



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **ESTUDIO DE LA EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN COMO MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS**

**JUAN FELIPE CRESPO RODRÍGUEZ**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área curricular de Farmacia  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas  
Bogotá D.C., Colombia  
2015



# **ESTUDIO DE LA EMULSIFICACIÓN-DIFUSIÓN COMO MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE PARTÍCULAS LIPÍDICAS**

**JUAN FELIPE CRESPO RODRÍGUEZ**

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magíster en Ciencias Farmacéuticas.**

Directora:

Claudia Elizabeth Mora Huertas, PhD.

Profesora Asociada

Departamento de Farmacia

Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y  
Cosméticos - GIDECA

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Área curricular de Farmacia  
Maestría en Ciencias Farmacéuticas  
Bogotá D.C., Colombia

2015



*A Dios, a mis padres y a Laura.*

*“Te deseo, hoja de mi árbol, paz, amor, salud, suerte y prosperidad. Hoy y siempre... Simplemente porque cada persona que pasa en nuestra vida es única. Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros. Habrá los que se llevarán mucho, pero no habrá de los que no nos dejarán nada. Esta es la mayor responsabilidad de nuestra vida y la prueba evidente de que dos almas no se encuentran por casualidad”.*

*Jorge Luis Borges.*



# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi familia, a mis padres y a mis hermanos por su apoyo incondicional.

A la profesora Claudia Mora, por su sabiduría, apoyo e incansables esfuerzos en todo momento para sacar adelante este proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia y a la Vicerrectoría de Investigación, quienes financiaron el desarrollo experimental de la presente tesis. Igualmente, un agradecimiento especial a la Facultad de Ciencias y al Departamento de Farmacia, por el apoyo como estudiante dentro del Programa Nacional de Becas Auxiliar Docente.

A HÄNDLER S.A.S. y a Gattefossé por el apoyo en el suministro de las materias primas para la realización de este trabajo

Al Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos-GIDECA, no solo por ser mi segundo hogar y permitirme adelantar este trabajo de maestría, sino por las personas maravillosas que pude conocer, en especial a Claudia Milena, Juan Camilo, Sebastián, Laura y Jorge.

A mis amigos, en especial a Oscar, Iván, Julián, Camilo y Vanessa, por sus consejos y palabras de aliento.

A Laura, por ser la persona que siempre me mostró el lado mágico y amable de las cosas.

*La presente tesis de maestría fue desarrollada en el Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, dentro del marco del proyecto “Estudio de dos métodos basadas en emulsificación para la preparación de partículas a escala micro y nano de interés para las industrias cosmética y farmacéutica – Código 20696”, financiado por la Vicerrectoría de Investigación – Convocatoria del Programa Nacional de Proyectos para el fortalecimiento de la Investigación, la Creación y la Innovación en Posgrados de la Universidad Nacional de Colombia 2013–2015. Modalidad 2. Nuevos proyectos de investigación, creación o innovación.*

## RESUMEN

En la presente investigación se estudia el método emulsificación-difusión con el propósito de determinar la influencia tanto de los materiales de partida como de las condiciones de preparación, sobre el tamaño y el potencial zeta de partículas lipídicas. En términos generales, la naturaleza y la concentración del lípido utilizado determinan el tamaño y el potencial zeta de las partículas. Así, los mejores resultados se presentan al utilizar como lípido diestearato de glicerilo, cuyas partículas exhiben tamaños inferiores a 200 nm y potenciales zeta cercanos a los -12.7 mV. Otros lípidos, como el alcohol estearílico y el ácido esteárico, aunque permiten la formación de las partículas, presentan índices de polidispersidad elevados. Por el contrario, la naturaleza de los solventes orgánicos tiene influencia significativa en el tamaño pero no en el potencial zeta, de partículas preparadas a partir de diestearato de glicerilo. Al evaluar otros materiales lipídicos, la naturaleza del solvente orgánico no determina las propiedades de las partículas. El estudio con diferentes agentes estabilizantes evidencia que los tensioactivos no iónicos son los adecuados para la preparación de las partículas y que la concentración de dicho agente estabilizante puede afectar el tamaño de la partícula sin lograr cambios significativos en el potencial zeta. Los tensioactivos iónicos no permiten la formación de partículas lipídicas por este método. En conjunto, los resultados obtenidos en este estudio son analizados considerando los parámetros de solubilidad de Hildebrand y algunas propiedades fisicoquímicas de los materiales de partida. Desde este punto de vista, la afinidad química entre los compuestos parece determinar el tamaño de las partículas y la tensión superficial del solvente orgánico, así como su solubilidad en agua se identifican como las propiedades fisicoquímicas que

