúcares, como puede ser el manitol, un ejemplo es que el sorbitol actúa como un mejor humectante por su naturaleza higroscópica.

Son ampliamente usados en la industria como parte de formulaciones para comida, textiles, artículos de cuidado personal, o medicamentos. Entre sus aplicaciones destaca su uso como emulsificantes, agentes humectantes, detergentes y lubricantes.⁶¹

En esta tesis solamente se probaron los siguientes ésteres de sorbitán: monolaurato de sorbitán (Span 20), monoestearato de sorbitán (Span 60), triestearato de sorbitán (Span 65), monooleato de sorbitán (Span 80) y trioleato de sorbitán (Span 85). A continuación se muestran algunas de sus propiedades en la Tabla 2.1.

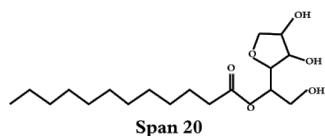


Figura 2.2. Monolaurato de sorbitán.

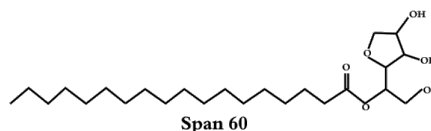


Figura 2.3. Monoestearato de sorbitán.

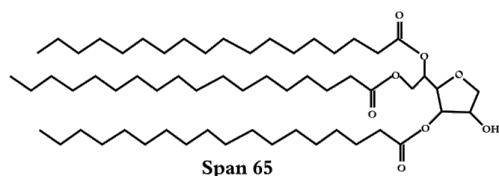


Figura 2.4. Triestearato de sorbitán.

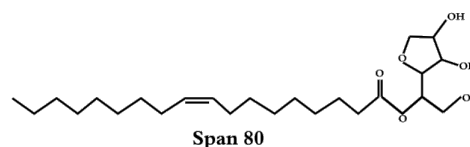


Figura 2.5. Monooleato de sorbitán.

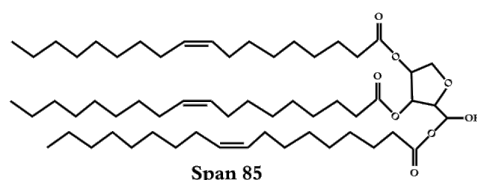


Figura 2.6. Trioleato de sorbitán.

Tabla 2.1. Propiedades de los ésteres de sorbitán.

Nombre	Nombre común	Estado a 25 ⁰ C	HLB	Solubilidad en aceite mineral	Solubilidad en agua	$\sigma_{1\%}$ [Dyna/cm]
Monolaurato de sorbitán	Span 20	Líquido	8.6	Soluble	Insoluble	28
Monoestearato de sorbitán	Span 60	Sólido	4.7	Insoluble	Insoluble	46
Triestearato de sorbitán	Span 65	Sólido	2.1	Insoluble	Insoluble	48
Monooleato de sorbitán	Span 80	Líquido	4.3	Soluble	Insoluble	30
Trioleato de sorbitán	Span 85	Líquido	1.8	Soluble	Insoluble	32

Polisorbatos (Tweens)

La reacción de los óxidos de etileno con ésteres de sorbitan (Span) da como resultado la formación de otra clase de compuestos llamados Tween, estos productos finales dependerán del Span de partida y de las condiciones de reacción. Al igual que los Span son usados en la industria alimenticia, textil, farmacéutica por sus numerosas aplicaciones en las formulaciones de cada una de ellas⁶⁰.

En esta tesis se trabajó con: monopalmitato de polioxietilensorbitan (Tween 40) y monoestearato de polioxietilensorbitan (Tween 60), a continuación se muestran algunas de sus propiedades en la Tabla 2.2.

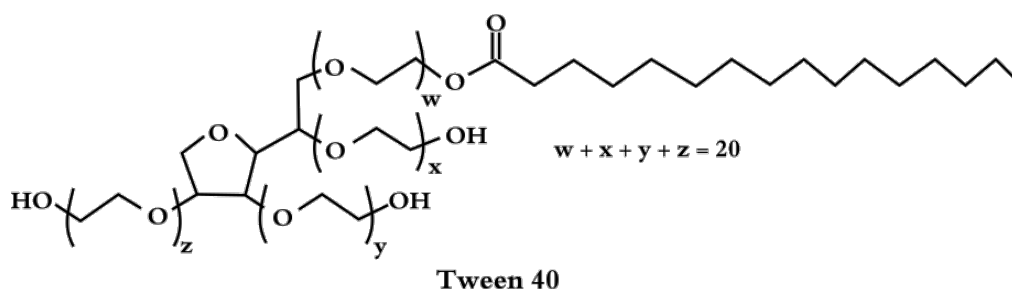


Figura 2.7. Monopalmitato de polioxietilensorbitan.

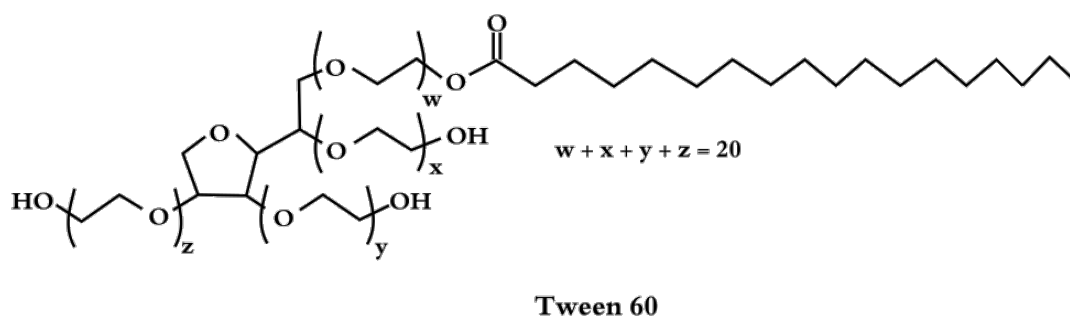


Figura 2.8. Monoestearato de polioxietilensorbitan.

Tabla 2.2. Propiedades de los polisorbatos.

Nombre	Nombre común	Estado a 25°C	HLB	Solubilidad en aceite mineral	Solubilidad en agua	$\sigma_{1\%}$ [Dyna/cm]
Monopalmitato de polioxietilensorbitán	Tween 40	Líquido	15.6	Insoluble	Soluble	40
Monoestearato de polioxietilensorbitán	Tween 60	Líquido	14.9	Insoluble	Soluble	43

2.1.2. Colesterol

Es un esteroide natural, clasificado como esteroide (unión entre esteroide y alcohol), comúnmente se encuentra en las membranas celulares. La estructura de la molécula de colesterol (Figura 2.9) se puede describir como: una cabeza polar (constituida por un grupo hidroxilo en el carbono 3) y una cola apolar (formada por los ciclos y sustituyentes alifáticos). El grupo hidroxilo puede formar puentes de hidrógeno con el agua y con otros componentes de las membranas celulares.

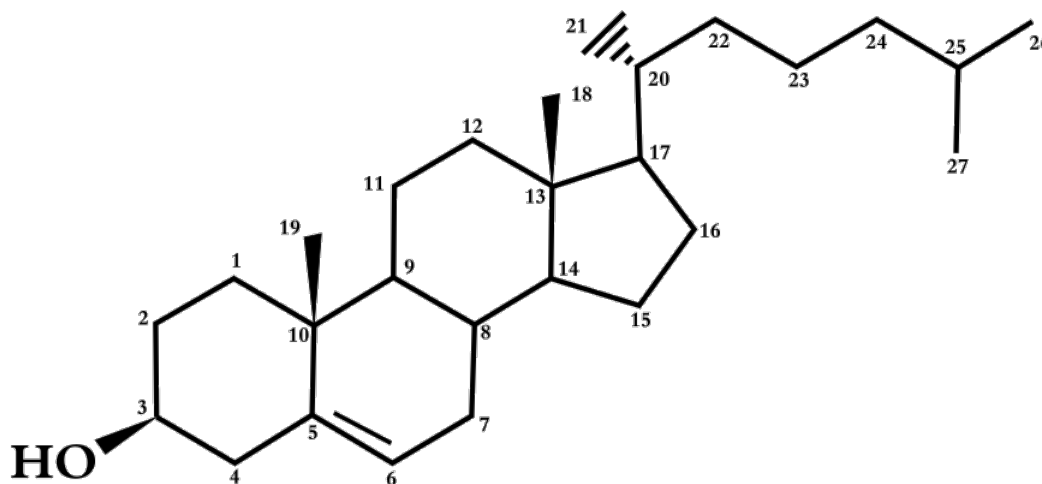


Figura 2.9. Estructura del Colesterol.

El colesterol es usado en la formulación de niosomas como estabilizador, pues varios estudios muestran que este esteroide reduce la permeabilidad de la membrana a solutos y mejora la resistencia de las vesículas a la agregación.

Tabla 2.3. Reactivos utilizados.

Reactivos	Marca	Lote
Colesterol	Sigma	SLBR4060V
Span 20	Sigma	MKBX8187V
Span 60	Sigma	SLBQ4762V
Span 65	Sigma	BCBR4704V
Span 80	Sigma	MKBW2346V
Span 85	Sigma	MKCC8524
Tween 40	Sigma	MKBZ6697V
Tween 60	Sigma	MKBX0810V

2.1.3. Gases

Aire

Es una mezcla de varios gases, además de partículas sólidas y líquidas que se encuentran en una concentración variable. Los dos gases que se encuentran en mayor cantidad son el nitrógeno (78.084 %) y oxígeno (20.9476 %), el resto (alrededor de 1 %) son gases nobles (Neón, Argón, Xenón, Helio), vapor de agua, dióxido de carbono⁶².

Tabla 2.4. Propiedades del Aire.

Gas	Densidad (Kg/m ³)	Viscosidad (Kg/ms)
Aire	1.225	0.000018

Nitrógeno

Es una molécula formada por dos átomos de nitrógeno unidos por un triple enlace, en condiciones ambientales se encuentra en el estado gaseoso y es uno de los principales componentes del aire.

En forma de gas es incoloro e inodoro, no es combustible y tampoco tóxico. Se utiliza en diversas industrias debido a su condición inerte, como en la industria alimenticia, también en la fabricación de ciertos componentes mecánicos, electrónicos.

Tabla 2.5. Propiedades del Nitrógeno.

Gas	Densidad (Kg/m ³)	Viscosidad (Kg/ms)
Nitrógeno	1.251	0.000018

Dióxido de Carbono

Molécula formada por un átomo de carbono unido a dos átomos de hidrógeno, en condiciones ambientales es un gas incoloro e inodoro. Es producido en numerosos procesos (respiración, descomposición) del ciclo del carbono, siendo parte esencial de este.

Se utiliza en diversas industrias en sus diferentes estados, ya sea como gas (bebidas carbonatadas, gas usado en soldadura), líquido en condiciones supercríticas (extracción de compuestos), sólido (como hielo seco).

Tabla 2.6. Propiedades del Dióxido de Carbono.

Gas	Densidad (Kg/m ³)	Viscosidad (Kg/ms)
Dióxido de Carbono	1.976	0.0149

2.1.4. Medios de disolución

Agua Desionizada

Es un tipo de agua la cual ha sido expuesta a resinas cargadas, las cuales retienen ciertos iones disueltos como el calcio, hierro, cobre, sodio, bromuro y cloruro, removiéndolos del líquido. Esta agua no contiene ningún ion (excepto H^+ y OH^-), aún así puede contener ciertos contaminantes no iónicos disueltos. Almacenada su pH suele ser ácido debido al CO_2 ambiental que se disuelve para formar ácido carbónico. Es usada comúnmente en la industria y en laboratorios. El agua utilizada en este estudio es de una resistividad de $18.2 M\Omega * cm$ y fue obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore Simplicity del Laboratorio de Biofísica de la Facultad de Química UNAM.

Agua Destilada

Es agua obtenida por procesos de evaporación y condensación para eliminar los contaminantes, si el proceso se realizó de forma correcta, el agua no debería de contener ningún contaminante (mineral, gas, compuesto orgánico) y su pH debería ser neutro. Se utiliza comúnmente en laboratorios y en la industria manufacturera. El agua fue obtenida del laboratorio de Ingeniería Química de la Facultad de Química UNAM.

Solución Isotónica

Solución de cloruro de sodio o dextrosa a concentración fisiológica de los fluidos corporales y celulares humanos, usada para evitar cualquier tipo de daño causado por el proceso de osmosis. Es usada para aumentar el volumen de líquido extracelular, en casos de pérdida de sangre o deshidratación. La solución utilizada era marca PiSA, lote V19Y244.

2.2. Técnicas Experimentales

2.2.1. Dispersión Dinámica de la Luz (DLS)

La dispersión dinámica de la luz, es una técnica útil para el estudio del comportamiento de partículas en solución (como lo son los niosomas), está basada en la dispersión de luz causada por partículas en movimiento⁶³.

Cuando a una partícula en una suspensión coloidal es iluminada por una fuente de luz (laser), esta dispersará luz en todas direcciones (Figura 2.10). Si una pantalla se encuentra cerca de la partícula, esta puede ser iluminada por la luz. Dado que en un sistema de estudio no se encuentra exclusivamente una partícula individual, sino miles de ellas, la pantalla mostrará patrones de manchas que consisten en áreas brillantes y oscuras.

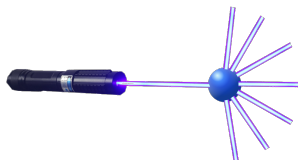


Figura 2.10. Dispersión de luz provocada por una partícula.

Debido a que las partículas en suspensión experimentan el movimiento browniano (resultado de su colisión con las partículas del disolvente), el patrón de manchas también se mueve, lo que causa que las áreas brillantes y oscuras aumenten y disminuyan su intensidad. Por lo que se miden las fluctuaciones de intensidad de luz dispersada, usando un detector (Figura 2.11). La rapidez a la que las fluctuaciones ocurren depende del tamaño de las partículas, partículas grandes tendrán una mayor intensidad de fluctuación que partículas pequeñas.

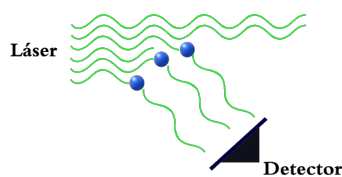


Figura 2.11. Detección de intensidad de luz dispersada.

Cuando se analizan las fluctuaciones de intensidad (el análisis lo efectúa el equipo utilizado), se obtiene el coeficiente de difusión (Dt) que se relaciona con el tamaño hidrodinámico de las partículas. Debido a que las fluctuaciones se deben al movimiento browniano y este depende de la temperatura y viscosidad del disolvente, por lo que es importante tomarlas en cuenta.

Para relacionar el tamaño de partícula con el coeficiente de difusión, se requiere de la ecuación de Stokes Einstein:

$$Dh = \frac{k_B \times T}{3 \times \eta \times \pi \times Dt} \quad (2.1)$$

Dónde: D_h es el diámetro hidrodinámico, D_t es el coeficiente de difusión, k_B es la constante de Boltzmann, T es la temperatura termodinámica, η es la viscosidad y π es 3.14159...

2.2.2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Esta técnica permite el análisis morfológico de una microestructura, así como determinar su tamaño. Las imágenes obtenidas son conocidas por su detalle y profundidad de campo que dan al investigador claridad y perspectiva.

Su funcionamiento consiste en incidir un barrido de haz de electrones sobre la superficie de la muestra. La muestra (salvo que ya sea conductora), generalmente es recubierta con una capa muy fina de oro o carbón, lo que le otorga propiedades conductoras. Al cubrir el haz, la superficie de la muestra, se generan principalmente las siguientes partículas.

- Electrones reflejados o retrodispersados
- Electrones secundarios
- Radiación electromagnética y otras partículas menos significativas

Los dos tipos de electrones se pueden detectar como una señal, por lo que se pueden amplificar y registrar. Internamente, el microscopio se encuentra equipado con detectores que recogen la energía y la transforman en imágenes y datos.

- Detector de electrones secundarios: (SEI Secondary Electron Image) con lo que se obtienen las imágenes de alta resolución.
- Detector de electrones retrodispersados: (BEI Backscattered Electron Image). Menor resolución de imagen pero mayor contraste para obtener la topografía de la superficie.
- Detector de energía dispersiva: (EDS Energy Dispersive Spectrometer) detecta la radiación generada y permite realizar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra.

2.2.3. Método del anillo de Du Noüy

En este método se usa un anillo de aleación iridio-platino, este anillo es mojado por el líquido al que se busca determinar el valor de tensión superficial. El anillo se coloca de forma horizontal sobre la superficie del líquido y, posteriormente, se utiliza un equipo para determinar la fuerza necesaria para separar el anillo del líquido³.

La fuerza es el peso del líquido levantado por el anillo. La relación entre el peso y la tensión superficial se define como:

$$W = M \times g = 4 \times \pi \times R \times \sigma \quad (2.2)$$

Donde W es el peso del líquido levantado, M la masa del líquido, g la aceleración de la gravedad, R el radio del anillo, σ es la tensión superficial y π es 3.14159... Reacomodando la ecuación 2.2, la tensión superficial se calcularía de la siguiente manera:

$$\sigma = \frac{M \times g}{4 \times \pi \times R} \quad (2.3)$$

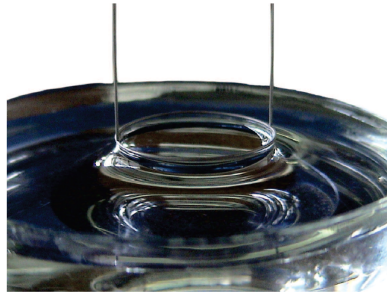


Figura 2.12. Anillo de Du Noüy sobre la superficie de un líquido.

Estudios realizados por Harkis y Jordan^{64,65} mostraron que la tensión superficial determinada por la ecuación anterior genera resultados erróneos debido a la forma de la superficie del líquido generada al ser levantado, pues esto genera fuerzas adicionales no consideradas.

Para corregir la ecuación, se propuso un factor de corrección (F) que depende de:

- El cociente del radio del anillo (R) entre el radio del alambre que forma el anillo (r).
- La relación entre el cuadrado del radio del anillo (R^3) y el volumen de líquido levantado (V).

Por lo que agregando este factor de corrección a la ecuación 2.3, se obtiene:

$$\sigma = \frac{M \times g}{4 \times \pi \times R} \times F \quad (2.4)$$

Los valores de factor F se encuentran reportados para varios valores de $\left(\frac{R}{r}\right)$ en la literatura por Harkis y Jordan⁶⁵.

2.2.4. Densidad por el método de tubo oscilatorio o vibratorio

El equipo usado cuenta con un tubo de vidrio de borosilicato en forma de U, ahí es donde se deposita la muestra. El tubo se excita y vibra a una frecuencia específica, esta frecuencia cambia según la densidad de la muestra. El periodo de vibración es inversamente proporcional a la suma de la masa del tubo, más la del fluido que la contiene y con el volumen del tubo se determina la densidad.

La ecuación matemática que utiliza el equipo para determinar la densidad es la siguiente⁶⁶ :

$$\rho = KA \times Q^2 \times f_1 - KB \times f_2 \quad (2.5)$$

Donde KA y KB son constantes características del equipo, Q es el cociente del periodo de oscilación/vibración del tubo en U dividido por el periodo de oscilación/vibración del oscilador de referencia y f_1 y f_2 son términos de corrección para temperatura, viscosidad y no linealidad.

2.3. Equipos

Tabla 2.7. Equipos utilizados.