podrían determinar la formación de las partículas. De otro lado, según los resultados relacionados con la influencia de las condiciones operacionales del proceso de preparación, la formación de las partículas parece estar gobernada por las variables que determinan la eficiencia de la emulsificación y no por aquellas relacionadas con la etapa de difusión. Si se tiene en cuenta que en la literatura científica proponen dos mecanismos de formación de las partículas por este método, uno basado en el efecto Gibbs-Marangoni y otro en el que cada gota de emulsión da origen a una partícula, la evidencia experimental obtenida en la presente tesis, sugiere que este último podría ser el mecanismo que predomina cuando se separan partículas sólidas lipídicas por el método de emulsificación-difusión.

**Palabras clave:** Emulsificación-difusión, partícula lipídica, tamaño de partícula, potencial zeta, nanopartícula.

## ABSTRACT

This research work investigates the emulsification-diffusion as method for preparing lipid nanoparticles. In this way, the influence of the starting materials and of the operating conditions related to the preparation on the size and the zeta potential of the particles are systematically evaluated. In general terms, the nature and the concentration of the lipid are the main factors determining the size and the zeta potential of the particles. Thus, the best results are from glyceryl distearate rendering particle sizes less than 200 nm and zeta potential around of -12.7 mV. Other lipidic materials investigated such as stearyl alcohol and stearic acid lead to the formation of particles, however high polydispersity indices are obtained. In contrast, the nature of the organic solvents has a significant influence regarding the size of the particles obtained from glyceryl distearate, but not on their zeta potential. The organic solvent nature has not influence on size and zeta potential of particles prepared by using other lipidic starting materials. Results obtained when different stabilizing agents are used evidence that no-ionic surfactants are appropriate for the particle preparation and the used concentration governs the particle size. Ionic surfactants do not lead to the particle formation. One explanation of these results is proposed from the Hildebrand solubility parameters and some physicochemical properties of the starting materials. Then, it seems that the chemical affinity determinates the particle size and the surface tension of the organic solvent and its water solubility are the most important physicochemical properties influencing the particle formation. On the other hand, according to the results from the study of the operating conditions, the particle formation is perhaps governed by the operating variables influencing the emulsification efficiency but

not by those related to the diffusion stage. Bear in mind that reported research works propose to mechanistic approaches regarding the particle formation via this technique, the first one based on the Gibbs–Marangoni phenomenon and the second one considering that each particle is obtained from a droplet of the emulsion, the experimental evidence obtained in this work suggests that the last mechanistic approach predominates when solid lipid particles are prepared by the emulsification-difussion method.

**Keywords.** Emulsification-difussion, Lipid particle, particle size, zeta potential nanoparticle.

# CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
<b>CONTENIDO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>25</b>
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>27</b>
1.1 Definición y tipos de partículas lipídicas .....	28
1.2 Emulsificación-difusión como método para la elaboración de partículas lipídicas. .....	30
1.3 Materiales de partida para la elaboración de partículas lipídicas por el método de emulsificación–difusión .....	34
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>39</b>
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>41</b>
3.1 Materiales y equipos .....	41
3.2 Métodos .....	¡Error! Marcador no definido.
3.2.1 Determinación de la solubilidad semicuantitativa de los lípidos en solventes orgánicos saturados con agua.....	42
3.2.2 Preparación de las dispersiones de partículas lipídicas .....	43
3.2.3 Caracterización de las partículas lipídicas .....	45
3.2.4 Evaluación de la estabilidad de las dispersiones de partículas lipídicas frente a electrolitos.....	46
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
4.1 Determinación de la solubilidad de los lípidos en solventes orgánicos saturados con agua.....	48
4.2 Estudio sistemático de la preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión.....	56
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	<b>83</b>
5.1 Conclusiones.....	83
5.2 Recomendaciones.....	84
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	¡Error! Marcador no definido.
<b>ANEXOS</b> .....	<b>102</b>



## LISTA DE FIGURAS

**Pág.**

**Figura 1-1:** Representación esquemática de una partícula lipídica (LP), un transportador lipídico nanoestructurado (NLC) y la liberación no controlada del principio activo por cristalización de la matriz sólida en una partícula lipídica ....30