Equipo	Marca y Modelo
Balanza analítica	METLER PM400
Balanza analítica	SHIMADZU AW220
Baño de agua con recirculador	Thermo Haake DC30 K20
Baño de agua con recirculador	Cole Parmer Polystat 301
Cronómetro	OAKTON CP117384
Densímetro	Anton Paar DMA 4500 M
Medidor de partícula	NICOMP 380 ZLS
Purificador de agua (Desionizador)	Merk Milipore Simplicity
Rotámetro	Cole Parmer 2520A4A4BVVN-CP
Sonicador	Branson 1510
Tensiómetro	Tantec ST-PLUS
Termómetro	TRACEABLE Long-Stem Thermometer 4052

2.4. Metodologías

2.4.1. Formación de niosomas

Para el desarrollo de los experimentos, primero se pesaron los reactivos (tensoactivo y agua destilada/desionizada/solución isotónica, dependiendo la prueba) en una balanza analítica (METLER PM400), las cantidades agregadas fueron las necesarias para obtener una dispersión de tensoactivo en medio acuoso en una concentración 1% m/m. Para las pruebas que requieren colesterol, este fue pesado en balanza analítica (SHIMADZU AW220), y se adicionó en las cantidades adecuadas para obtener relaciones en proporción al tensoactivo de: 1 a 10, 3 a 7 y 1 a 1. Las dispersiones se colocaron en un baño de agua (Cole Parmer Polystat 301) a una temperatura mayor a la temperatura de transición del tensoactivo (para facilitar su dispersión), posteriormente la dispersión se trasladó a un sonicador (Branson 1510), y se dispersó en alta frecuencia sin ningún calentamiento adicional. Cuando se terminó con este procedimiento, la dispersión se colocó en un matraz de tres vías, en una vía se colocó un termómetro (TRACEABLE Long-Stem Thermometer 4052), un condensador de reflujo, y finalmente el suministro de nitrógeno. El matraz se introdujo en el baño de agua (a una temperatura mayor a la de transición) y se burbujeó el gas, el gas fue regulado por un rotámetro (Cole Parmer 2520A4A40BVBN-CP). Una vez terminado el burbujeo el sistema es almacenado para posteriores estudios.



Figura 2.13. Diagrama del procedimiento para formación de niosomas.

2.4.2. Mediciones de tensión superficial

Las mediciones de tensión superficial requirieron varias disoluciones a diferentes concentraciones, por lo que, primero se preparó una disolución de tensoactivo en agua, para ello se pesó el tensoactivo en balanza analítica (METLER PM400) y se agregó agua desionizada que se obtuvo por medio del purificador de agua o desionizador (Merk Milipore Simplicity) hasta obtener una concentración de 1% m/m. La disolución será diluida varias veces para medir su tensión superficial, usando el tensiómetro (Tantec ST-PLUS).

Cada dilución se vació en una celda para medir tensión superficial guardando un poco para la medición de densidad. Esta celda se mantuvo a temperatura constante (25°C) con ayuda de un baño de agua con recirculación (Thermo Haake DC30 K20). Una vez que la disolución llegó a un equilibrio térmico con la celda, se colocó en el tensiómetro y posteriormente con el uso de pinzas se ubicó el anillo de iridio-platino (flameado previamente para evitar contaminación) en el equipo para las mediciones de tensión superficial. Cada medición se realizó con al menos un intervalo de tiempo de 10 minutos entre ellas.

2.4.3. Mediciones de Densidad

A cada dilución hecha para la determinación de tensión superficial se le midió densidad, para esto se inyectó la muestra en el densímetro (Anton Paar DMA 4500 M) con una jeringa de plástico cuidando que no se formaran burbujas de aire, de otro modo esto interferiría con la medición.

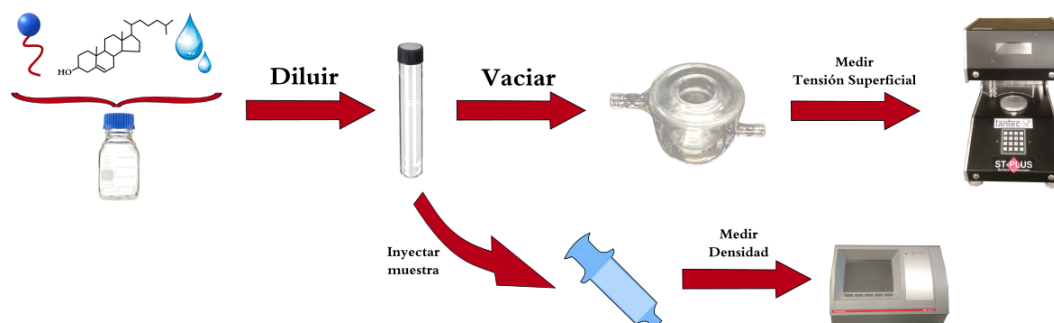


Figura 2.14. Diagrama del procedimiento para la determinación de tensión superficial y densidad.

2.4.4. Determinación de tamaño de partícula por DLS

A las preparaciones de niosomas se les midió tamaño de partícula y su distribución mediante la técnica de DLS usando un medidor de partícula (NICOMP 380 ZLS). Se vació una pequeña cantidad de preparación en una celda y esta se colocó en el equipo. Una vez ajustados los parámetros del equipo, se puso en marcha. Los tamaños de partícula fueron determinados el mismo día que se produjeron las muestras.

2.4.5. Determinación de morfología por SEM

Una vez producidos los sistemas niosomales, la muestra fue diluida (1 en 100) con agua destilada, después fue enviado al departamento de microscopia electrónica del edificio Mario Molina.

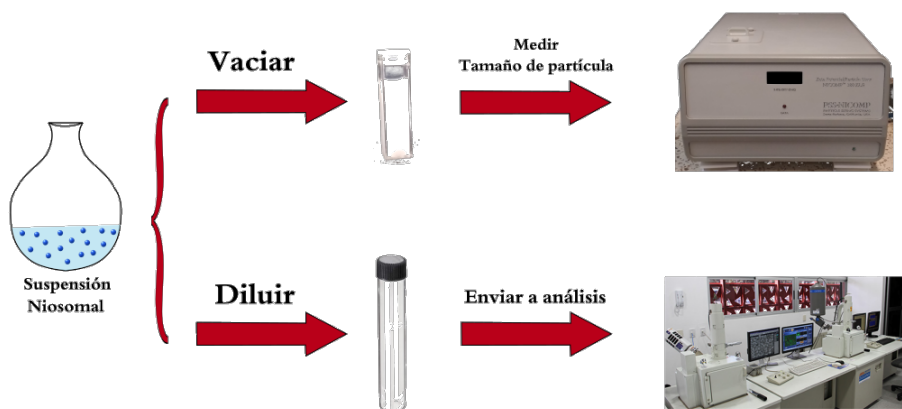


Figura 2.15. Diagrama del procedimiento para medir tamaño de partícula y enviar a microscopía.

Resultados y Análisis

3.1. Condiciones de Operación

El método no ha sido muy desarrollado por otros investigadores y en el artículo donde se propone el método no especifican del todo las condiciones ni reactivos a usar, por tanto, en este trabajo, se empezó por determinar las condiciones óptimas de operación para la fabricación de niosomas.

Para el diseño de estos experimentos se utilizó Span 20, debido a que su valor de HLB (8.6) entra en el intervalo que la literatura reporta como favorable a la formación de vesículas. Además se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente para facilitar su manipulación y dispersión en agua destilada.

El primer paso fue hacer una revisión bibliográfica del método para identificar que variables son consideradas más importantes en el procedimiento, una vez hecho esto se fijaron algunas variables (temperatura del baño, concentración de dispersión), y se eligieron las variables a evaluar las cuales fueron: Método de agitado, Tiempo de agitado, Tiempo de burbujeo, Flujo de nitrógeno, Gas y Medio. Cada uno de los experimentos se repitió un total de tres veces ($n=3$).

3.1.1. Método de agitado

Para determinar el tipo de agitación ha utilizar (manual o por medio de un sonicador) se hizo una prueba cualitativa simple. En esta prueba se utilizaron dos tubos de ensayo y en ellos se colocó la misma cantidad de tensoactivo y de agua, uno de ellos fue agitado manualmente, mientras el otro fue puesto en el sonicador.

Debido a que el agitado manual no logra dispersar al completo el tensoactivo, y además es complicado reproducir con la misma fuerza y movimiento al ser agitado, se optó por usar el sonicador para tener un mayor control de la agitación y dispersión de los reactivos.

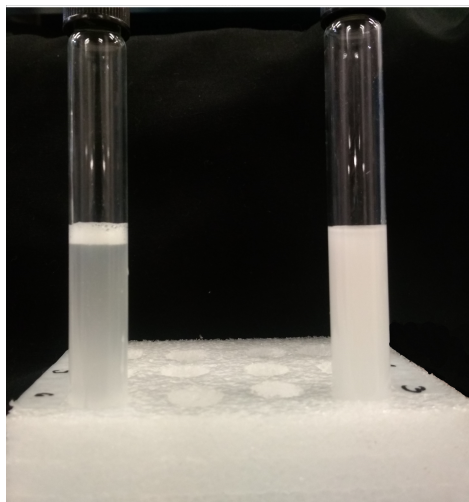


Figura 3.1. Comparación entre los métodos de agitación.

En la figura 3.1 se observa en el lado izquierdo se encuentra el tubo agitado manualmente y en el lado derecho el tubo colocado en el sonicador, a simple vista se observa una diferencia entre las muestras, examinando con mayor detalle se percibe que la muestra agitada manualmente aún contiene restos de tensoactivo.

3.1.2. Tiempo de agitado

Una vez definido el método de agitado, se procedió a buscar el tiempo óptimo de agitación, para ello se hizo una prueba cualitativa, donde se usaron 3 tubos de ensayo colocando en ellos las mismas cantidades de tensoactivo y agua. Los tubos se mantuvieron en agitación por 10, 20 y 30 minutos respectivamente. Se observó que una agitación de 10 minutos no fue suficiente para la dispersión completa del tensoactivo, mientras que en el caso de los tubos en agitación por 20 y 30 minutos no se apreció ningún tipo de diferencia entre ellos, estando el tensoactivo completamente disperso en agua en ambos casos, por lo que se decidió establecer el tiempo de agitado en 20 minutos, para ahorrar recursos y tiempo.

3.1.3. Tiempo de burbujeo

El tiempo de burbujeo fue evaluado para determinar el impacto en el tamaño de partícula, además de la reproducibilidad. En estos experimentos se fijó el flujo de nitrógeno a $2 \frac{L}{min}$, dadas las recomendaciones de Talsma *et. al.*⁵⁹

Tabla 3.1. Evaluación de tiempo de burbujeo.

Tiempo de burbujeo (min)	Tamaño de partícula (nm)	D E
30	311.0	17.7
60	319.9	231.1

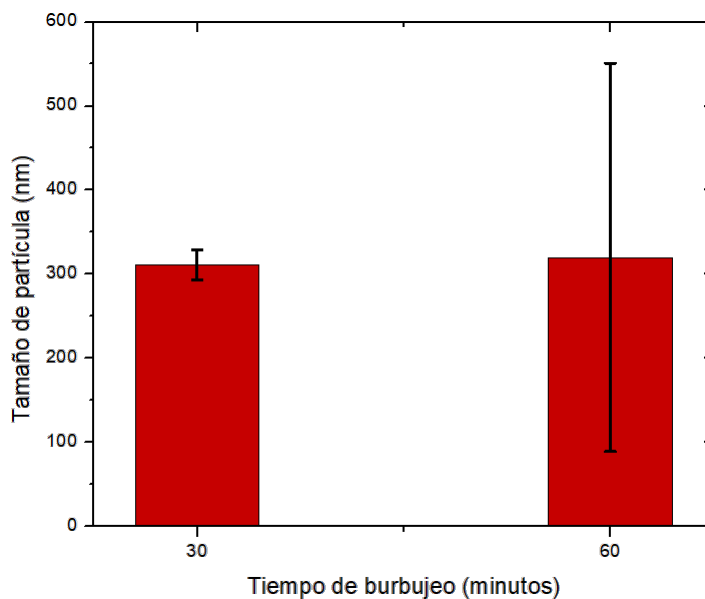


Figura 3.2. Gráfica de evaluación de tiempo de burbujeo.

Como se puede observar en la Tabla 3.1 mientras aumenta el tiempo de burbujeo, aumenta la dispersión de los datos, de la misma forma que el tamaño de partícula. Esto contradice lo reportado en la literatura,⁵⁹ donde se indica que el aumento del tiempo de burbujeo disminuye el tamaño de partícula. La diferencia entre los resultados obtenidos y los publicados, puede deberse al tipo tensoactivo utilizado (el artículo no especifica cuales se emplearon) y la forma como se burbujea el nitrógeno; en los experimentos se usó diferente material para la producción de burbujas. Talsma reporta el uso de un vidrio poroso, que al tener varios orificios de diferentes diámetros, produce una mayor cantidad de burbujas de tamaños variables, generando una mayor cantidad de bicapas, el movimiento mecánico también aumenta, haciendo que la fragmentación de las bicapas también incremente; al ser los fragmentos más pequeños se forman vesículas más pequeñas y, al aumentar el tiempo de burbujeo, los tamaños de los fragmentos se homogenizan, formando vesículas de tamaño más uniforme. Para el presente estudio se utilizó una pipeta de vidrio con diámetro definido, al poseer un solo orificio, se genera menor cantidad de burbujas y movimiento mecánico. Se ha reportado⁶⁷ que en flujos pequeños el diámetro del orificio, por donde se producen las burbujas, tiene una gran importancia en el tamaño de estas. En tiempos cortos y con un sólo diámetro de burbujas, se mejora la formación de bicapas y tamaño de los fragmentos que formaran las vesículas, al aumentar el tiempo, el movimiento mecánico tiene una mayor influencia en la fragmentación de bicapas, y, al no ser tan grande como el generado por el vidrio poroso, no permite un mayor control de la fragmentación y en el tamaño de los fragmentos, generando una mayor dispersión en los tamaños de las vesículas formadas, probablemente si se aumenta el tiempo de burbujeo ($t \rightarrow \infty$) se podría homogenizar el tamaño de fragmentos y disminuir la dispersión de tamaño de vesículas.

Debido a estos resultados para los siguientes experimentos se fijó el tiempo de burbujeo, en 30 minutos.

3.1.4. Flujo de nitrógeno

El flujo de nitrógeno fue evaluado, pues la literatura⁵⁹ no da una explicación de porqué se escogió un flujo de $2 \frac{L}{min}$ y no flujos mayores o menores.

Tabla 3.2. Evaluación de flujo de nitrógeno.

Flujo de nitrógeno (Litro/min)	Tamaño de partícula (nm)	D E
0.5	390.2	55.2
1	295.6	39.0
2	311.0	17.7

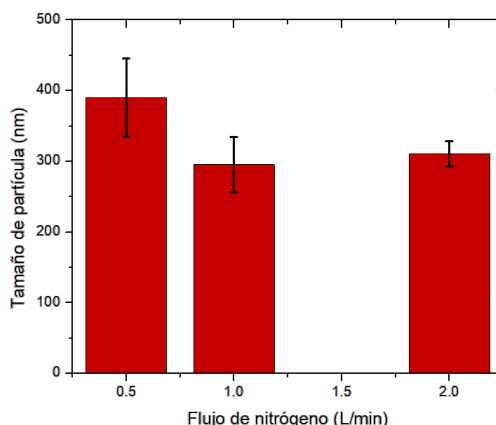


Figura 3.3. Gráfica de evaluación de flujo de nitrógeno.

En la Tabla 3.2 y Gráfica 3.3 se muestran los tamaños de partícula promedio obtenidos de las diferentes muestras, observándose que al aumentar el flujo de nitrógeno, la dispersión de tamaño de partícula disminuye. Al aumentar el flujo de nitrógeno se observó la formación de espuma que migraba hacia el condensador de reflujo, rompiéndose rápidamente y regresando el líquido al matraz.

Se sabe que la formación de burbujas se divide en dos fases, la fase de expansión (donde la burbuja aumenta su volumen mientras la base permanece en el orificio que la produce) y la fase de desprendimiento (la base de la burbuja se separa del orificio), el tamaño final de la burbuja depende de estas dos fases, que a su vez dependen de diferentes propiedades de la solución y de las condiciones de operación.

La literatura^{68,69} reporta que a flujos pequeños (como los utilizados en estos experimentos) el tamaño de la burbuja depende únicamente de la fase de expansión, tomando un papel fundamental la tensión superficial de la disolución, pues a mayor valor de tensión superficial, habrá una mayor contracción en la lámina que forma la burbuja haciéndola más fina y favoreciendo su ruptura. Al formarse la espuma a partir de ciertos flujos de nitrógeno ($2 \frac{L}{min}$) y migrar del seno del líquido, disminuye ligeramente la concentración de tensoactivo en la dispersión, lo que provoca un aumento en la tensión superficial, facilitando la ruptura de las burbujas que se forman en el seno de la dispersión y favoreciendo la formación de bicapas, que con la fragmentación provocada por el movimiento mecánico del burbujeo homogeniza el tamaño de los fragmentos y disminuye la dispersión del tamaño de las vesículas formadas.

Cuando se tienen flujos pequeños que no generan espuma (0.5 y $1 \frac{L}{min}$), la dispersión mantendrá una concentración constante, no habrá un aumento de tensión y las burbujas no se romperán con mayor facilidad, esto causa que exista una menor formación de bicapas y, además, al haber un menor movimiento mecánico, este no logra fragmentar óptimamente las bicapas, generando tamaños de partícula mayores y con una dispersión mayor.

No se reportan los datos de tamaño de partícula de flujos mayores a $2 \frac{L}{min}$ debido a que la formación de espuma es excesiva bajo esta condición, y el condensador de reflujo no es capaz de colapsarla generando pérdidas de material en la muestra.

Con estos resultados se entiende el porque $2 \frac{L}{min}$ es el flujo escogido previamente por Talsma para el desarrollo del método.

3.1.5. Gas

Se evaluaron diferentes gases con el objetivo de comprobar si se tiene alguna repercusión en la formación y tamaño de partícula de las vesículas, además de evaluar una alternativa más económica, como es el aire.

Tabla 3.3. Evaluación de gases.

Tipo de gas	Tamaño de partícula (nm)	D E
Aire	277.3	114.8
Dióxido de Carbono	234.2	24.2
Nitrógeno	311.0	17.7

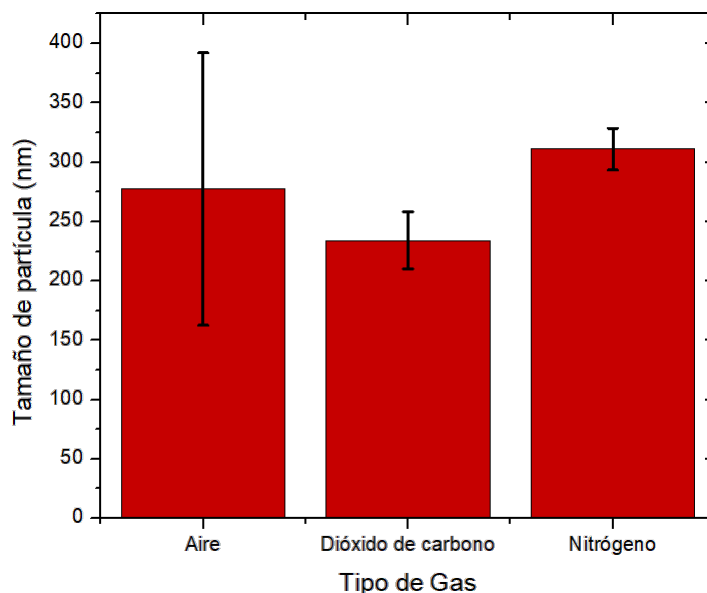


Figura 3.4. Gráfica de evaluación de gases.

Los resultados de tamaño de partícula promedio, mostrados en la Tabla 3.3 y Gráfica 3.4, reflejan que el nitrógeno es el gas con el que se obtiene la menor dispersión en los tamaños de vesículas, mientras que el aire presenta la mayor dispersión de datos. Finalmente el dióxido de carbono presenta el menor tamaño de vesículas formadas.

Los resultados observados con aire se deben a que al tratarse de una mezcla de diferentes gases, presenta diversos comportamientos para producir la burbuja necesaria para la formación de vesículas y esto se ve reflejado en la alta dispersión en tamaño de partícula.

La diferencia de tamaños entre dióxido de carbono y nitrógeno, se debe a la diferencia del comportamiento de estos en la formación de la burbuja, pues se ha informado con anterioridad⁷⁰ que la densidad del gas usado para la producción de burbujas influye en su tamaño, así como en su frecuencia de generación.

A pesar de que el dióxido de carbono es soluble en agua y esto da como resultado la presencia de ácido carbónico, que disminuye el pH de la solución, no se encontraron razones por las que se pudiera afectar la formación de las vesículas, esto debido a que se utilizó un tensoactivo no iónico, es decir, no se modifica su carga al variar el pH, además la tensión superficial (parámetro importante en la formación de burbujas, como ya se mencionó anteriormente) del agua es casi independiente del pH en el intervalo de 1 a 13,⁷¹ por lo que no se vería afectada.

3.1.6. Medio de disolución

Para la dispersión del tensoactivo se evaluaron diferentes medios y así observar si la presencia o ausencia de iones afecta en la formación de vesículas y en su tamaño.

Tabla 3.4. Evaluación de medio de disolución.

Medio de disolución	Tamaño de partícula (nm)	D E
Agua Desionizada	295.1	50.5
Agua Destilada	311.0	17.7
Solución Isotónica	670.0	2.4

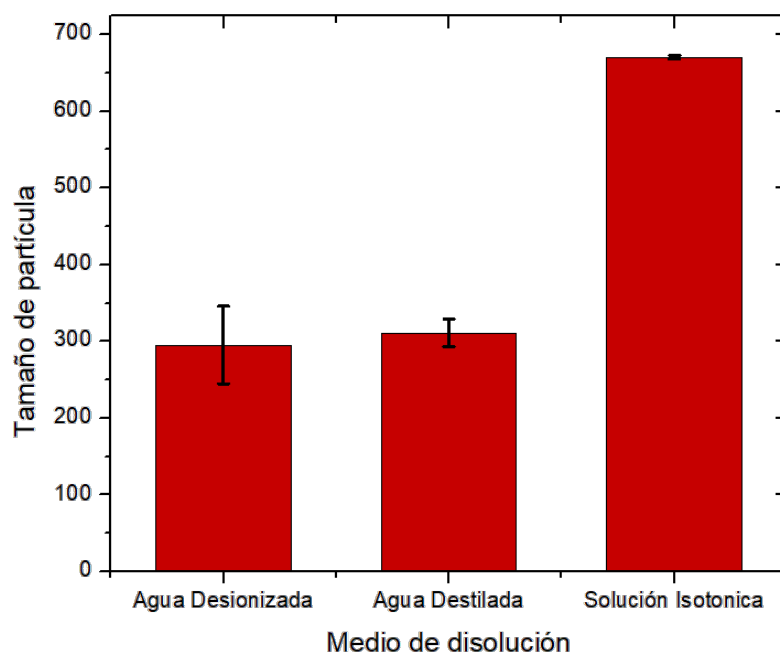


Figura 3.5. Gráfica de evaluación de medio de disolución.

Las muestras en las que se utilizó agua destilada y agua desionizada muestran tamaños de partícula similares. Por otro lado la muestra donde se usó solución isotónica muestra un tamaño de partícula mayor e, incluso a simple vista se observa una diferencia entre esta muestra y las demás (Figura 3.6).

La semejanza entre los tamaños obtenidos, con las muestras donde se utilizó agua destilada y agua desionizada, coincide con lo encontrado en la literatura sobre la similitud entre estos dos medios, pues ambos tienen la misma composición y la única diferencia existente es el proceso de purificación.

La presencia de iones provoca varios fenómenos, entre éstos la no formación de vesículas y la separación de fases (tensoactivo y agua), esto último se debe a la precipitación salina (salting out, en inglés), que se explica a continuación: algunos iones (como lo es Na^+) provocan que la organización de las moléculas de agua mejore⁷², provocando un descenso de entropía en el sistema y como ya se ha visto anteriormente (Sección 1.3.1) la entropía es un elemento importante en la formación de agregados moleculares, al existir una disminución de entropía el proceso de formación no está favorecido.

La separación de fases es debido a la competencia entre los iones disueltos en el medio acuoso y el tensoactivo, al tener una mayor afinidad el agua con el ion, reduce la hidratación de la cabeza polar, esto se refleja macroscópicamente con la separación de fases (tensoactivo y medio acuoso) al disminuir la solubilidad del tensoactivo.

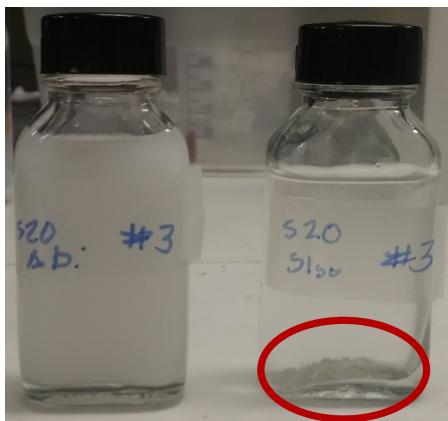


Figura 3.6. Comparación entre las muestras de diferentes medios de disolución.

En el frasco de la izquierda se encuentra la muestra con solución isotónica, en ella se puede observar una separación entre fases (pequeñas perlas en el fondo), mientras que la muestra con agua desionizada se ve como una dispersión homogénea.

3.2. Efecto de las operaciones unitarias

Se determinó el efecto de cada una de las operaciones implicadas en el procedimiento, para ello se midió el tamaño de partícula en cada una de las etapas, además de medir un blanco de tensoactivo en agua sin realizar ningún procedimiento adicional. Las etapas evaluadas fueron: Dispersión usando el sonicador y Burbujeo con nitrógeno.

Tabla 3.5. Evaluación del efecto de cada operación unitaria.

Operación	Tamaño de partícula (nm)	D E
Blanco	846.0	845.1
Solo dispersión	560.3	255.8
Solo burbujeo	493.6	120.9
Metodología completa	311.0	17.7

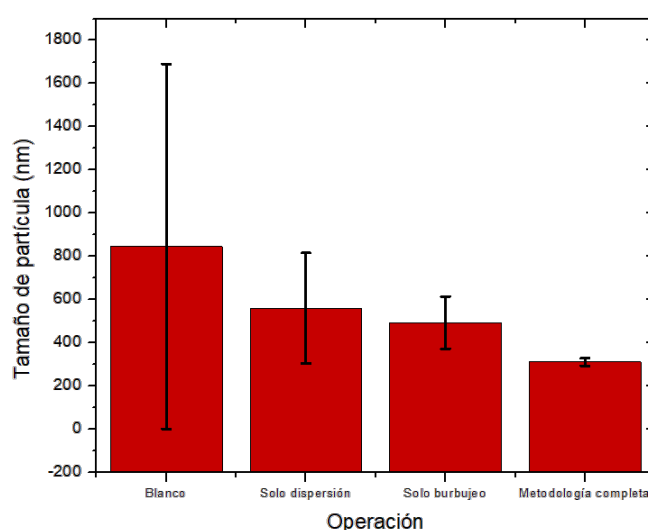


Figura 3.7. Gráfica de evaluación del efecto de cada operación unitaria.

En la tabla 3.5 y gráfica 3.7 se muestran los resultados de tamaños de partícula obtenidos en cada una de las diferentes operaciones, se puede observar que en cada procedimiento disminuye el tamaño de partícula en comparación al blanco, sin embargo, la alta dispersión en los datos hace pensar que estos procedimientos son insuficientes para producir vesículas que puedan ser usadas para un producto comercial, dada la baja reproducibilidad en los datos. Los resultados obtenidos en los experimentos con la metodología completa, muestran un tamaño de partícula similar a lo reportado en la literatura, a pesar de que la desviación estándar entre los diversos artículos se presentan valores menores a los reportados en la Tabla 3.5. Se debe aclarar que las vesículas obtenidas en dichas referencias fueron sometidas a un tratamiento extra conocido como extrucción, este proceso fuerza a las vesículas a pasar por un poro de un tamaño deseado a una alta presión, homogenizando el tamaño, siendo este el reportado con su respectiva desviación. Dado que, en los experimentos realizados en este estudio, no se efectuó el proceso de extrucción y se obtuvo una desviación estándar menor al 10%, en relación al tamaño de partícula promedio, se considera que el método planteado puede llegar a producir niosomas con un nivel aceptable de reproducibilidad en tamaño, para su uso a nivel comercial sin la necesidad de recurrir a la extrucción.

3.3. Presencia de colesterol

Se valoró si la presencia de colesterol y su proporción en la formulación provocaban algún efecto en la formación y tamaño de vesículas, para ello se evaluaron tres formulaciones con diferentes proporciones de colesterol-tensoactivo, las cuales fueron 1 a 10 (1), 3 a 7 (2) y 1 a 1 (3). Las relaciones ya han sido reportadas en la literatura en artículos de formación de niosomas, por lo cual, se eligieron para estos experimentos.

Todas las formulaciones se prepararon con Span 20 como tensoactivo, por las razones mencionadas en el subcapítulo 3.1, los experimentos fueron repetidos tres veces ($n=3$).

Tabla 3.6. Efecto de la cantidad de colesterol.

Relación (CHO:S20)	Tamaño de partícula (nm)	D E
Sin colesterol (0)	311.0	17.7
01:10 (1)	235.9	29.9
03:07 (2)	55.8	1.8
01:01 (3)	11.2	0.2

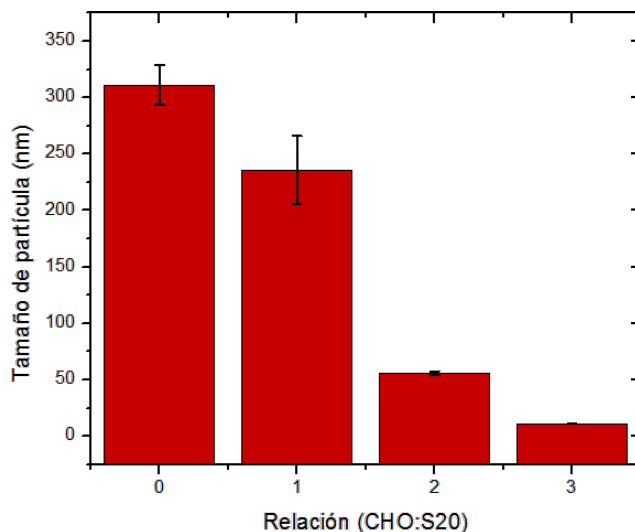


Figura 3.8. Gráfica del efecto de la cantidad de colesterol.

Como se puede observar en la Tabla 3.6 y Gráfica 3.8, mientras mayor sea la cantidad de colesterol en relación con el tensoactivo disminuye el tamaño de partícula de la vesícula formada. Experimentalmente, el aumento en la cantidad de colesterol dificulta la dispersión de los reactivos en el medio acuoso, sobre todo en la última formulación.

El colesterol, además de ser utilizado en la formulación como un estabilizador de membrana^{18,38,73} y modificador de permeabilidad de membrana en concentraciones bajas⁷⁴ (lo que es de gran importancia para la liberación del fármaco que pueda llegar a ser encapsulado), también favorece la formación de vesículas esto al disminuir la temperatura de transición gel-líquido del tensoactivo.

Como ya se mencionó en la sección 1.4.1, para favorecer la formación de niosomas se requiere un aporte de energía al disminuir la temperatura, necesaria para que el tensoactivo cambie de estado sólido al líquido, el aporte de energía necesario será menor y el proceso se llevará a cabo con mayor facilidad. Otro efecto que tiene el colesterol en las vesículas es la modificación de tamaño, en la literatura se ha reportado tanto el aumento⁷⁵ como la disminución de tamaño,^{76,77} ambos efectos se deben a la capacidad que tiene el colesterol de aumentar la rigidez de la membrana bilaminar.

- En el primer caso, las vesículas con menor cantidad de colesterol tienen una menor rigidez que las que contienen un mayor cantidad, al tener menor rigidez muestran una mayor sensibilidad al proceso de dispersión ultrasónica al que son sometidas después, y por ello, presentan un menor tamaño. Con el aumento de la concentración de colesterol, la rigidez de las membranas aumentó mostrando una mayor resistencia a la sonicación y produciendo vesículas de mayor tamaño.
- El segundo caso, que coincide con los resultados presentados en este trabajo, se debe a que las vesículas con menor cantidad de colesterol y, por lo tanto, menor rigidez, tienen una mayor flexibilidad que permite que las bicapas tomen una forma favorecida energéticamente sobre todo en temperaturas altas (como en las que se trabaja en este estudio), lo que resulta en vesículas con mayor tamaño que las vesículas con mayor cantidad de colesterol y menor flexibilidad.

3.4. Estabilidad física

Idealmente, una dispersión estable de niosomas debe exhibir un tamaño de partícula constante y un nivel constante de fármaco atrapado, por lo que las formas más comunes para medir la estabilidad física de los niosomas son con el monitoreo de tamaño a través del tiempo, para observar si los niosomas se agregan en partículas más grandes o, en caso de haber encapsulado algún fármaco o molécula, también se monitorea la eficiencia de encapsulamiento a diferentes tiempos con el objetivo de verificar que no exista un cambio en la estructura de la membrana bilaminar que modifique la liberación del fármaco. En este estudio no se encapsuló ningún fármaco, por lo cual, se monitorea el tamaño de partícula de tres dispersiones niosomales preparadas con Span 20, almacenadas a temperatura ambiente durante los siguientes tiempos: 0, 5, 24, 48 y 72 horas.

Tabla 3.7. Seguimiento del tamaño de partícula a través del tiempo.

Tiempo	0 horas	5 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Tamaño de partícula (nm)	283.6	282.1	272.4	290.6	341.1
D E	24.8	3.4	33.0	12.0	46.1

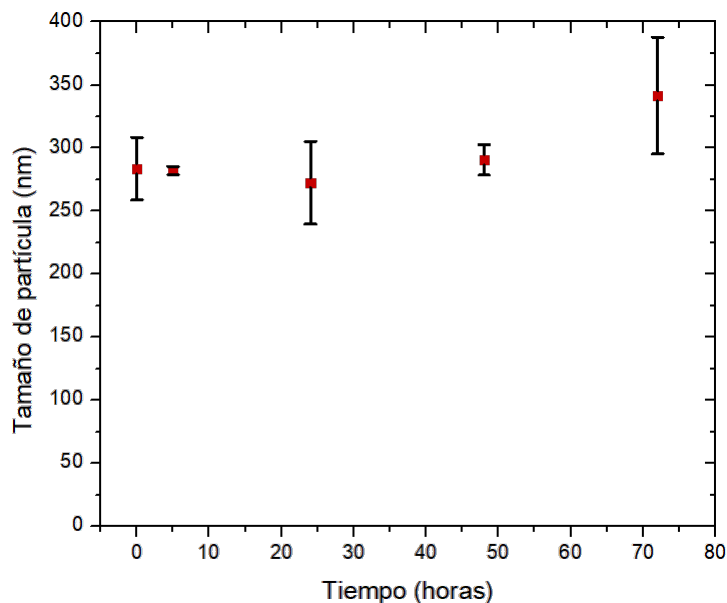


Figura 3.9. Gráfica del seguimiento del tamaño de partícula a través del tiempo.

Como se puede observar en la Tabla 3.7 y en la Gráfica 3.9, existe un crecimiento en el tamaño de partícula conforme pasa el tiempo (alrededor del 20% comparado con el tamaño de la primera medición), esto indica que los niosomas no tienen una gran estabilidad.

En la sección 1.4.4 se mencionaron los factores que afectan la estabilidad de los niosomas, en el caso de las dispersiones preparadas para este experimento, se considera que los principales factores que afectaron su estabilidad son la temperatura de almacenamiento y el tamaño de partícula.

El tamaño original de la dispersión tiene un efecto sobre la estabilidad del sistema, esto coincide con lo que se sabe de la termodinámica de formación, pues los niosomas de menor tamaño requieren mayor aporte de energía para formarse, contienen energía en exceso y, por lo tanto, una inestabilidad mayor.

Por otro lado, otro factor que contribuyó a la inestabilidad de los niosomas formados es la temperatura de almacenamiento, pues a menor temperatura la rigidez de la membrana bilaminar es mayor, haciendo que se mantenga con mayor facilidad el tamaño de partícula. Por otro lado, las temperaturas altas provocan la deshidratación del grupo hidrófilo, ocasionando un aumento en el tamaño de partícula en las vesículas, llegando incluso a una eventual separación de fases.

Sin embargo, se debe aclarar que las condiciones del presente estudio fueron las más exigentes, pues las dispersiones niosomales no contenían ningún aditivo que sirviera como estabilizador (colesterol o inductor de carga). Además, se ha reportado que las temperaturas óptimas para mejorar la estabilidad de las dispersiones se encuentran en el intervalo de 4 y -4°C .

3.5. Efecto de la estructura del tensoactivo

Como ya se mencionó, el método no ha sido muy desarrollado por otros investigadores, y debido a que representa una alternativa llamativa para la industria farmacéutica y cosmética, se evaluó el efecto de la estructura del tensoactivo, para ello se utilizaron diferentes series de tensoactivos como Span y Tween, pues son comúnmente usados en la producción de niosomas.

Todos los experimentos fueron repetidos un total de tres veces ($n=3$). Las variables a evaluar fueron: Longitud de la cadena hidrófoba, Número de cadenas hidrófobas, Saturación de cadena hidrófoba, Efecto de cabeza hidrófila.

3.5.1. Longitud de cadena hidrofóbica

Para determinar el efecto de la longitud de cadena hidrófoba se utilizaron como tensoactivos, Span 20 (cadena hidrófoba de 12 carbonos) y Span 60 (cadena hidrófoba de 18 carbonos).

Tabla 3.8. Efecto de longitud de cadena hidrofóbica

Tensoactivo	Tamaño de partícula (nm)	D E
Span 20	311.0	17.7
Span 60	379.8	11.4

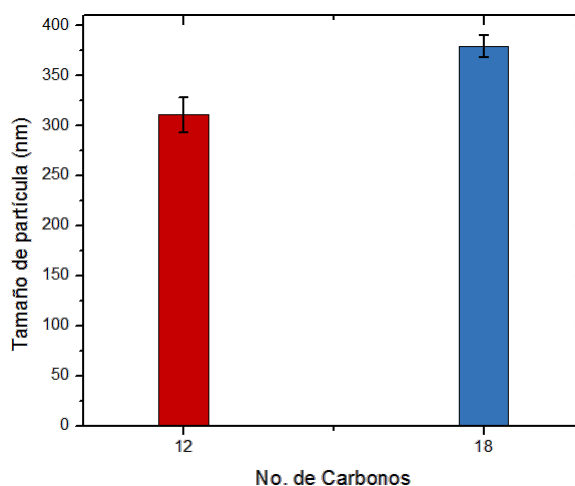


Figura 3.10. Gráfica de efecto de longitud de cadena hidrofóbica.

Como se puede observar en la tabla 3.8 y en la gráfica 3.10, los valores de tamaño de partícula son mayores para el caso del tensoactivo con una cadena de mayor tamaño. Al comparar los resultados con los reportados en la literatura,⁷⁸⁻⁸⁰ se encontraron estudios que concuerdan en el aumento de tamaño de vesícula al tener el tensoactivo una cadena más larga y también, se encontraron resultados que reportan que un valor mayor de HLB del tensoactivo provoca un mayor tamaño en las vesículas. Es decir, el Span 20 debería formar vesículas de mayor tamaño. Sin embargo, se debe aclarar que en todos los reportes, la formulación es diferente a la empleada en el actual estudio, pues en los resultados obtenidos de literatura se agregan aditivos como el

colesterol (cuyo efecto en el tamaño de partícula ya se explicó en la sección 3.3) o fármacos, los cuales pueden afectar la estructura de la vesícula.