**Figura 1-2:** Representación esquemática del método de emulsificación-difusión para la preparación de partículas lipídicas .....32

**Figura 4-1:** Diagramas ternario de Teas construido a partir de los valores  $f_d$ ,  $f_p$  y  $f_h$  para los lípidos y los solventes orgánicos evaluados .....55

**Figura 4-2:** Distribución de tamaño de las partículas lipídicas preparadas con GDS-EtAc al 2.5% de contenido de lípido con respecto a la fase orgánica .....57

**Figura 4-3:** Influencia de la naturaleza del lípido sobre el tamaño de partícula..61

**Figura 4-4:** Influencia de la concentración del lípido en la preparación de partículas por el método de emulsificación-difusión .....63

**Figura 4-5:** Influencia de la concentración del agente estabilizante sobre el tamaño de partícula.....71

**Figura 4 6:** Influencia de las condiciones asociadas al método emulsificación-difusión en el comportamiento de tamaño y polidispersidad de las partículas lipídicas .....75

**Figura 4-7:** Agregación inducida por la adición de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en partículas lipídicas preparadas por la método de emulsificación-difusión, utilizando diferentes agentes estabilizantes.....80



## LISTA DE TABLAS

	<u>Pág.</u>
<b>Tabla 1-1:</b> Métodos reportados en la literatura para la preparación de partículas lipídica .....	37
<b>Tabla 1 2:</b> Ejemplos de materiales de partida empleados para la elaboración de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión .....	37
<b>Tabla 3 1:</b> Condiciones para evaluar la Influencia de los materiales de partida en la preparación de partículas lipídicas .....	44
<b>Tabla 3 2:</b> Condiciones para evaluar las variables asociadas al método de preparación .....	45
<b>Tabla 4 1:</b> Solubilidad semicuantitativa de los lípidos en los diferentes solventes orgánicos previamente saturados con agua.....	49
<b>Tabla 4-2:</b> Parámetros parciales de solubilidad para los lípidos y los solventes orgánicos.....	52
<b>Tabla 4-3:</b> Propiedades fisicoquímicas de interés de los lípidos empleados .....	54
<b>Tabla 4-4:</b> Propiedades fisicoquímicas de interés para los solventes orgánicos empleados.....	54
<b>Tabla 4-5:</b> Condiciones estándar de preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión .....	57
<b>Tabla 4-6:</b> Resultados de la Influencia de los materiales de partida sobre el tamaño, la polidispersidad y el potencial zeta de las partículas .....	60
<b>Tabla 4 7:</b> Influencia del tipo de solvente sobre el tamaño y potencial zeta de partículas lipídicas preparadas por el método emulsificación-difusión .....	65

**Tabla 4-8:** Influencia de la naturaleza del agente estabilizante sobre el tamaño, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de partículas lipídicas preparadas por el método emulsificación-difusión .....69

**Tabla 4-9:** Resultados de la Influencia de las condiciones de operación sobre el tamaño la polidispersidad y el potencial zeta de las partículas .....73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
ADABC	Cloruro de benzalconio (Alkyl dimethylbenzylammonium chloride)
BA	Alcohol bencílico (Benzyl alcohol)
BL	Lactato de butilo (Butyl lactate)
BSA	Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
CA	Colato de sodio
CetAlc	Alcohol cetílico (Cetyl alcohol)
Cho	Colesterol
CTAB	Cetrimida (Cetyl trimethylammonium bromide)
EtAc	Acetato de etilo (Ethyl acetate)
g	Gramos
GMS	Monoestearato de glicerilo (Glyceryl monostearate)
GDS	Diestearato de glicerilo (Glyceryl distearate)
GTS	Triestearato de glicerilo (Glyceryl tristearate)
GMP	Monopalmitato de glicerilo (Glyceryl monopalmitate)
GDP	Dipalmitato de glicerilo (Glyceryl dipalmitate)
GTP	Tripalmitato de glicerilo (Glyceryl tripalmitate)
IVA	Ácido isovalérico (Isovaleric acid)
IsoAc	Acetato de isopropilo (Isopropyl acetate)
LP	Partícula lipídica (Lipid particle)
MEK	Metil etil cetona (Methyl ethyl ketone)
MetAc	Acetato de metilo (Methyl acetate)
min	Minutos
NLC	Transportadores lipídicos nanoestructurados (Nanostructure lipid carriers)
NR	No reporta
NA	No aplica
PAc	Ácido palmítico (Palmitic acid)
PDI	Índice de polidispersidad (Polidispersity index)
PLX	Poloxámero 188
PLX-407	Poloxámero 407
PVA	Alcohol polivinílico (Polyvinyl alcohol)
PVP	Polivinilpirrolidona (Polyvinylpyrrolidone)