Los resultados de este estudio se pueden explicar con la misma estructura de los tensoactivos, dado que ambos tienen el mismo grupo hidrófilo y lo único que varía es la longitud de la cadena, se puede proponer que ambos tensoactivos se acomodan de la misma manera para formar la vesícula, y al ser más larga la cadena del Span 60, la bicapa lipídica aumenta su grosor, provocando que el tamaño de la vesícula sea mayor.

3.5.2. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas

El efecto del número de cadenas hidrofóbicas se evaluó comparando dos tensoactivos, Span 60 (una sola cadena hidrofóbica de 18 carbonos) y Span 65 (tres cadenas hidrofóbicas de 18 carbonos). Este efecto también se observa en la comparación entre Span 80 (una cadena hidrofóbica insaturada de 18 carbonos) y Span 85 (tres cadenas hidrofóbicas insaturadas de 18 carbonos).

Tabla 3.9. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas (1).

Tensoactivo	Tamaño de partícula (nm)	D E
Span 60	379.8	11.4
Span 65	66.6	1.6

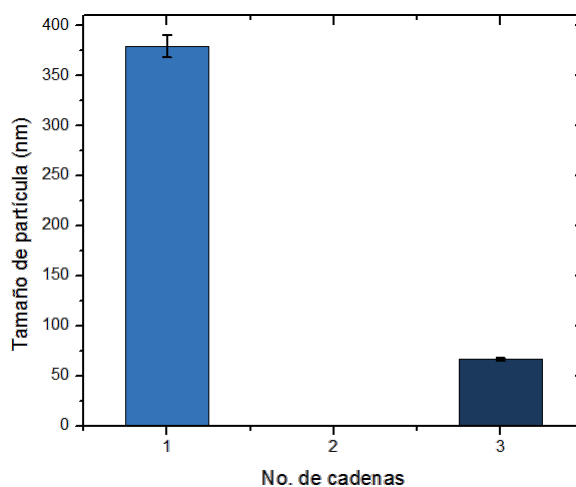


Figura 3.11. Gráfica de efecto de número de cadenas hidrofóbicas (1).

Los resultados mostrados en la tabla 3.9 y gráfica 3.11 indican que al aumentar el número de cadenas hidrofóbicas disminuye el tamaño de las vesículas formadas. La disminución es debido al aumento de hidrofobicidad provocada por la mayor cantidad de cadenas hidrofóbicas. Las vesículas formadas por moléculas con un mayor valor de HLB permiten una mayor absorción de moléculas de agua, lo que aumenta el diámetro de las vesículas^{74,78}.

Tabla 3.10. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas (2).

Tensoactivo	Tamaño de partícula (nm)	D E
Span 80	41.1	12.8
Span 85	71.0	29.8

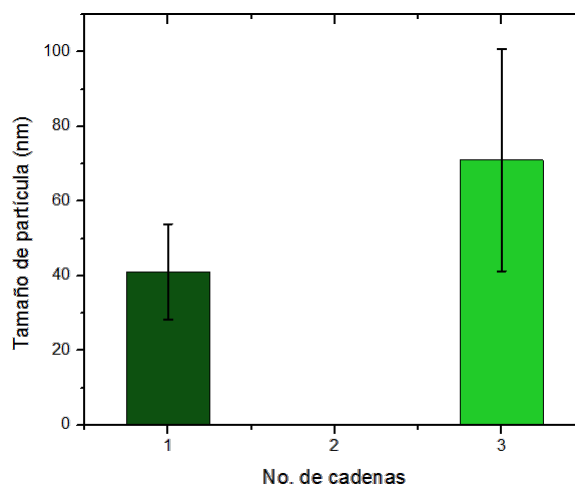


Figura 3.12. Gráfica de efecto de número de cadenas hidrofóbicas (2).

En el caso de la comparación entre Span 80 y Span 85, los valores mostrados en la tabla 3.10 no corresponden con los reportados en el experimento anterior, sin embargo, en el caso de estos tensoactivos se presentaron muchas dificultades técnicas al momento de realizar los experimentos, y esto se puede observar en los altos valores de desviación estándar con respecto al tamaño de partícula promedio (entre 30 y 40 %), por esta razón estos resultados no se consideran representativos para este análisis.

3.5.3. Efecto de saturación de cadena hidrofóbica

Para este estudio se compararon los resultados de tamaño de partícula de las vesículas formadas por los tensoactivos Span 60 (cadena hidrófoba saturada de 18 carbonos) y Span 80 (cadena hidrófoba insaturada de 18 carbonos).

Tabla 3.11. Efecto de saturación de cadena hidrofóbica.

Tensoactivo	Tamaño de partícula (nm)	D E
Span 60	379.8	11.4
Span 80	41.1	12.8

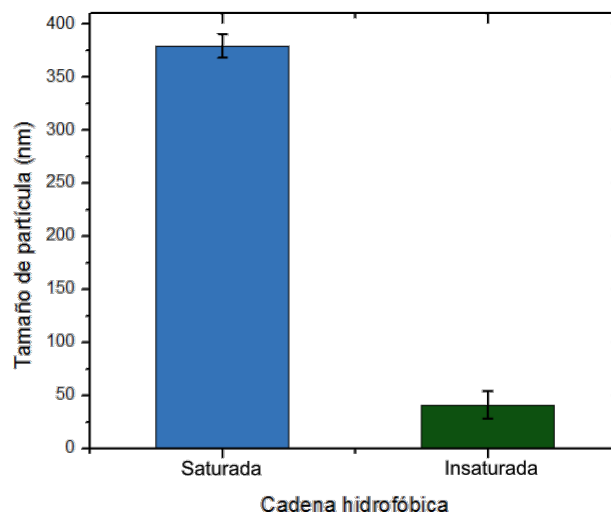


Figura 3.13. Gráfica de efecto de saturación de cadena hidrofóbica.

Como se mencionó anteriormente, en el caso del Span 80, este tensoactivo no se considera viable para la producción de vesículas por este método, debido a los problemas técnicos que se tuvieron durante los experimentos, causados por la falta de solubilidad del tensoactivo en agua. Esto probablemente causó que en las pruebas no se tuviera la misma concentración de tensoactivo en disolución, provocando una mayor variación en el tamaño de vesículas formadas (si es que estas se llegaron a formar), lo que se reflejó en la desviación estándar.

3.5.4. Efecto de la cabeza hidrofílica

Para poder observar el efecto de la cabeza hidrofílica, se compararon dos tensoactivos con la misma cola hidrofoba. Se escogió Span 60 y Tween 60, donde ambos tienen una cadena hidrofoba saturada de 18 carbonos, y solo se diferencian en la etoxilación de la cabeza hidrofílica, en el Tween 60.

Al realizar las pruebas con Tween 60, se pudo observar que con este método no es posible producir vesículas con este tensoactivo, debido a su alta hidrofilia, el tensoactivo produce mucha espuma, este excedente es proyectado fuera del contenedor causando pérdidas de material y variación en la concentración del tensoactivo en disolución.

Se efectuaron pruebas adicionales con Tween 40 para observar si tenía el mismo comportamiento que el Tween 60, lo cual sucedió, por lo que se confirmó que el método de burbujeo no es el adecuado para hacer vesículas con este tipo de tensoactivos debido al exceso de espuma generado.

3.6. Microscopías

En esta sección se muestran las microscopías electrónicas de los niosomas formados con los diferentes tensoactivos y mezclas, en algunos casos, los niosomas no conservaron del todo su característica forma esférica debido al tratamiento de la muestra para su observación.

Span 20

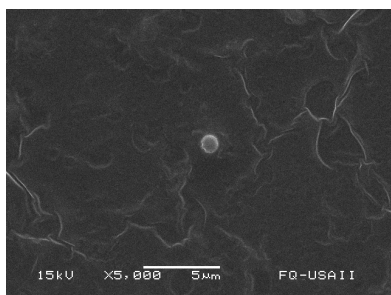


Figura 3.14. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (1).

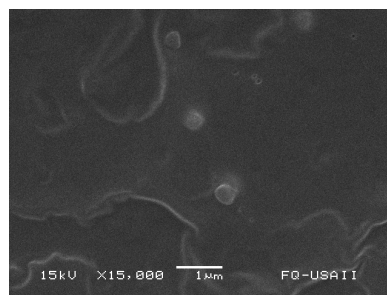


Figura 3.15. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (2).

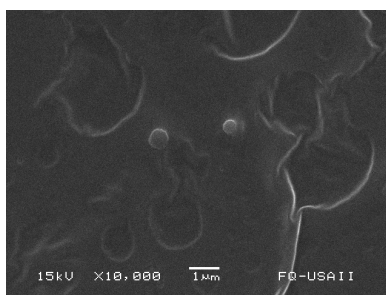


Figura 3.16. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (3).

Span 20 + Colesterol

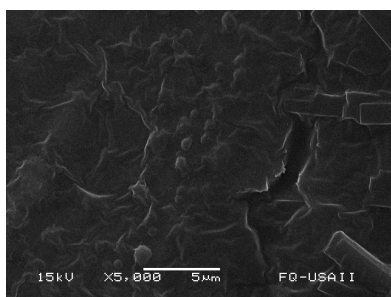


Figura 3.17. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 + Colesterol (1).

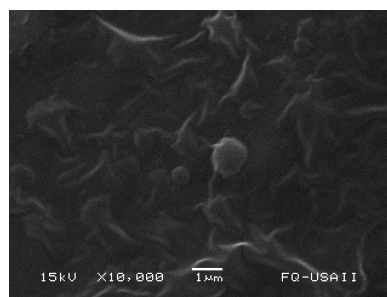


Figura 3.18. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 + Colesterol (2).

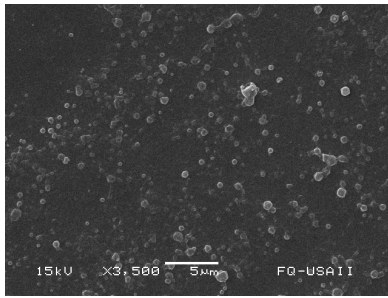
Span 60

Figura 3.19. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (1).

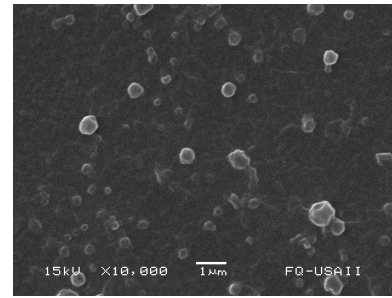


Figura 3.20. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (2).

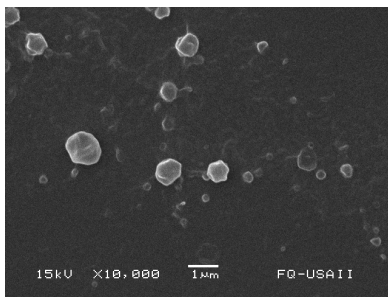


Figura 3.21. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (3).

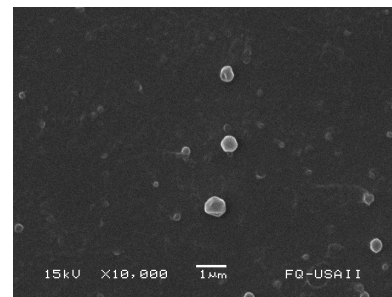


Figura 3.22. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (4).

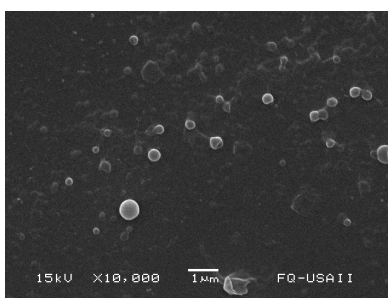
Span 60 + Colesterol

Figura 3.23. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (1).

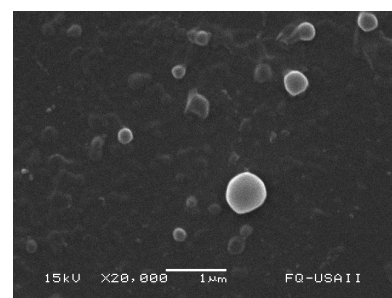


Figura 3.24. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (2).

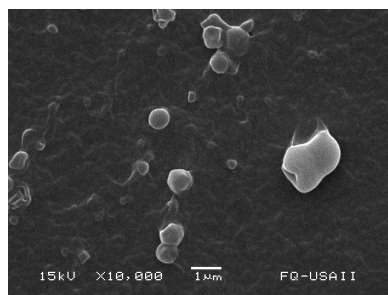


Figura 3.25. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (3).

Span 65

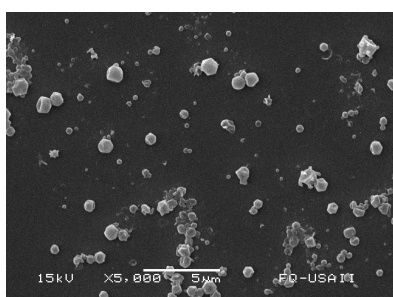


Figura 3.26. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (1).

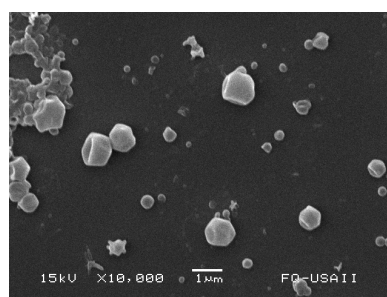


Figura 3.27. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (2).

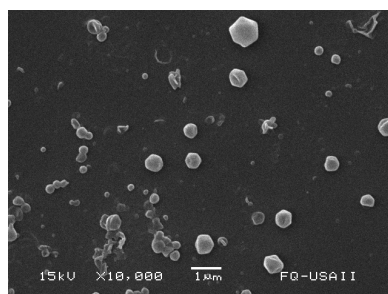


Figura 3.28. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (3).

3.7. Tensión Superficial

Para poder comprender de mejor forma el proceso de ensamble de los niosomas se midió la tensión superficial a varios de los tensoactivos utilizados y, en algunos casos, se recurrió a tratamiento de datos publicados previamente por Prasun Bandyopadhyay y N.S. Neeta.⁸¹

Para el cálculo de los parámetros superficiales de nuestro interés, se graficaron los datos obtenidos de Tensión Superficial en función del logaritmo natural de la concentración del tensoactivo (en fracción mol); la Presión Superficial en función del logaritmo natural de la concentración del tensoactivo y la Presión Superficial en función de la concentración del tensoactivo. Para obtener los datos de presión superficial se restó el valor de tensión superficial del solvente puro (agua desionizada) a los valores de tensión superficial de cada dilución.

La determinación del área mínima que ocupa el tensoactivo en superficie se efectuó aplicando regresión lineal (Ecuación 3.1) a los datos de presión superficial y el logaritmo natural de la concentración, de la zona lineal del gráfico,⁸ de esta forma se puede calcular la concentración máxima de superficie, dato requerido para el cálculo del parámetro de interés.

$$\pi = \pi_{m\acute{a}x} - \Gamma_{m\acute{a}x}RT \ln x_{cmc} + \Gamma_{m\acute{a}x}RT \ln x \quad (3.1)$$

Como se observa en la ecuación 3.1, la pendiente de la recta corresponde a $\Gamma_{m\acute{a}x}RT$, por lo que, para obtener la concentración máxima de tensoactivo en la superficie se debe dividir el valor obtenido de la pendiente entre RT , siendo R la constante de los gases ideales ($\frac{J}{mol \cdot K}$) y T la temperatura absoluta (K).

Una vez obtenido el valor de concentración máxima de tensoactivo en la superficie ($\Gamma_{m\acute{a}x}$), se puede obtener el área mínima que ocupa el tensoactivo en interfase mediante la siguiente ecuación:

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x}} \quad (3.2)$$

A continuación, se calcula la concentración micelar crítica (cmc), en este caso de la ecuación 3.1, se observa que el término correspondiente a la ordenada al origen contiene el término x_{cmc} , que puede ser despejado.

$$\ln x_{cmc} = \frac{\pi_{m\acute{a}x} - \text{Ordenada al origen}}{\Gamma_{m\acute{a}x}RT} \quad (3.3)$$

Una vez obtenido el valor de $\ln x_{cmc}$ se puede calcular la energía de micelización con la siguiente ecuación:

$$\Delta_{mic} = RT \ln x_{cmc} \quad (3.4)$$

Para el cálculo de la energía estándar de adsorción se aplicó un tratamiento no lineal a la gráfica de Presión Superficial en función de la concentración del tensoactivo, usando la Ecuación de Estado Superficial de Langmuir⁶ (Ecuación 3.5), para tener una mayor claridad en los resultados.

$$\pi = \Gamma_{m\acute{a}x}RT \ln(1 + \beta x) \quad (3.5)$$

Cuando la dilución se encuentra muy diluida se puede calcular la energía estándar de adsorción con la siguiente ecuación:

$$-\Delta G_{ads}^0 = RT \ln(\Gamma_{m\acute{a}x} RT) + RT \ln(\beta) \quad (3.6)$$

Para cada uno de los diferentes tensoactivos y sus respectivas mezclas con colesterol (caso de Span 20 y Span 60), a continuación se presentan las gráficas de Tension Superficial en funcion del logaritmo natural de la concentracion del tensoactivo (en fraccion mol), Presion Superficial en funcion del logaritmo natural de la concentracion del tensoactivo y Presion Superficial en funcion de la concentracion del tensoactivo. Además se mostrará el ejemplo de cálculo para cada uno de los parámetros con los datos obtenidos con Span 20.

3.7.1. Span 20

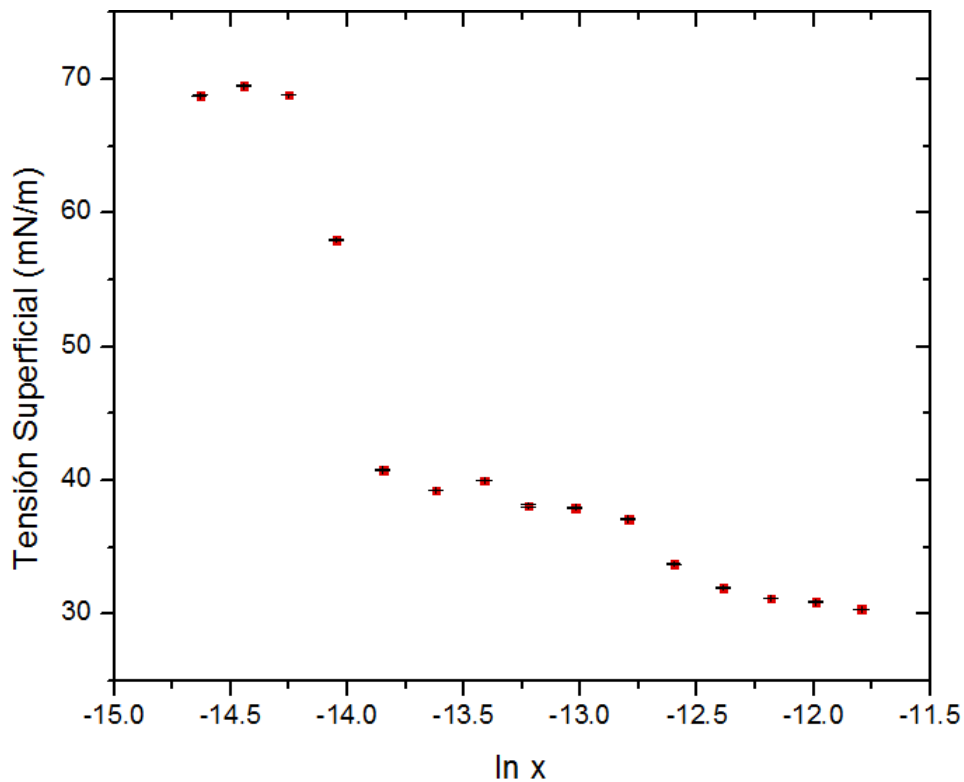


Figura 3.29. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 20.

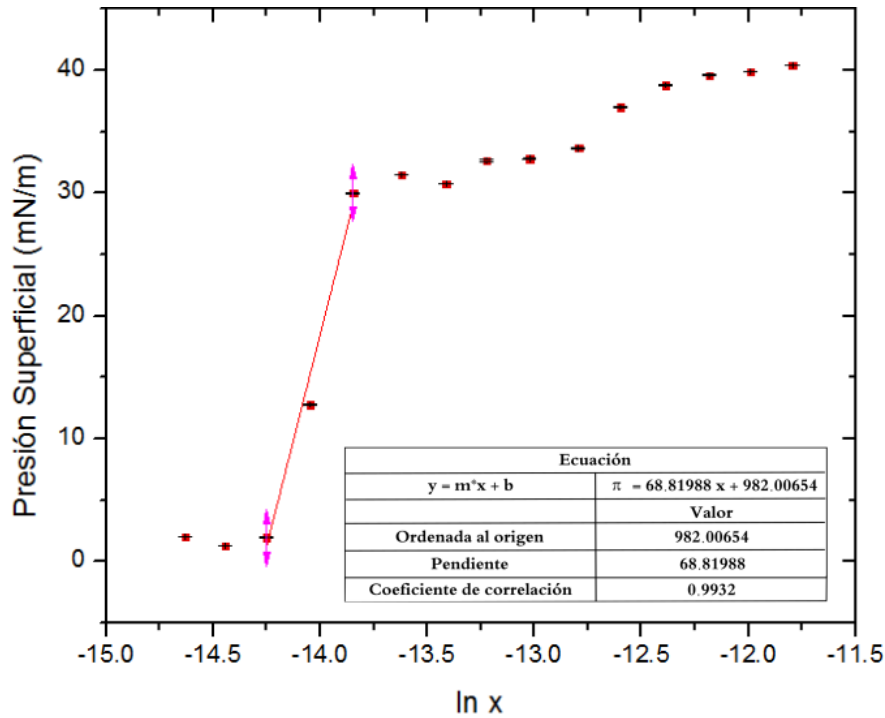


Figura 3.30. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 20.

Del tratamiento lineal hecho a la gráfica 3.30, se toma el valor de la pendiente para poder calcular los parámetros necesarios. Primero se calculó la concentración máxima de tensoactivo en la superficie:

$$\Gamma_{m\acute{a}x} = \frac{Pendiente}{RT} \quad (3.7)$$

$$\Gamma_{m\acute{a}x} = \frac{68.82 \frac{mN}{m} * \frac{1N}{1000mN}}{8.314472 \frac{J}{mol \cdot K} * 298.16K} = 0.0000277607 \frac{mol}{m^2} \quad (3.8)$$

Ahora se muestran los cálculos requeridos para obtener el Área mínima que ocupa el tensoactivo en la superficie por mol:

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x}} \quad (3.9)$$

$$A_{min} = \frac{1}{0.0000277607 \frac{mol}{m^2}} \quad (3.10)$$

Para que el resultado se obtenga en unidades mas convenientes para su manejo, se utiliza el número de Avogadro, obteniendo la siguiente relación:

$$A_{min} = \frac{1}{\Gamma_{m\acute{a}x} * NA} * \frac{1x10^{18} nm^2}{1m^2} \quad (3.11)$$

Donde NA es el Número de Avogadro, $6.022 \times 10^{23} \frac{1}{mol}$. Por lo tanto el Área mínima calculada en nanómetros cuadrados [nm^2] es de:

$$A_{min} = \frac{1}{0.0000277607 \frac{mol}{m^2} * 6.022x10^{23} \frac{1}{mol}} * \frac{1x10^{18} nm^2}{1m^2} = 0.05981 nm^2 \quad (3.12)$$

También se obtuvo el Área mínima que ocupa el tensoactivo en la superficie en amstrongs cuadrados [Å^2]:

$$A_{min} = \frac{1}{0.0000277607 \frac{mol}{m^2} * 6.022x10^{23} \frac{1}{mol}} * \frac{1x10^{20} \text{Å}^2}{1m^2} = 5.98 \text{Å}^2 \quad (3.13)$$

Para calcular la energía de micelización primero se debe conocer el valor de la concentración micelar crítica, para ello del tratamiento lineal hecho en la gráfica 3.30, se toma el valor de la ordenada al origen y se despeja el valor de $\ln x_{cmc}$.

$$Ordenada \text{ al origen} = \pi_{m\acute{a}x} - \Gamma_{m\acute{a}x} RT \ln x_{cmc} \quad (3.14)$$

$$\frac{\pi_{m\acute{a}x} - Ordenada \text{ al origen}}{\Gamma_{m\acute{a}x} RT} = \ln x_{cmc} \quad (3.15)$$

$$\frac{30.75 \frac{mN}{m} - 982.01 \frac{mN}{m}}{0.0000277607 \frac{mol}{m^2} * 8314.472 \frac{mJ}{mol * K} * 298.16K} = -13.8224 \quad (3.16)$$

Cuando ya se conoce el valor de $\ln x_{cmc}$ se calcula la energía de micelización con la siguiente ecuación

$$\Delta G_{mic} = RT \ln x_{cmc} \quad (3.17)$$

$$8.314472 \frac{J}{mol * K} * 298.16K * -13.8224 = -34266.4112 \frac{J}{mol} \quad (3.18)$$

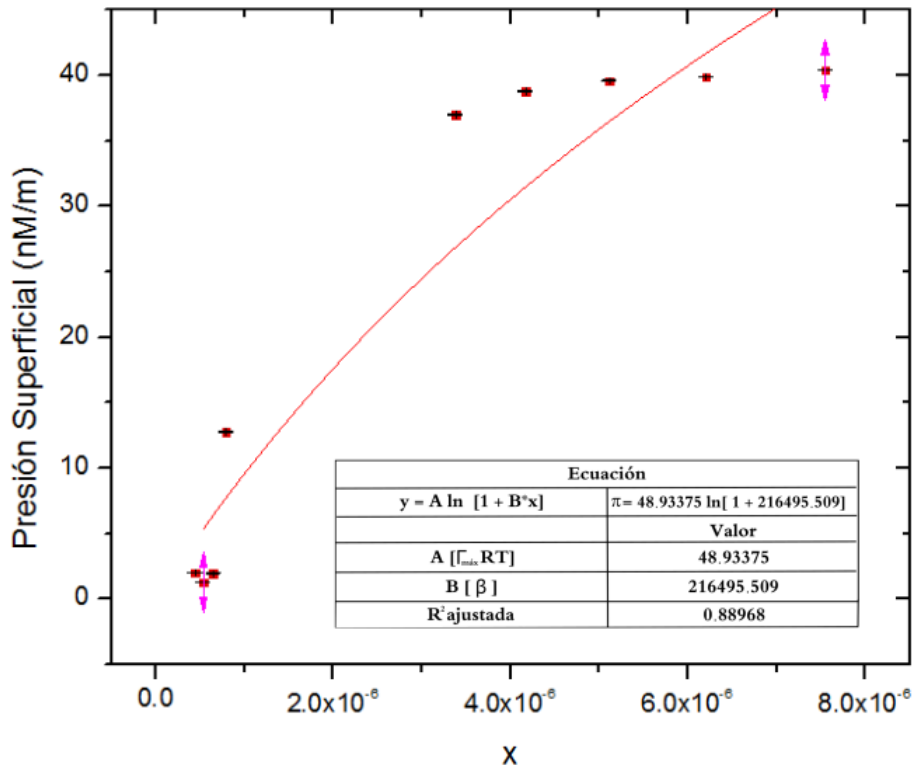


Figura 3.31. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 20.

Para el cálculo de la energía estándar de adsorción se procede a hacer el cálculo que se muestra en la ecuación 3.6, la cual se puede reacomodar de la siguiente manera:

$$-\Delta G_{ads}^0 = RT \ln(\Gamma_{m\acute{a}x} RT * \beta) \tag{3.19}$$

$$8.314472 \frac{J}{mol * K} * 298.16K * \ln(48.9338 * 216495.51) = 40100.4845 \frac{J}{mol} \tag{3.20}$$

3.7.2. Span 20 + Colesterol

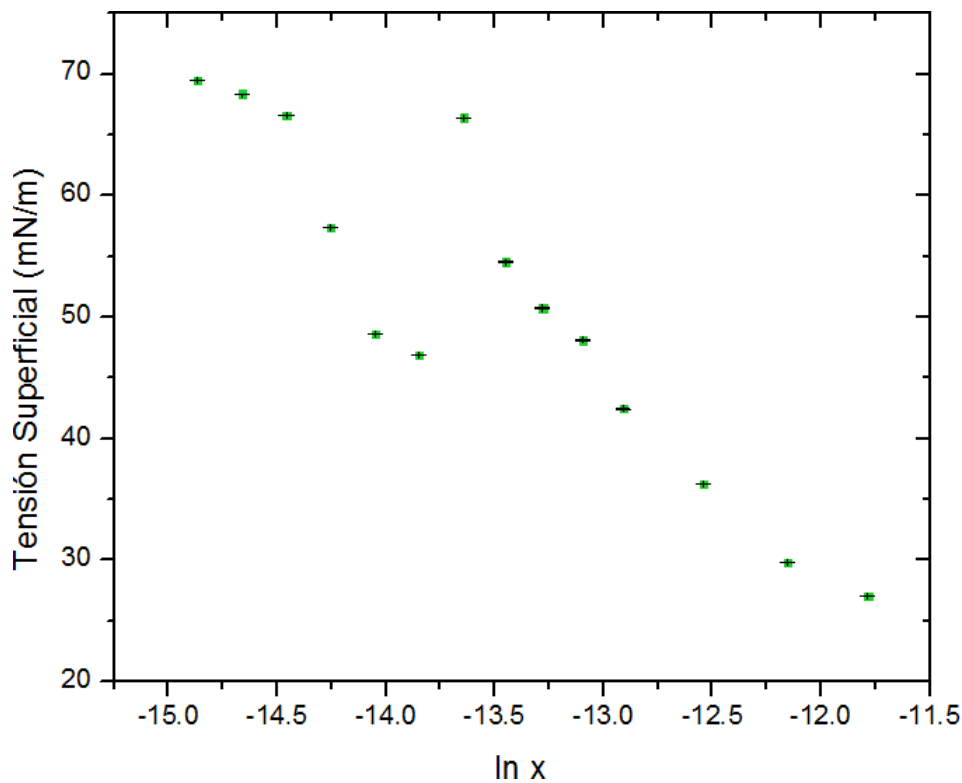


Figura 3.32. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 20 + Colesterol

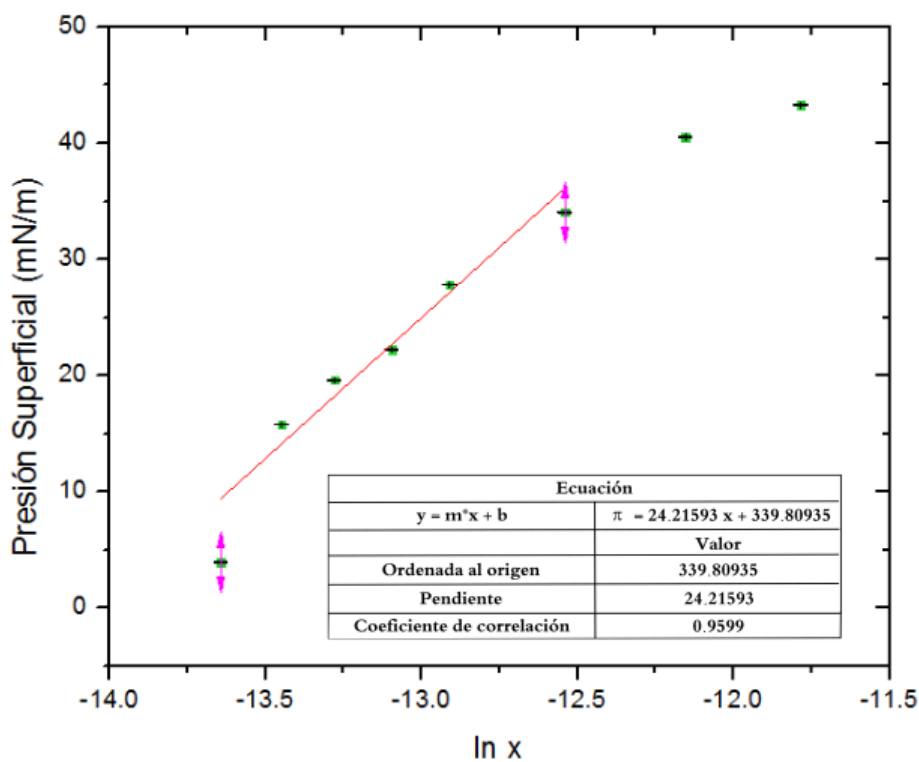


Figura 3.33. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 20 + Colesterol.

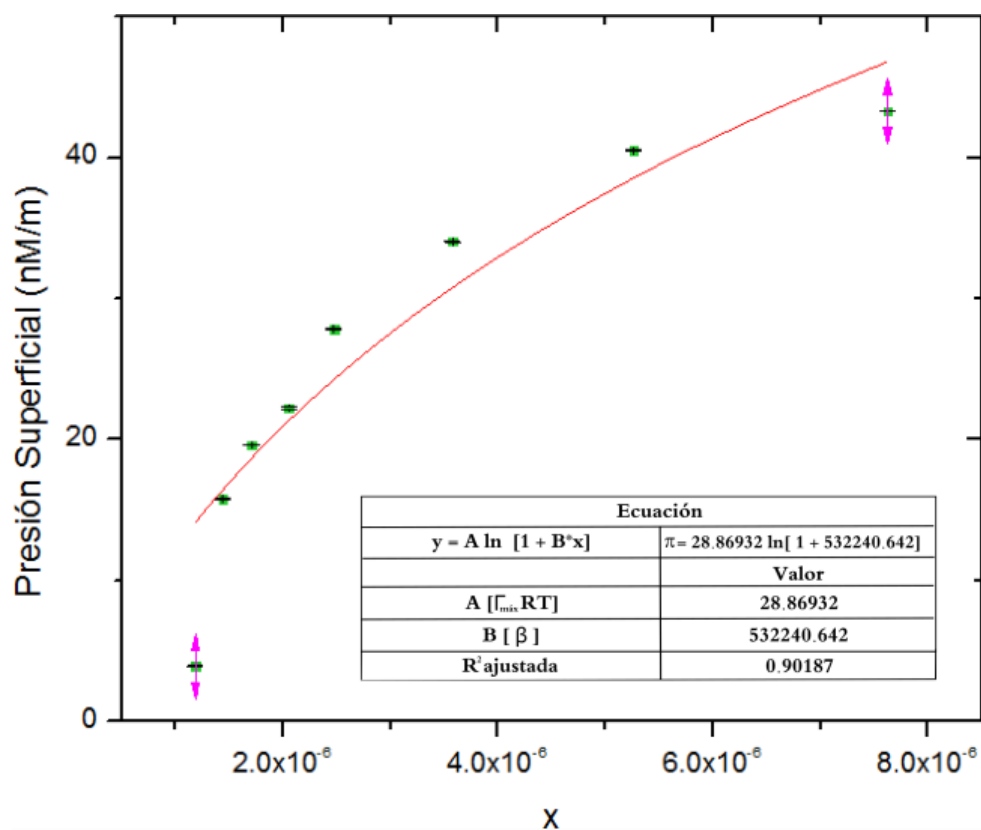


Figura 3.34. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 20 + Colesterol.

Tabla 3.12. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 20 con colesterol en agua.

Parámetro		
Área mínima	0.17003 nm ²	17.003 Å ²
Energía estándar de adsorción	41022.287 $\frac{J}{mol}$	41.02 $\frac{kJ}{mol}$
Energía de micelización	31308.029 $\frac{J}{mol}$	31.31 $\frac{kJ}{mol}$

3.7.3. Span 60

En el caso de este tensoactivo, las graficas fueron hechas a partir de datos reportados⁸¹.

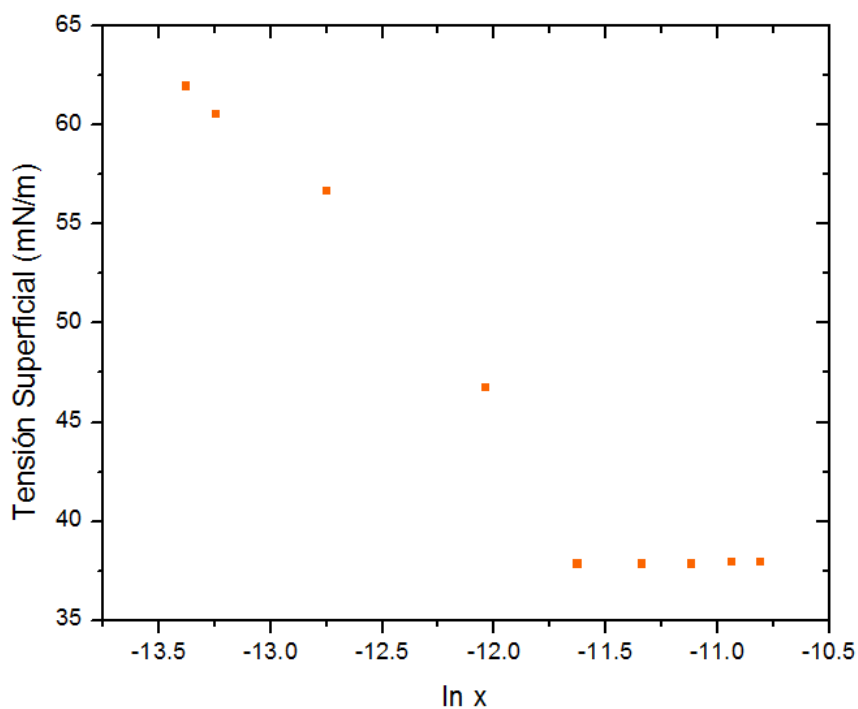


Figura 3.35. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 60.

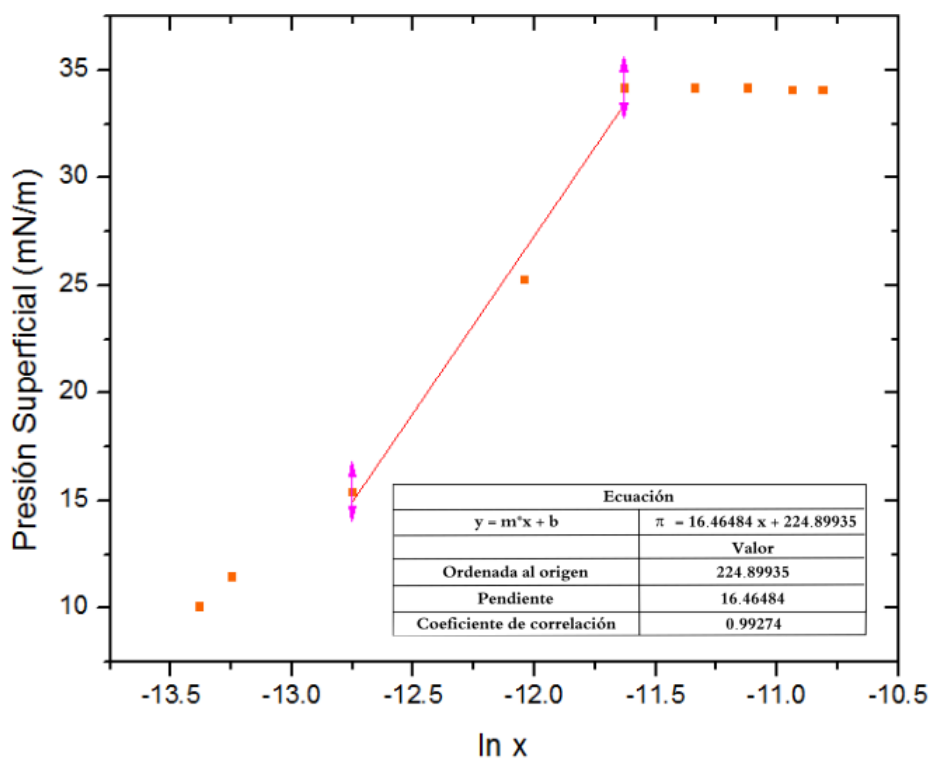


Figura 3.36. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 60.