(Continua)

## **LISTA DE ABREVIATURAS (Continuación)**

<b>Abreviatura</b>	<b>Término</b>
SAC	Ácido esteárico (Stearic acid)
SAlc	Alcohol estearílico (Stearyl alcohol)
SDS	Lauril sulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate)
TDC	Taurodeoxicolato de sodio
TL	Temperatura laboratorio
$\delta$	Parámetro de solubilidad
$\delta_d$	Parámetro de solubilidad relacionado con las fuerzas de dispersión
$\delta_h$	Parámetro de solubilidad relacionado con las fuerzas por puentes de hidrógeno
$\delta_p$	Parámetro de solubilidad relacionado con las fuerzas polares
$\eta$	Viscosidad
$\rho$	Densidad
$\gamma$	Tensión superficial
°C	Grado centígrado
$\Omega$	Ohmio
m	Metro
cm	Centímetro
nm	Nanómetro
mPas	milipascal
N	Newton
S	Segundo
ICH	Conferencia internacional sobre armonización (International Conference on Harmonisation)
rpm	Revoluciones por minuto
<i>E<sub>coh</sub></i>	Energía cohesiva
<i>V<sub>m</sub></i>	Volumen molar
$\Delta H_{vap}$	Entalpía de vaporización
<i>R</i>	Constante de los gases ideales
$\rho$	Peso
<i>v</i>	Volumen
<i>V</i>	Voltio

## INTRODUCCIÓN

La tecnología a escala nano ofrece múltiples oportunidades en la creación de productos con funciones y características novedosas. Esto ha permitido dar solución a diferentes problemas tecnológicos, convirtiéndose en una de las principales fuentes de innovación, lo que se ve reflejado en una inversión que para el año 2008 fue de 15 billones de dólares en todo el mundo (Roco, 2011; Institute of Nanotechnology, 2013).

Para el caso particular de las industrias farmacéutica y cosmética, la nanotecnología ha surgido como una estrategia para el transporte de moléculas activas que permiten modificar algunas de sus propiedades fisicoquímicas, además de obtener comportamientos de liberación específicos y una acción dirigida al órgano blanco. Dentro de estos se encuentran, entre otros, los liposomas, los niosomas, las nanopartículas poliméricas y las partículas lipídicas (Lipid particles - LP), las que constituyen el objeto de estudio de la presente tesis.

Las primeras investigaciones acerca de la aplicación de partículas lipídicas en el diseño de medicamentos y cosméticos fueron reportadas a principios de la década de los noventa (Gasco, 1993; Lucks y col., 1993). Desde entonces, los resultados obtenidos han sido prometedores y constituyen una alternativa frente a los sistemas convencionales de liberación de moléculas tales como los liposomas, las nanopartículas poliméricas y las emulsiones (Schwarz y col., 1994). Investigaciones desarrolladas durante los últimos años continúan demostrando su gran potencial, considerando el bajo costo de los materiales de partida (Battaglia y col., 2012), su baja toxicidad (Müller y col., 1996; Müller y col., 1997) y la facilidad de escalamiento a nivel industrial (Müller y col., 2000; Dingler

y col., 2002; Shegokar y col., 2011). En efecto, a nivel mundial diferentes grupos de investigación trabajan la aplicación de las partículas lipídicas por rutas de administración tales como la parenteral (Wissing y col., 2004; Blas y col., 2007; Zara y col., 2002), la peroral (Priano y col., 2007; Luo y col., 2006), la tópica (Schlupp y col., 2011; González y col., 2011; Lippacher y col., 2001), la ocular (Cavallia y col., 2002; Luo y col., 2011) y la pulmonar (Grenha y col., 2008; Nassimi y col., 2010; Liu y col., 2008). Igualmente, la investigación sobre este tema se ha enfocado en el desarrollo de productos cosméticos (Pardeike y col., 2009; L'Oréal, 2010; Hommoss, 2009).