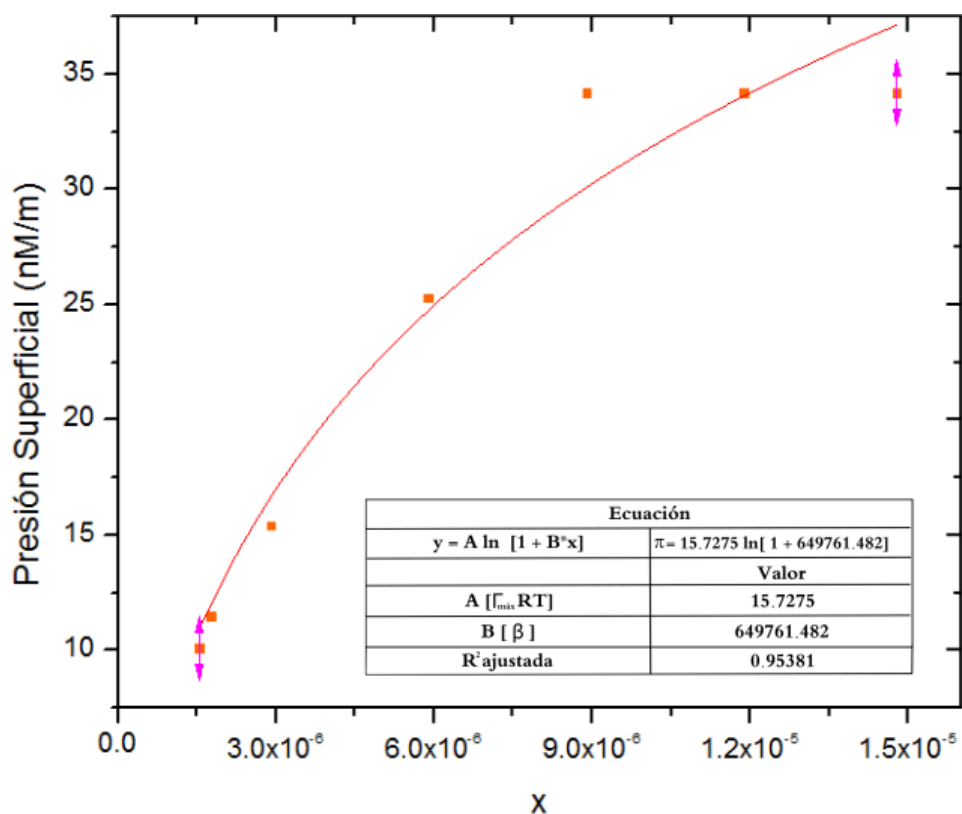


Figura 3.37. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 60.

Tabla 3.13. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 60 en agua.

Parámetro		
Área mínima	0.25009 nm ²	25.009 Å ²
Energía estándar de adsorción	40011.187 $\frac{J}{mol}$	40.01 $\frac{kJ}{mol}$
Energía de micelización	21920.624 $\frac{J}{mol}$	21.92 $\frac{kJ}{mol}$

3.7.4. Span 60 + Colesterol

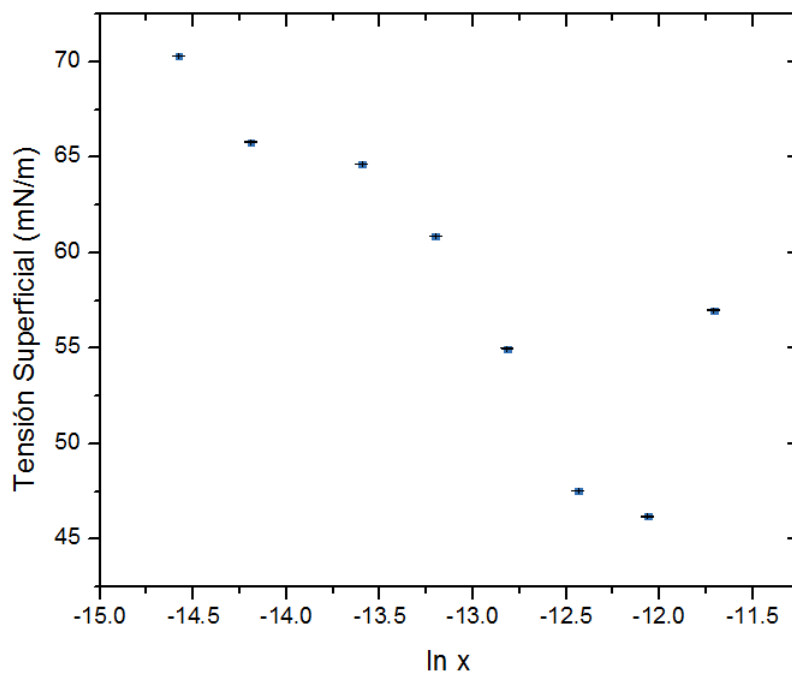


Figura 3.38. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 60 + Colesterol.

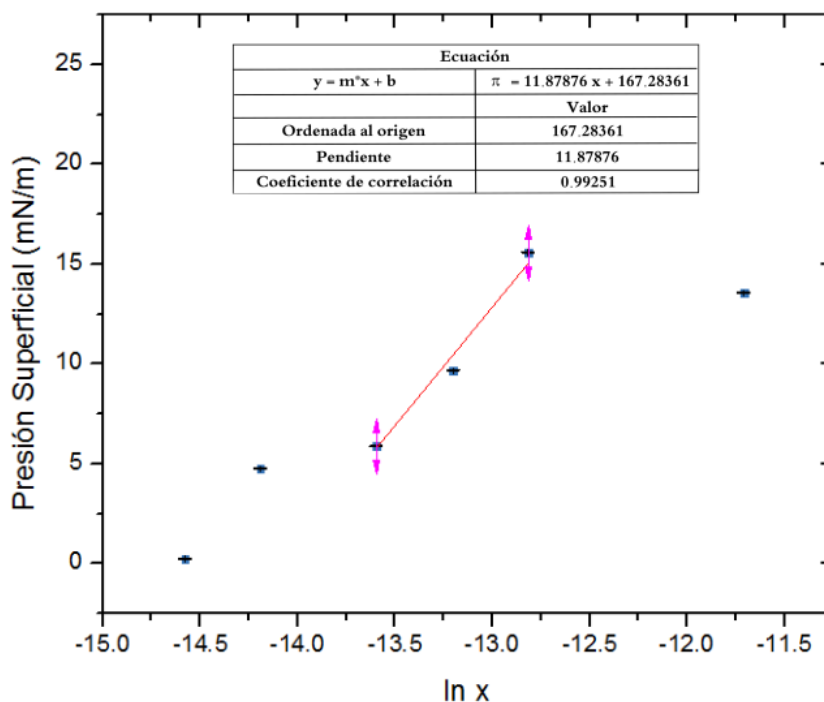


Figura 3.39. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 60 + Colesterol.

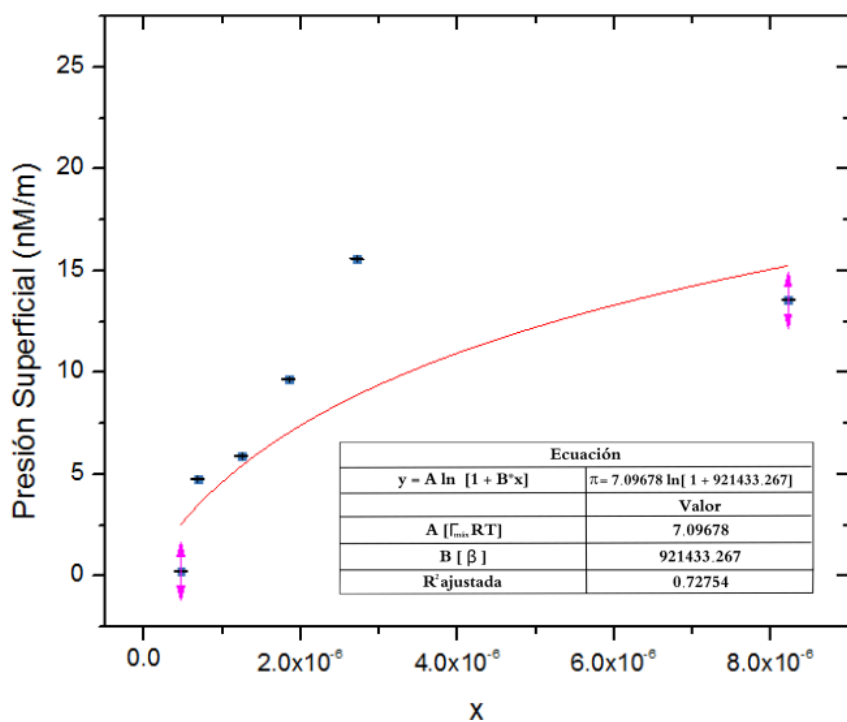


Figura 3.40. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 60 + Colesterol.

Tabla 3.14. Parámetros calculados para la mezcla de Span 60 con colesterol en agua.

Parámetro		
Área mínima	0.34652 nm ²	34.652 Å ²
Energía estándar de adsorción	38904.431 $\frac{J}{mol}$	38.9 $\frac{kJ}{mol}$
Energía de micelización	24598.743 $\frac{J}{mol}$	24.6 $\frac{kJ}{mol}$

3.7.5. Span 65

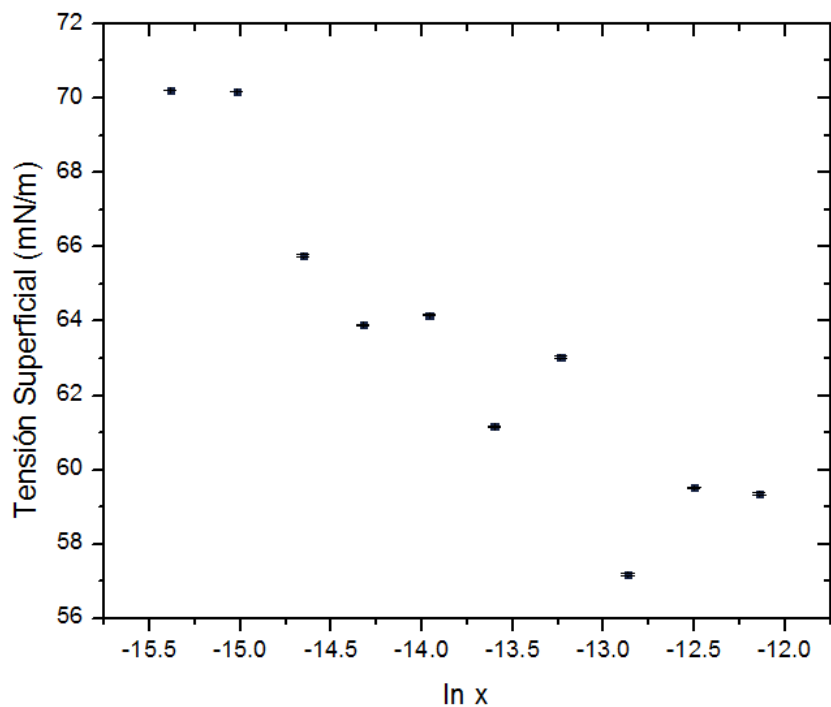


Figura 3.41. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 65.

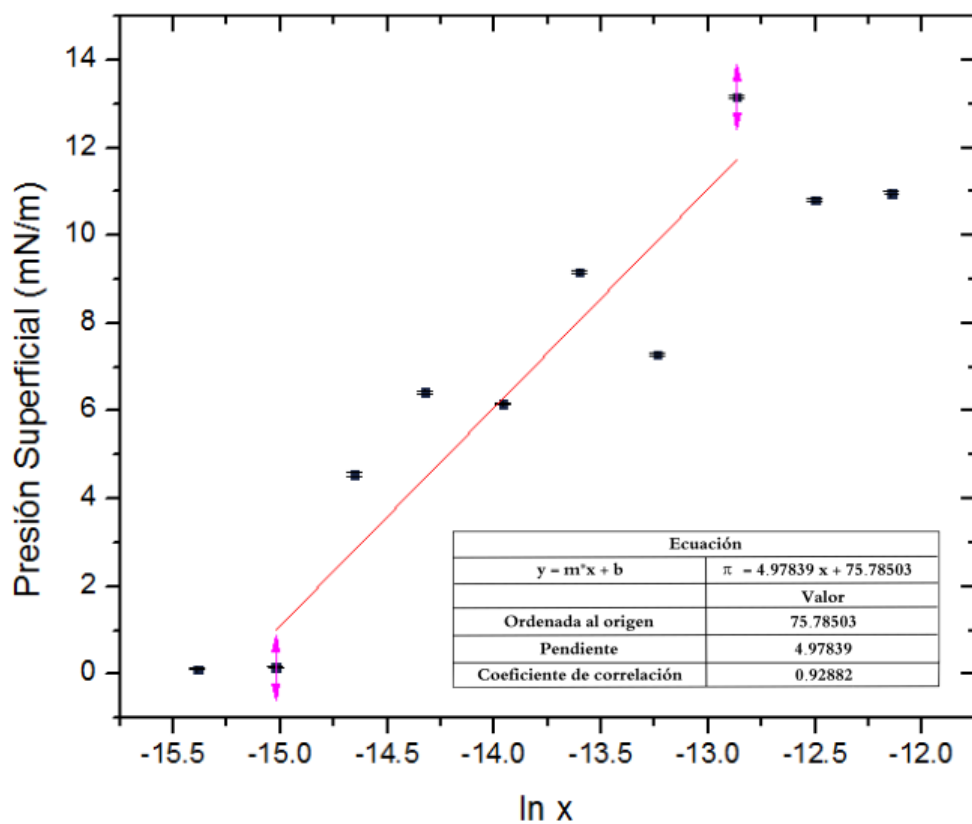


Figura 3.42. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 65.

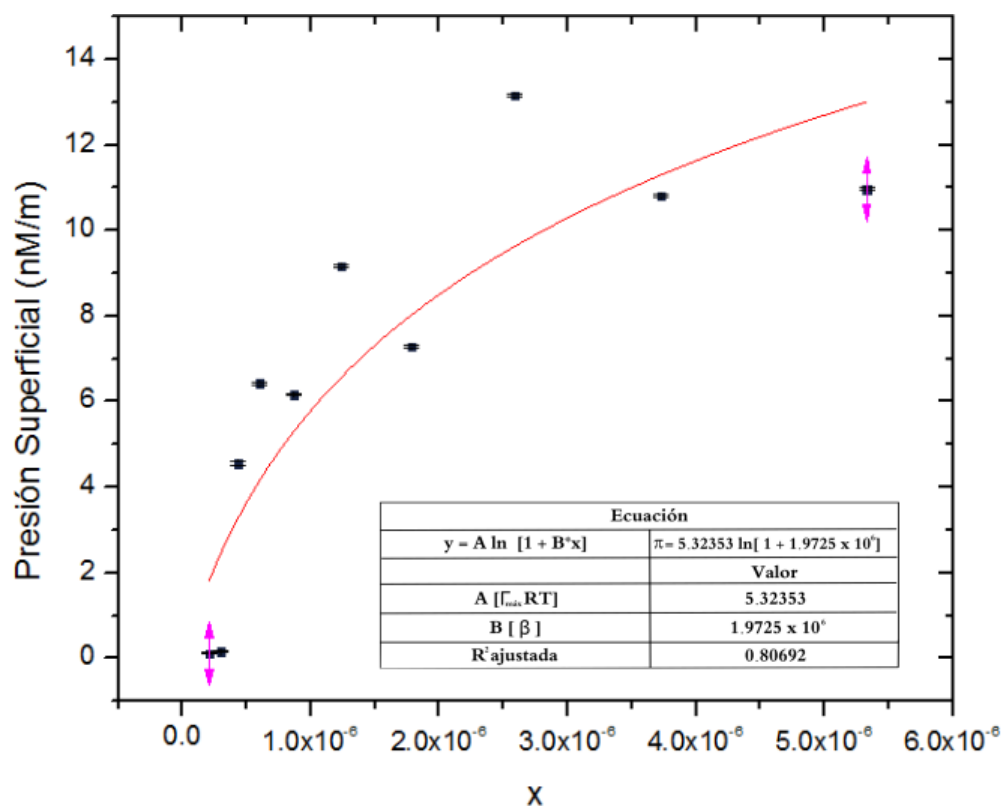


Figura 3.43. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 65.

Tabla 3.15. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 65 en agua.

Parámetro		
Área mínima	0.8283 nm^2	82.83 \AA^2
Energía estándar de adsorción	$40078.561 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$	$40.08 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$
Energía de micelización	$31239.932 \frac{\text{J}}{\text{mol}}$	$31.24 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$

3.7.6. Relación entre parámetros superficiales de los tensoactivos usados y el tamaño de los niosomas formados.

Con los parámetros superficiales obtenidos se buscó una correlación lineal entre estos parámetros y el tamaño de los niosomas producidos, de una forma similar a lo que hizo Milton J. Rosen⁸² encontrando una relación entre los parámetros y la toxicidad de los tensoactivos. A continuación se muestra una tabla con cada uno de ellos.

Tabla 3.16. Parámetros superficiales calculados para los tensoactivos.

Tensoactivo	A_{min} [\AA^2]	Beta [β]	Δ_{mic} [$\frac{kJ}{mol}$]	Δ_{mic}/A_{min} [$\frac{J}{m^2}$]	Δ_{ads}^0 [$\frac{kJ}{mol}$]	Δ_{ads}^0/A_{min} [$\frac{J}{m^2}$]	$(\Delta_{ads}^0 - \Delta_{mic})/A_{min}$ [$\frac{J}{m^2}$]
Span 20	5.98	216495.51	-34.27	-0.9513	-40.10	-1.1132	-0.0162
Span 20 + CHO	17.00	532240.64	-31.31	-0.3058	-41.02	-0.4006	-0.0949
Span 60	25.01	649761.48	-21.92	-0.1456	-40.01	-0.2657	-0.1201
Span 60 + CHO	34.65	921433.26	-24.60	-0.1179	-38.90	-0.1864	-0.0686
Span 65	82.83	1972500.00	-31.24	-0.0626	-40.08	-0.0804	-0.0177

Para determinar si existe una relación lineal entre cualquiera de estos parámetros y el tamaño de los niosomas se graficó cada uno de estos en función del tamaño promedio de los niosomas producidos por cada tensoactivo.

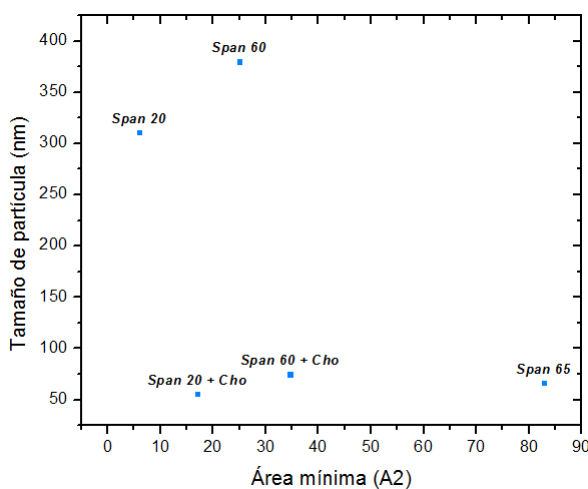


Figura 3.44. Gráfica Área mínima vs Tamaño de partícula.

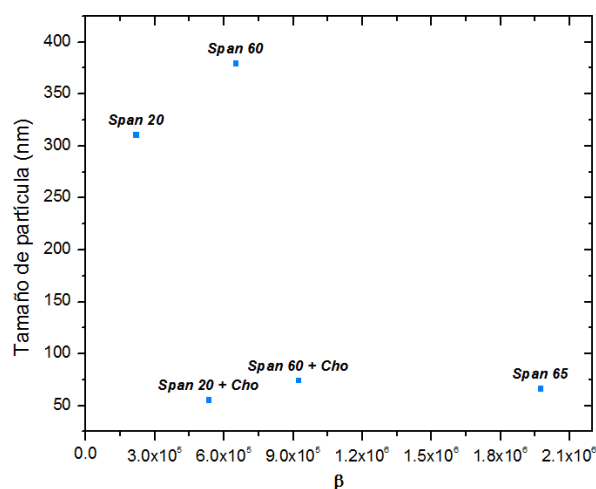


Figura 3.45. Gráfica Beta (Parámetro de efecto liofóbico) vs Tamaño de partícula.

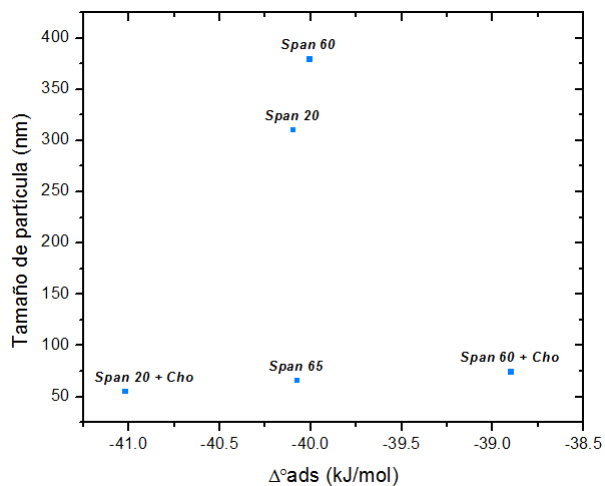


Figura 3.46. Gráfica Energía estándar de adsorción vs Tamaño de partícula.

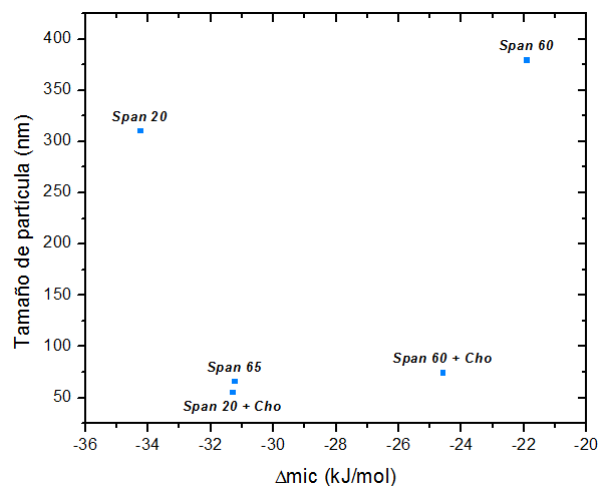


Figura 3.47. Gráfica Energía de micelización vs Tamaño de partícula.

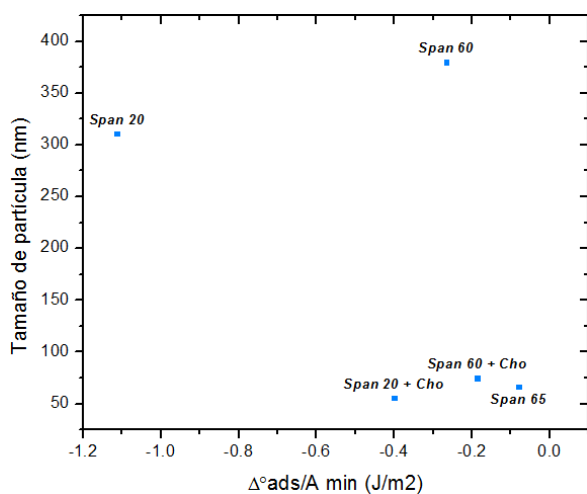


Figura 3.48. Gráfica $\Delta^{\circ}ads / A min$ vs Tamaño de partícula.

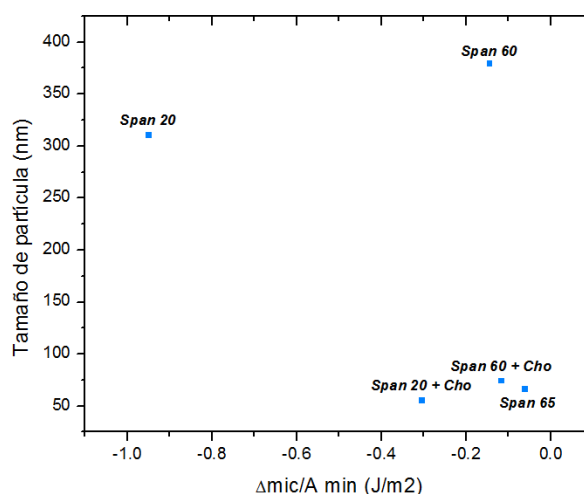


Figura 3.49. Gráfica $\Delta mic / A min$ vs Tamaño de partícula.

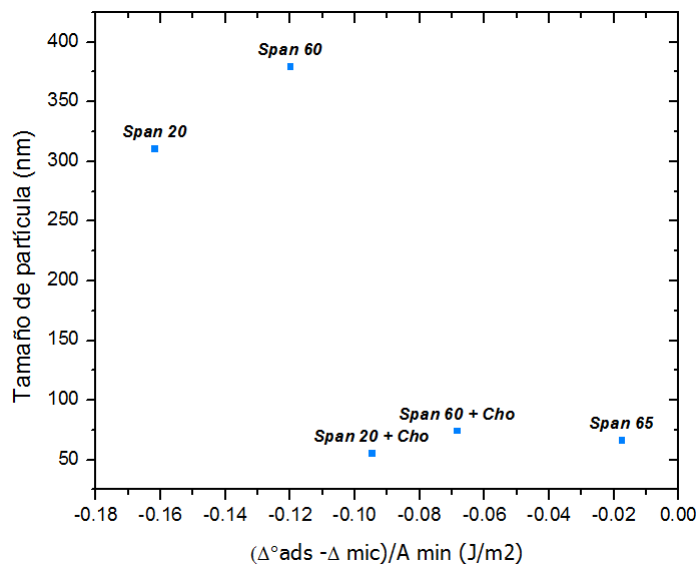


Figura 3.50. Gráfica $\Delta_{ads}^{\circ} - \Delta_{mic}^{\circ} / A \text{ min}$ vs Tamaño de partícula.

Como se puede observar en las gráficas existen dos conjuntos de datos muy diferentes entre sí, el primer grupo está formado por los datos de Span 20 y Span 60 y el segundo por los de Span 20 + CHO, Span 60 + CHO y Span 65. Esto es debido al tamaño de partícula obtenido en el primer grupo que es mucho mayor al segundo.

En la sección 1.4.2 Factores que afectan la formación de Niosomas se mencionó el parámetro de empaquetamiento crítico (CPP), el cual toma en cuenta la posible geometría de las moléculas en la formación de agregados moleculares. Dado que no fue posible medir cada una de las magnitudes necesarias para hacer un cálculo preciso del parámetro y las fórmulas destinadas al cálculo de estas,¹⁵ obvian algunas variables (rotación en los enlaces, configuraciones posibles de la cadena) sólo se considerará la estructura de los tensoactivos tal cual su fórmula química, es decir, la porción hidrófoba como una cadena lineal rígida.

Tanto el Span 20 como el Span 60 tienen como grupo hidrófilo al sorbitol, lo que varía es la cadena hidrófoba. Para un posible cálculo de CPP, el área del grupo hidrófilo se mantiene constante, mientras que longitud y volumen de la cadena hidrófoba varían.

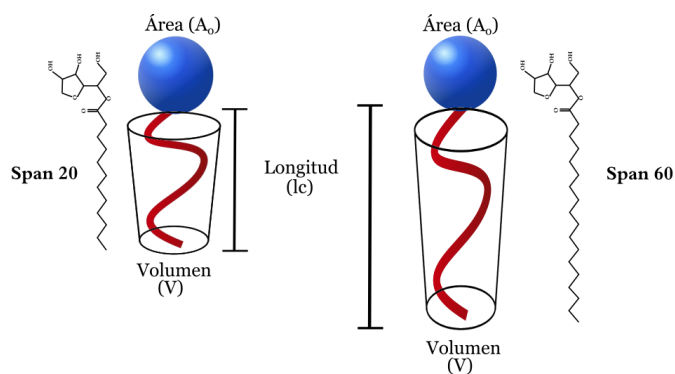


Figura 3.51. Comparación de magnitudes entre Span 20 y Span 60.

Se puede considerar que ambas moléculas tienen una geometría similar, y el acomodo de estas hace que la longitud de cadena sea la que determine el grosor de la región hidrófoba y, por lo tanto, su tamaño de partícula.

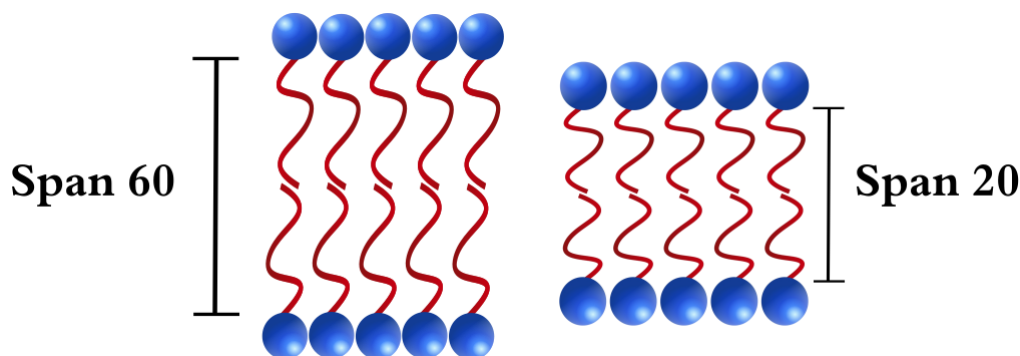


Figura 3.52. Comparación de grosor de bicapa entre Span 20 y Span 60.

En el caso del segundo grupo (Span 20 + CHO, Span 60 + CHO y Span 65), también tienen el mismo grupo hidrófilico, solamente cambia el grupo hidrófobo, pero a comparación de los tensoactivos del primer grupo, en estos el volumen será mayor, ya sea por la presencia de 3 cadenas hidrófobas (Span 65) o por tener un aditivo intercalado en la cadena hidrófoba (Span 20 + CHO y Span 60 + CHO).

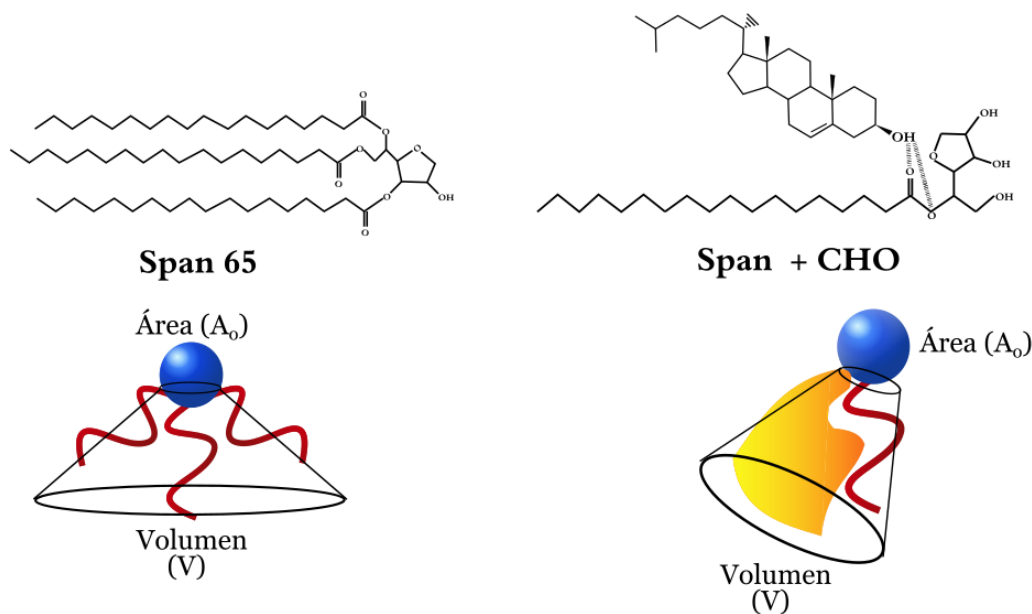


Figura 3.53. Representación esquemática de Span 65 y Span + Colesterol

Este aumento de volumen hace que la geometría de este grupo sea diferente del primero, por lo tanto, el tamaño de partícula de los niosomas producidos no depende de la longitud de la cadena.

Tomando sólo en cuenta este segundo grupo se encontró una relación lineal entre uno de los parámetros superficiales y el tamaño de partícula de los niosomas formados.

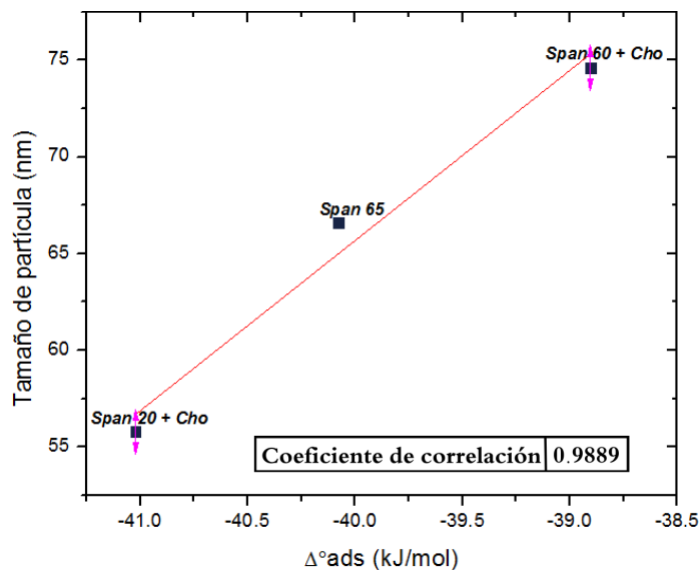


Figura 3.54. Gráfica Δ°_{ads} vs Tamaño de partícula solamente del grupo 2.

Se observa en la Gráfica 3.54, una tendencia lineal entre Energía estándar de adsorción y el tamaño de partícula, se sugiere que en el segundo grupo el tamaño del agregado depende de la tendencia del tensoactivo o mezcla de tensoactivos para adsorberse en la superficie.

Algo que se observó en este grupo de tensoactivos y mezclas, fue la relación lineal entre el Área mínima y el Parámetro de liofilicidad (β), pero no se le encontró una explicación y puede llegar a ser motivo de investigación en futuros estudios.

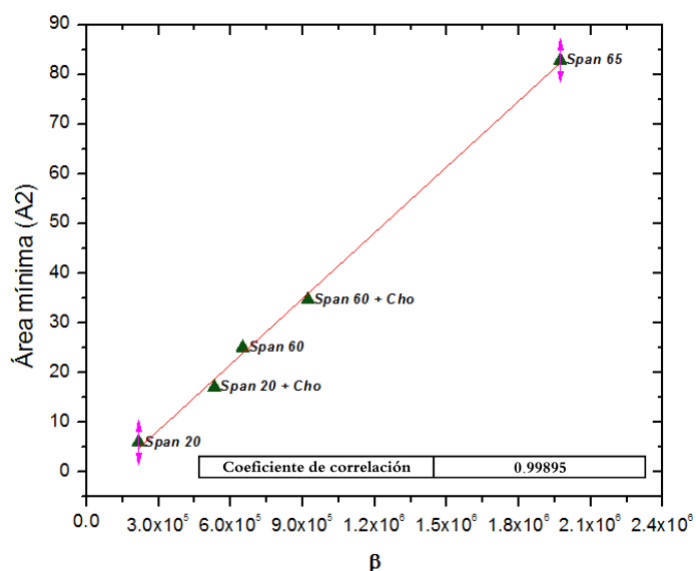


Figura 3.55. Gráfica Parámetro de liofilicidad vs Á. min.

Conclusiones

- Se logró establecer las condiciones del método para lograr resultados reproducibles: tiempo de calentamiento, tiempo de dispersión en sonicador, tiempo de burbujeo y flujo del gas.
- Se midió el tamaño de partícula de los productos, siendo este un indicativo de la probable formación de niosomas. Posteriormente, se harán estudios de microscopia que nos permitan verificar esta formación.
- Se logró observar la influencia del tamaño de la cadenas hidrofóbicas del tensoactivo, donde a mayor longitud se presenta un mayor tamaño de partícula (agregado); del número de cadenas hidrocarbonadas, donde se presenta una disminución de tamaño a mayor número de cadenas; y de la presencia de colesterol, donde se observa disminución del tamaño de partícula de los productos obtenidos, cuando se encuentra presente.
- Se observó la formación de niosomas y su estructura mediante el uso de microscopía electrónica de barrido.
- Se estableció una relación cuantitativa y una cualitativa entre la estructura del tensoactivo y el tamaño del agregado formado.