En Colombia, las investigaciones en este campo son incipientes. En nuestro conocimiento, hasta el momento han sido reportados unos pocos trabajos acerca de la preparación y caracterización de partículas lipídicas, dentro de los que se destaca la evaluación de micropartículas conteniendo aceite esencial de cidrón y su potencial aplicación en la industria agroquímica (Gordillo, 2012). Igualmente se han reportado investigaciones acerca de la influencia del material lipídico en el tamaño de las partículas obtenidas (Guzmán, 2013) y la encapsulación de moléculas activas, específicamente quercetina (Martínez, 2014).

Aunque existen diferentes métodos para la elaboración de partículas lipídicas, la emulsificación-difusión resulta ser uno de los más asequibles en el Departamento de Farmacia, por lo que fue seleccionado para el desarrollo de la presente investigación. Inicialmente, los trabajos de Trotta y col. (2003) y de Quintanar y col. (2005), plantearon la adaptación del método de emulsificación-difusión como una alternativa para la elaboración de partículas lipídicas. En adición, el trabajo de Quintanar y col (2005) ha realizado algunas aproximaciones acerca de los aspectos mecanísticos relacionados con la formación de este tipo de partículas por este método, lo que resulta fundamental para su formulación y aplicación en el desarrollo de productos que las contengan.

Como un aporte para lograr el entendimiento de los aspectos físicos y fisicoquímicos propios de los sistemas lipídicos nanoparticulados, la presente tesis desarrolla un estudio sistemático acerca de la influencia sobre el tamaño y el potencial zeta de las partículas lipídicas, de las variables asociadas tanto a la formulación como al proceso de preparación. El análisis de los comportamientos observados se ha realizado desde el punto de vista del posible mecanismo de formación de la partícula, haciendo énfasis en las interacciones moleculares entre los materiales de partida y el efecto de las variables de proceso. Es el interés aportar evidencia experimental que permita entender los factores que determinan el diseño y la preparación de partículas lipídicas y que como consecuencia, inciden en su formulación cuando se pretende su incorporación en productos farmacéuticos y cosméticos. De esta forma, se busca sentar bases sólidas para llevar a cabo procesos de transferencia de este tipo de tecnología en los que la Universidad apoye al sector industrial en el desarrollo y fabricación de productos innovadores y atractivos en términos de los beneficios que pueden lograrse como portadores de moléculas activas.



## JUSTIFICACIÓN

El interés en los últimos años por el desarrollo de las partículas lipídicas y la incursión de productos en el mercado que las incorporan en su formulación, demuestra el futuro potencial de estos sistemas en el transporte de moléculas activas. No obstante, los procesos relacionados con la encapsulación no se han logrado elucidar completamente, lo que hace pertinente avanzar en investigaciones desde un punto de vista fisicoquímico, que contribuyan en el entendimiento sobre cómo se forman estos sistemas. Esto facilita su diseño racional, específicamente en lo que corresponde a la selección tanto de los materiales de partida como de las metodologías y condiciones de proceso apropiadas para su elaboración.

Aunque el método de emulsificación-difusión ha sido utilizado para la elaboración de partículas poliméricas, los trabajos de Trotta y col. (2003) y de Quintanar y col. (2005) plantearon por primera vez su adaptación para la elaboración de partículas lipídicas. Teniendo en cuenta la practicidad de este método y que pueden emplearse materiales de partida reconocidos como seguros para uso en la formulación de medicamentos y cosméticos, en el Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA, del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia, ha surgido el interés por adelantar investigaciones conducentes al desarrollo de productos innovadores que incorporen esta tecnología. Los resultados obtenidos hasta el momento son de carácter exploratorio y evidencian la influencia del material lipídico en el tamaño de las partículas (Guzmán, 2013). Igualmente, se ha

demostrado que este tipo de partículas permite modular la liberación de activos, específicamente la quercetina (Martínez, 2014).

Sobre esta base, la presente tesis busca profundizar en los aspectos mecánicos asociados a la formación de las partículas, con el propósito de aportar evidencia y elementos de juicio para la toma de decisiones respecto a su formulación y a su aplicación como transportadores de moléculas activas. Estas investigaciones, que se reconocen de crucial importancia para el diseño racional de este tipo de partículas y para la transferencia de esta tecnología al ámbito industrial, aún son escasas en la literatura científica. Solamente se dispone de los trabajos publicados por Quintanar (2005), en los que se propone la formación de las partículas considerando los mecanismos sugeridos para partículas poliméricas. De acuerdo con esto, se espera que el presente trabajo contribuya al entendimiento de los sistemas particulados lipídicos y por consiguiente, sea un punto de partida para la implementación de esta tecnología en el desarrollo de medicamentos y cosméticos en Colombia.

## MARCO TEÓRICO

La investigación acerca de partículas lipídicas inició en los años noventa con el objetivo de obtener sistemas transportadores de moléculas activas alternativos a los liposomas y a las partículas poliméricas (Gasco, M. y col., 1992; Siekmann y col., 1992; Müller y col., 1995). Debido a su naturaleza lipídica este tipo de transportadores demostró gran versatilidad para la encapsulación de moléculas altamente lipofílicas, las que en su mayoría corresponden a aquellas moléculas de interés farmacéutico y cosmético y que precisamente por su naturaleza hidrofóbica, representan uno de los mayores desafíos en el desarrollo de productos que las contienen. Con el tiempo, el interés por la investigación sobre partículas lipídicas ha incrementado debido especialmente a la biocompatibilidad y biodegradabilidad de los materiales que se emplean (Souto y col., 2009) y a que permiten modular la liberación de los activos (Battaglia y col., 2012). En adición, los métodos empleados para su preparación son viables a la escala industrial (Shegokar y col., 2011). A la fecha se han desarrollado investigaciones en las que se estudian las aplicaciones terapéuticas de las partículas lipídicas como transportadores de agentes anticancerígenos (Zara y col., 2002; Serpe y col., 2004), como sistemas para la liberación de fármacos en tejido pulmonar (Chattopadhyay y col., 2007), como medio para acceder al sistema nervioso central (Blas y col., 2007) o para la administración tópica de moléculas activas (Pardeike y col., 2009). Igualmente se ha investigado sobre la encapsulación de péptidos y proteínas (Trotta y col., 2005; Almeida y col., 2007).

### **1.1 Definición y tipos de partículas lipídicas**

De forma general, las partículas lipídicas se definen como matrices sólidas lipídicas donde pueden ser incorporadas moléculas activas (Müller y col., 2011). Estas partículas son preparadas haciendo uso de los principios fisicoquímicos y la tecnología disponible para elaborar emulsiones del tipo aceite en agua. No obstante, los lípidos utilizados permiten lograr una estructura sólida a temperatura ambiente, la que corresponde a la partícula lipídica y al interior de la cual se incorporan las moléculas activas que pretenden ser encapsuladas. Así, en la práctica, para obtener partículas lipídicas conteniendo moléculas activas, se prepara una fase lipofílica líquida que incorpora el activo disuelto en lípidos sólidos fundidos o mezclas de lípidos sólidos fundidos y lípidos líquidos. Posteriormente, mediante algún sistema de homogenización, dicha fase lipofílica se dispersa en una fase acuosa que generalmente contiene un agente estabilizante que facilita la formación de una emulsión del tipo aceite en agua. Luego, se induce la precipitación del lípido, es decir la formación de las partículas, modificando las condiciones del proceso por ejemplo mediante cambios de temperatura o de composición del sistema (Lourdes y col., 2008; Müller y col., 2011). En esta etapa, la presencia del agente estabilizante en la fase acuosa evita la agregación de las partículas formadas (Hommos, 2009).

Las partículas obtenidas exhiben tamaños que varían desde los 50nm hasta los 1000 nm, es decir a escalas nano, submicro o micro (Battagliay col., 2012), lo que depende del método y de los materiales de partida empleados. Igualmente, los materiales y los métodos determinan si la estructura de las partículas corresponde a partículas lipídicas, a transportadores lipídicos estructurados o a conjugados lípido-fármaco (Müller y col., 2011; Battaglia y col., 2012).