Índice de figuras

1.1. Ejemplo común de interfase. Imagen modificada de López ³	8
1.2. Representación esquemática de tensión superficial.	9
1.3. Representación esquemática de un tensoactivo.	9
1.4. Adsorción de tensoactivo en la superficie.	10
1.5. Ejemplo de gráfica Presión Superficial vs Concentración.	10
1.6. Clasificación de tensoactivos.	12
1.7. Tipos de micelas	14
1.8. Equilibrio Dinámico entre micelas y monómeros.	14
1.9. Gráfica de Propiedad vs Concentración	15
1.10. Tipos de vesículas.	17
1.11. Representación esquemática de la estructura de un liposoma.	18
1.12. Representación esquemática de un niosoma.	19
1.13. Geometrías adquiridas de acuerdo al CPP.	21
1.14. Representación esquemática de la formación de Fragmentos de Bicapa. Imagen modificada de Lasic ²²	23
1.15. Método de Inyección. Imagen modificada de Moghassemi ³⁷	25
1.16. Método de Hidratación de película. Imagen modificada de Moghassemi ³⁷	26
1.17. Método de Evaporación en fase inversa (REV). Imagen modificada de Moghassemi ³⁷	26
1.18. Método de Micro fluidización. Imagen modificada de Marianecci ²⁸	27
1.19. Método de Burbujeo. Imagen modificada de Yeo ³⁶	28
1.20. Fundamento de formación de niosomas por el Método de Burbujeo. Imagen modificada de Talmsma et.al. ⁵⁹	29
2.1. Reacción de síntesis de ésteres de sorbitán.	30
2.2. Monolaurato de sorbitán.	31
2.3. Monoestereato de sorbitán.	31
2.4. Triestereato de sorbitán.	31
2.5. Monooleato de sorbitán.	31
2.6. Trioleato de sorbitán.	31
2.7. Monopalmitato de polioxietilensorbitan.	32
2.8. Monoestearato de polioxietilensorbitan.	32
2.9. Estructura del Colesterol.	33
2.10. Dispersión de luz provocada por una partícula.	36
2.11. Detección de intensidad de luz dispersada.	36
2.12. Anillo de Du Noüy sobre la superficie de un líquido.	38
2.13. Procedimiento para formación de niosomas.	40

2.14. Procedimiento para determinacion de tensión superficial y densidad. . .	41
2.15. Procedimiento para medir tamaño de partícula y enviar a microscopía. . .	42
3.1. Comparación entre los métodos de agitación.	44
3.2. Gráfica de evaluación de tiempo de burbujeo.	45
3.3. Gráfica de evaluación de flujo de nitrógeno.	46
3.4. Gráfica de evaluación de gases.	47
3.5. Gráfica de evaluación de medio de disolución.	48
3.6. Comparación entre las muestras de diferentes medios de disolución. . .	49
3.7. Gráfica de evaluación del efecto de cada operación unitaria.	50
3.8. Gráfica del efecto de la cantidad de colesterol.	51
3.9. Gráfica del seguimiento del tamaño de partícula a través del tiempo. . .	53
3.10. Gráfica de efecto de longitud de cadena hidrofóbica.	54
3.11. Gráfica de efecto de número de cadenas hidrofóbicas (1).	55
3.12. Gráfica de efecto de número de cadenas hidrofóbicas (2).	56
3.13. Gráfica de efecto de saturación de cadena hidrofóbica.	57
3.14. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (1).	58
3.15. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (2).	58
3.16. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 (3).	58
3.17. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 + Colesterol (1). . . .	58
3.18. Microscopía de niosomas producidos con Span 20 + Colesterol (2). . . .	58
3.19. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (1).	59
3.20. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (2).	59
3.21. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (3).	59
3.22. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 (4).	59
3.23. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (1). . . .	59
3.24. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (2). . . .	59
3.25. Microscopía de niosomas producidos con Span 60 + Colesterol (3). . . .	60
3.26. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (1).	60
3.27. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (2).	60
3.28. Microscopía de niosomas producidos con Span 65 (3).	60
3.29. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 20. . .	62
3.30. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 20. . .	63
3.31. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 20.	65
3.32. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 20 + Colesterol	66
3.33. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 20 + Colesterol.	66
3.34. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 20 + Colesterol. .	67
3.35. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 60. . .	68
3.36. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 60. . .	68
3.37. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 60.	69
3.38. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 60 + Colesterol.	70
3.39. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 60 + Colesterol.	70
3.40. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 60 + Colesterol. .	71
3.41. Gráfica de Tensión superficial vs ln de la concentración de Span 65. . .	72

3.42. Gráfica de Presión superficial vs ln de la concentración de Span 65.	72
3.43. Gráfica de Presión superficial vs concentración de Span 65.	73
3.44. Gráfica Área mínima vs Tamaño de partícula.	74
3.45. Gráfica Beta (Parámetro de efecto liofóbico) vs Tamaño de partícula.	74
3.46. Gráfica Energía estándar de adsorción vs Tamaño de partícula.	75
3.47. Gráfica Energía de micelización vs Tamaño de partícula.	75
3.48. Gráfica $\Delta_{ads}^0 / A \text{ min}$ vs Tamaño de partícula.	75
3.49. Gráfica $\Delta_{mic} / A \text{ min}$ vs Tamaño de partícula.	75
3.50. Gráfica $\Delta_{ads}^0 - \Delta_{mic} / A \text{ min}$ vs Tamaño de partícula.	76
3.51. Comparación de magnitudes entre Span 20 y Span 60.	76
3.52. Comparación de grosor de bicapa entre Span 20 y Span 60.	77
3.53. Representación esquemática de Span 65 y Span + Colesterol	77
3.54. Gráfica Δ_{ads}^0 vs Tamaño de partícula solamente del grupo 2.	78
3.55. Gráfica Parámetro de liofilicidad vs $\dot{A} \text{ min}$	78

Índice de tablas

1.1. Clasificación de vesículas por tamaño	17
1.2. Usos de los tensoactivos dependiendo su valor de HLB.	20
1.3. Parámetros que influyen en la estabilidad de niosomas.	25
1.4. Solventes usados en los métodos de producción de liposomas y niosomas convencionales.	26
2.1. Propiedades de los ésteres de sorbitán.	31
2.2. Propiedades de los polisorbatos.	32
2.3. Reactivos utilizados.	33
2.4. Propiedades del Aire.	34
2.5. Propiedades del Nitrógeno.	34
2.6. Propiedades del Dióxido de Carbono.	34
2.7. Equipos utilizados.	39
3.1. Evaluación de tiempo de burbujeo.	44
3.2. Evaluación de flujo de nitrógeno.	46
3.3. Evaluación de gases.	47
3.4. Evaluación de medio de disolución.	48
3.5. Evaluación del efecto de cada operación unitaria.	50
3.6. Efecto de la cantidad de colesterol.	51
3.7. Seguimiento del tamaño de partícula a través del tiempo.	52
3.8. Efecto de longitud de cadena hidrofóbica	54
3.9. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas (1).	55
3.10. Efecto de número de cadenas hidrofóbicas (2).	56
3.11. Efecto de saturación de cadena hidrofóbica.	56
3.12. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 20 con colesterol en agua.	67
3.13. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 60 en agua.	69
3.14. Parámetros calculados para la mezcla de Span 60 con colesterol en agua.	71
3.15. Parámetros calculados para el tensoactivo Span 65 en agua.	73
3.16. Parámetros superficiales calculados para los tensoactivos.	74

Referencias Bibliográficas

- [1] Robert Aveyard y Denis Arthur Haydon. *An introduction to the principles of surface chemistry*. University Press, Cambridge England, 1973.
- [2] Bengt Kronberg, Krister Holmberg, y Bjorn Lindman. *Surface Chemistry of Surfactan*. John Wiley Sons, 2014.
- [3] José Luis López Cervantes. Tensión superficial, densidad, y velocidad del sonido de un biotensoactivo en disolución acuosa. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.
- [4] David Attwood y Alexander T. Florence. *Physical Pharmacy*. Pharmaceutical Press, London, 2008.
- [5] Y. Nakama. Surfactants. páginas 231–244, 2017.
- [6] Federico D. Sandoval Ibarra, José L. López Cervantes, y Jesús Gracia Fadrique. Ecuación de langmuir en líquidos simples y tensoactivos. *Educación Química*, 26(4):307–313, oct 2015.
- [7] Tharwat Tadros. *Applied surfactants : principles and applications*. Wiley-VCH, Weinheim Germany, 2005.
- [8] Alma Miriam Novelo Torres y Jesús Gracia Fadrique. Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de gibbs. *Educación Química*, 16(1):63, aug 2018.
- [9] James J. Sheng. Surfactant flooding. páginas 239–335, 2011.
- [10] James J. Sheng. Surfactant polymer flooding. páginas 117–142, 2013.
- [11] Krister Holmberg. Surfactants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2019.
- [12] Kurt Kosswig. Surfactants. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2012.
- [13] Brian Vincent. McBain and the centenary of the micelle. *Advances in Colloid and Interface Science*, 203:51–54, jan 2014.
- [14] Akihito Hashidzume y Akira Harada. Micelles and vesicles. páginas 1238–1241, 2015.
- [15] Charles Tanford. *The hydrophobic effect : formation of micelles and biological membranes*. Wiley, New York, 1980.

- [16] Walter C. Presto y Walter Preston. Some correlating principles of detergent action. *The Journal of Physical and Colloid Chemistry*, 52(1):84–97, jan 1948.
- [17] Issa Katime, José R. Quintana, y Manuel Villacampa. Micelas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2003.
- [18] Ijeoma F. Uchegbu y Suresh P. Vyas. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 172(1-2):33–70, oct 1998.
- [19] J. N. Phillips. The energetics of micelle formation. *Transactions of the Faraday Society*, 51:561, 1955.
- [20] C. Tanford. Thermodynamics of micelle formation: Prediction of micelle size and size distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 71(5):1811–1815, may 1974.
- [21] Sepideh Khoei y Morteza Yaghoobian. Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. páginas 207–237, 2017.
- [22] Danilo D. Lasic. The mechanism of vesicle formation. *Biochemical Journal*, 256(1):1–11, nov 1988.
- [23] ManufacturingChemist. Extrusion for unilamellar liposome formation, 2016.
- [24] Didem Ag Sepeci, Muharrem Sepeci, Johanna-Gabriela Walter, Frank Stahl, y Thomas Scheper. Niosomes as nanoparticulate drug carriers: Fundamentals and recent applications. *Journal of Nanomaterials*, 2016:1–13, 2016.
- [25] Mingtian Xu, Jiangfeng Guo, y Xuefang Li. Thermodynamic analysis and optimization design of heat exchanger. páginas 63–167, oct 2013.
- [26] A.D. Bangham, M.M. Standish, y J.C. Watkins. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1):238–IN27, aug 1965.
- [27] Rose M. Handjani, Alain Ribier, Guy Vanlerberghe, Arlette Zabotto, y Jacqueline Griat. Cosmetic and pharmaceutical compositions containing niosomes and a water-soluble polyamide, and a process for preparing these compositions., 1989.
- [28] Carlotta Marianecchi, Luisa Di Marzio, Federica Rinaldi, Christian Celia, Donatella Paolino, Franco Alhaique, Sara Esposito, y Maria Carafa. Niosomes from 80s to present: The state of the art. *Advances in Colloid and Interface Science*, 205:187–206, mar 2014.
- [29] William C. Griffin. Classification of surface-active agents by "hlb". *Journal of Cosmetic Science*, 1949.
- [30] William C. Griffin. Calculation of hlb values of non-ionic surfactants. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1954.
- [31] Jacob Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, London, 1992.

- [32] Danilo D. Lasic, R. Joannic, B.C. Keller, P.M. Frederik, y L. Auvray. Spontaneous vesiculation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 89-90:337–349, jan 2001.
- [33] Gregor Cevc. Rational design of new product candidates: The next generation of highly deformable bilayer vesicles for noninvasive, targeted therapy. *Journal of Controlled Release*, 160(2):135–146, jun 2012.
- [34] Hamdy Abdelkader, Adam W. G. Alani, y Raid G. Alany. Recent advances in non-ionic surfactant vesicles (niosomes): self-assembly, fabrication, characterization, drug delivery applications and limitations. *Drug Delivery*, 21(2):87–100, oct 2013.
- [35] V. C. Okore, A. A. Attama, K. C. Ofokansi, C. O. Esimone, y E. B. Onuigbo. Formulation and evaluation of niosomes. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011.
- [36] Pei Ling Yeo, Chooi Ling Lim, Soi Moi Chye, Anna Pick Kiong Ling, y Rhun Yian Koh. Niosomes: a review of their structure, properties, methods of preparation, and medical applications. *Asian Biomedicine*, 11(4):301–314, mar 2018.
- [37] Saeid Moghassemi y Afra Hadjizadeh. Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: An illustrated review. *Journal of Controlled Release*, 185:22–36, jul 2014.
- [38] Ijeoma F. Uchegbu y Alexander T. Florence. Non-ionic surfactant vesicles (niosomes): Physical and pharmaceutical chemistry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 58(1):1–55, jun 1995.
- [39] Colin Cable. *An examination of the effect of surface modifications on the physicochemical and biological properties of non-ionic surfactant vesicles*. Tesis de Doctorado, University of Strathclyde, 1990.
- [40] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, y M. Mozafari. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, 10(2):57, may 2018.
- [41] Sherif Shaker, AhmedRifaat Gardouh, y MamdouhMostafa Ghorab. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 12(5):346, 2017.
- [42] Philippe Gentine, Aurélie Bubel, Corinne Crucifix, Line Bourel-Bonnet, y Benoît Frisch. Manufacture of liposomes by isopropanol injection: characterization of the method. *Journal of Liposome Research*, 22(1):18–30, jun 2011.
- [43] David W. Deamer. PREPARATION AND PROPERTIES OF ETHER-INJECTION LIPOSOMES. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 308(1 Liposomes and):250–258, jun 1978.
- [44] Oscar R. Estupiñan, Pablo Garcia-Manrique, Maria del Carmen Blanco-Lopez, Maria Matos, y Gemma Gutiérrez. Vitamin d3 loaded niosomes and

- transfersomes produced by ethanol injection method: Identification of the critical preparation step for size control. *Foods*, 9(10):1367, sep 2020.
- [45] Abbaraju Krishna Sailaja y Marneni Shreya. Preparation and characterization of naproxen loaded niosomes by ether injection method. *Nano Biomedicine and Engineering*, 10(2), jun 2018.
- [46] Ketousetuo Kuotsu, KaziMasud Karim, AsimSattwa Mandal, Nikhil Biswas, Arijit Guha, Sugata Chatterjee, y Mamata Behera. Niosome: A future of targeted drug delivery systems. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1(4):374, 2010.
- [47] Bai Xiang y De-Ying Cao. Preparation of drug liposomes by thin-film hydration and homogenization. páginas 1–11, dec 2017.
- [48] labeeb Ahmed Al-Zubaidi, Mahdi Salih Al-Rubaie, y Tagreed Sabeah Abdullah. Multi lamellar vesicles (mlvs) liposomes preparation by thin film hydration technique. 32:550–560.
- [49] Hongwei Zhang. Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. páginas 17–22, nov 2016.
- [50] Gyati Shilakari Asthana, Parveen Kumar Sharma, y Abhay Asthana. In Vitro and In Vivo Evaluation of niosomal formulation for controlled delivery of clarithromycin. *Scientifica*, 2016:1–10, 2016.
- [51] Li Yeo, Cheng Chaw, y Amal Elkordy. The effects of hydration parameters and co-surfactants on methylene blue-loaded niosomes prepared by the thin film hydration method. *Pharmaceuticals*, 12(2):46, mar 2019.
- [52] Fahima Hashim, Mohamed El-Ridy, Mohamed Nasr, y Yasmin Abdallah. Preparation and characterization of niosomes containing ribavirin for liver targeting. *Drug Delivery*, 17(5):282–287, mar 2010.
- [53] Nian-Qiu Shi y Xian-Rong Qi. Preparation of drug liposomes by reverse-phase evaporation. páginas 1–10, dec 2017.
- [54] R. Cortesi. Preparation of liposomes by reverse-phase evaporation using alternative organic solvents. *Journal of Microencapsulation*, 16(2):251–256, jan 1999.
- [55] A. J. Baillie, A. T. Florence, L. R. Hume, G. T. Muirhead, y A. Rogerson. The preparation and properties of niosomes-non-ionic surfactant vesicles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37(12):863–868, dec 1985.
- [56] Ahmed S. Guinedi, Nahed D. Mortada, Samar Mansour, y Rania M. Hathout. Preparation and evaluation of reverse-phase evaporation and multilamellar niosomes as ophthalmic carriers of acetazolamide. *International Journal of Pharmaceutics*, 306(1-2):71–82, dec 2005.
- [57] Gordon L. Amidon, Hans Lennernäs, Vinod P. Shah, y John R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical Research*, 12(3):413–420, 1995.

- [58] Thakur Gurjeet Singh y Neha Sharma. Nanobiomaterials in cosmetics: current status and future prospects. páginas 149–174, 2016.
- [59] Herre Talsma, Mies J. Van Steenberghe, Johan C.H. Borchert, y Daan J. A. Crommelin. A novel technique for the one-step preparation of liposomes and nonionic surfactant vesicles without the use of organic solvents. liposome formation in a continuous gas stream: The "bubble" method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(3):276–280, mar 1994.
- [60] David R. Karsa. *Design and selection of performance surfactants*. Sheffield Academic Press CRC Press, Sheffield, England Boca Raton, FL, 1999.
- [61] Jonathan R. Mielenz, K. Thomas Klasson, William S. Adney, y James D. McMillan, editores. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer-Verlag GmbH, 2009.
- [62] Roddy Rogers. *Física de las nubes*. Reverte, Barcelona, 1977.
- [63] *Zetasizer Nano series User Manual*, Abril 2013.
- [64] William D. Harkins y Hubert F. Jordan. A METHOD FOR THE DETERMINATION OF SURFACE AND INTERFACIAL TENSION FROM THE MAXIMUM PULL ON a RING. *Journal of the American Chemical Society*, 52(5):1751–1772, may 1930.
- [65] H Zuidema y George Waters. Ring method for the determination of interfacial tension. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition*, 13(5):312–313, may 1941.
- [66] Anton-Paar. *Instruction Manual DMA 4100, MDMA 4500, MDMA 5000 M*. Graz, Austria, Febrero 2012.
- [67] W. Abbassi, S. Besbes, M. El Hajem, H. Ben Aissia, J.Y. Champagne, y J. Jay. Influence of operating conditions and liquid phase viscosity with volume of fluid method on bubble formation process. *European Journal of Mechanics - B/Fluids*, 65:284–298, sep 2017.
- [68] Mariano Martín, Francisco J. Montes, y Miguel A. Galán. On the influence of the liquid physical properties on bubble volumes and generation times. *Chemical Engineering Science*, 61(16):5196–5203, aug 2006.
- [69] S. Ramakrishnan, R. Kumar, y N.R. Kuloor. Studies in bubble formation - i. bubble formation under constant flow conditions. *Chemical Engineering Science*, 24(4):731–747, apr 1969.
- [70] P. Hanafizadeh, J. Eshraghi, E. Kosari, y W. H. Ahmed. The effect of gas properties on bubble formation, growth, and detachment. *Particulate Science and Technology*, 33(6):645–651, apr 2015.
- [71] James K. Beattie, Alex M. Djerdjev, Angus Gray-Weale, Nikola Kallay, Johannes Lützenkirchen, Tajana Preočanin, y Atida Selmani. pH and the surface tension of water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 422:54–57, may 2014.

- [72] J.A. Beunen y Eli Ruckenstein. The effect of salting out and micellization on interfacial tension. *Advances in Colloid and Interface Science*, 16(1):201–231, jul 1982.
- [73] Behrooz Nasser. Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *International Journal of Pharmaceutics*, 300(1-2):95–101, aug 2005.
- [74] Aranya Manosroi, Paveena Wongtrakul, Jiradej Manosroi, Hideki Sakai, Fumio Sugawara, Makoto Yuasa, y Masahiko Abe. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 30(1-2):129–138, jul 2003.
- [75] EbtessamA Essa. Effect of formulation and processing variables on the particle size of sorbitan monopalmitate niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 4(4):227, 2010.
- [76] Cheng Shu Chaw y Kwong Yioung Ah Kim. Effect of formulation compositions on niosomal preparations. *Pharmaceutical Development and Technology*, 18(3):667–672, apr 2012.
- [77] Jaleh Varshosaz, Abbas Pardakhty, y Valiollah Hajhashemi. Development and physical characterization of sorbitan monoester niosomes for insulin oral delivery. *Drug Delivery*, 10(4):251–262, jan 2003.
- [78] Malay K Das y Narahari N Palei. Sorbitan ester niosomes for topical delivery of rofecoxib. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2011.
- [79] Sunil Kamboj, Vipin Saini, y Suman Bala. Formulation and characterization of drug loaded nonionic surfactant vesicles (niosomes) for oral bioavailability enhancement. *The Scientific World Journal*, 2014:1–8, 2014.
- [80] Madhu Gupta, Bhuvaneshwar Vaidya, Neeraj Mishra, y Suresh P. Vyas. Effect of surfactants on the characteristics of fluconazole niosomes for enhanced cutaneous delivery. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39(6):376–384, sep 2011.
- [81] Prasun Bandyopadhyay y N.S. Neeta. Evidence for vesicle formation from 1:1 nonionic surfactant span 60 and fatty alcohol mixtures in aqueous ethanol: Potential delivery vehicle composition. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 58(2):305–308, aug 2007.
- [82] Milton J. Rosen, Lin Fei, Yun-Peng Zhu, y Stephen W. Morrall. The relationship of the environmental effect of surfactants to their interfacial properties. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2(3):343–347, jul 1999.