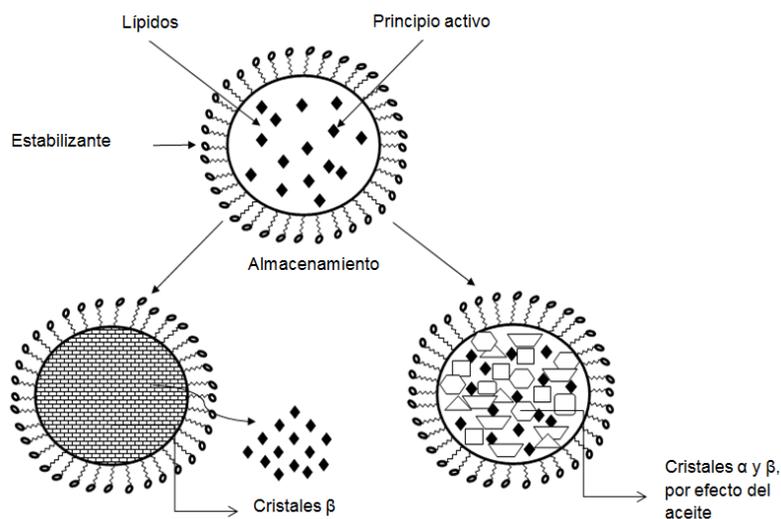
Teniendo en cuenta que las partículas lipídicas se forman a partir de lípidos sólidos, presentan desventajas dentro de las que se destacan la formación de agregados (Surajit D. y col., 2012) su tendencia a la gelificación (Westesen, K. y col., 1997; Helgason y col., 2008), las transiciones polimórficas (Helgason y col., 2008) y la capacidad de carga limitada asociada a la estructura cristalina del lípido sólido (Bunjies H. y Col., 1996; Freitas y col., 1999). Igualmente, son frecuentes los problemas relacionados con la estabilidad durante el almacenamiento, en especial por la expulsión del activo encapsulado, lo que es debido a la estabilización de la estructura cristalina (Freitas y col., 1999; Müller y col., 2002). Como se observa en la **Figura 1-1**, en la preparación de las partículas lipídicas los lípidos sólidos que conforman la matriz cristalizan en diferentes estructuras, principalmente en un estado  $\alpha$  altamente energético y en un estado  $\beta$  caracterizado por una baja energía (Müller y col., 2002; Jores y col., 2003). Durante el almacenamiento, la estructura de las partículas tiende a estabilizarse pasando a un estado de baja energía, por lo tanto las imperfecciones creadas en un principio por la presencia de cristales  $\alpha$ , con el tiempo tienden a la formación de cristales  $\beta$ . Bajo estas circunstancias el empaquetamiento es más ordenado, reduciendo el número de imperfecciones de la red cristalina, generando así la expulsión de los principios activos. (**Figura 1-1**).

Como una alternativa para solucionar estos inconvenientes se desarrollaron los transportadores lipídicos nanoestructurados (Nanostructure lipid carrier–NLC) en los que se incorporan lípidos líquidos en la matriz lipídica y en los que el activo debe ser soluble (Müller y col., 2011). Esto permite aumentar el grado de imperfecciones de la matriz, mejorando la capacidad de carga y evitando la expulsión del principio activo durante el almacenamiento (Müller y col., 2002; Hommoss., 2009).

Por último, debido a la dificultad de las partículas lipídicas sólidas y de los transportadores lipídicos estructurados para encapsular moléculas hidrofílicas, se desarrollaron los conjugados lípido-fármaco, por ejemplo, mediante la esterificación del fármaco con un ácido graso. A partir de dichos conjugados se

obtienen partículas utilizando metodologías ya desarrolladas para la elaboración de partículas lipídicas (Battaglia y col., 2012).

**Figura 1-1:** Representación esquemática de una partícula lipídica (LP), un transportador lipídico nanoestructurado (NLC) y la liberación no controlada del principio activo por cristalización de la matriz sólida en una partícula lipídica.



## 1.2 Emulsificación-difusión como método para la elaboración de partículas lipídicas

Independiente del tipo de partícula lipídica los métodos empleados para su preparación son similares a los utilizados para el desarrollo de partículas poliméricas (**Tabla 1-1**). Dentro de ellos se destacan la homogenización a altas presiones en caliente o en frío, debido a que han sido hasta el momento los más empleados, principalmente por la facilidad de escalamiento a nivel industrial (Müller y col., 2002; Pardeike y col, 2009). Para la presente tesis se ha seleccionado el método de emulsificación-difusión, que ha sido empleado para la elaboración de partículas lipídicas conteniendo principios activos, incluso de

naturaleza hidrofílica como es reportado por Trotta y col. (2005), quienes obtuvieron eficiencias de encapsulación de insulina hasta del 80% (**Tabla 1-2**).

**Tabla 1-1:**

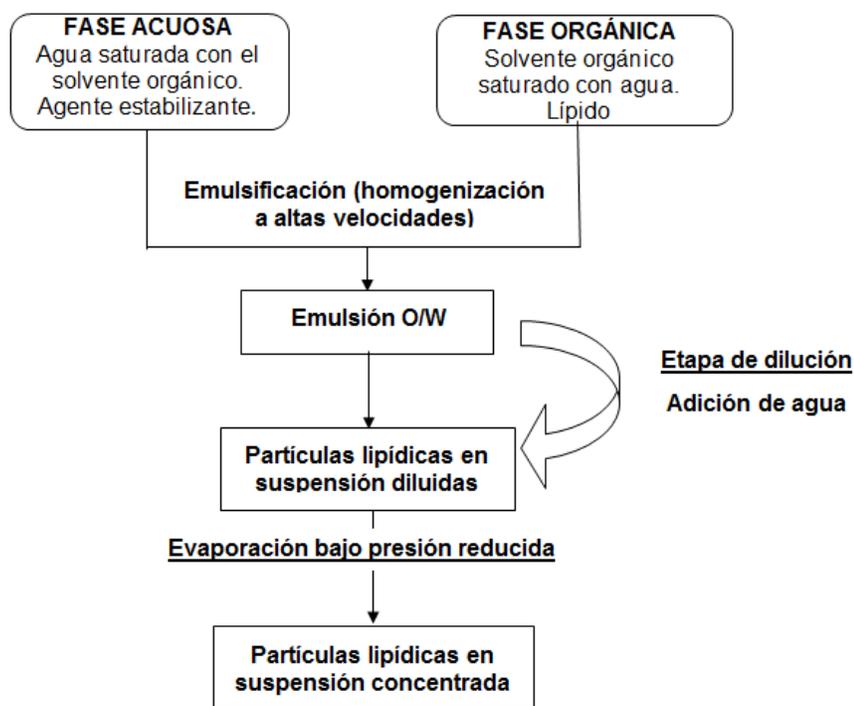
Métodos reportados en la literatura para la preparación de partículas lipídicas.

Método	Referencia
Homogenización a altas presiones en caliente	(Müller y col., 2002)
Homogenización a altas presiones en frío	(Pardeike y col., 2009)
Emulsificación–difusión	(Quintanar y col., 2005)
Ultrasonificación-homogenización a altas velocidades	(Hou y col., 2003)
Emulsificación-evaporación	(Siekman y col., 1996)
Microemulsificación	(Gasco, 1993)
Fluidos supercríticos	(Salmaso y col., 2009)
Secado por aspersion	(Mighi y col., 2006)
Doble emulsificación	(Saraf y col., 2006)
Método de dispersión fundida (Melting dispersión method)	(Reithmeier y col., 2001)
Método de contactor de membrana	(Charcosset y col., 2005)
Nanoprecipitación (Inyección de solvente)	(Schubert y col., 2003)

En la **Figura 1-2** se sintetiza el procedimiento para la preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión. Como se observa, se requieren dos fases, una orgánica y otra acuosa. La fase orgánica se prepara a partir de un solvente orgánico parcialmente miscible en agua, en el que se disuelven los materiales lipídicos y las moléculas activas (Quintanar y col., 2005). Algunos de los solventes utilizados son acetato de etilo, metil etil cetona, acetato de metilo, acetato de isopropilo y alcohol bencílico (**Tabla 1-2**). La fase acuosa consiste en una dispersión de un agente estabilizante como el poloxámero o el alcohol polivinílico. Previo a la preparación de las fases orgánica y acuosa, el solvente orgánico y el agua deben saturarse mutuamente lo que permite alcanzar el equilibrio termodinámico de ambos líquidos y gracias a lo cual, al mezclar la fase orgánica con la fase acuosa es posible la formación de una emulsión del tipo aceite en agua utilizando un sistema de agitación de elevada fuerza de corte. Posteriormente, la emulsión formada es diluida en una cantidad de agua que

asegure la disolución de todo el solvente orgánico utilizado, lo que permite su difusión desde el interior de las gotas de fase orgánica dispersa hacia la fase continua. Esto genera una condición de insolubilidad para el lípido y como consecuencia, su solidificación formando las partículas lipídicas. Finalmente, el solvente orgánico es eliminado por destilación al vacío o liofilización.

**Figura 1-1:** Representación esquemática del método de emulsificación-difusión para la preparación de partículas lipídicas.



Se han postulado dos mecanismos para explicar la formación de las partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión y que en esencia corresponden a los mismos propuestos para la formación de partículas poliméricas por este método (Quintanar y col., 1998; Moinard y col., 2008). El primero se fundamenta en el efecto Gibbs-Marangoni, que sugiere que al momento de diluir la emulsión, a partir de cada gota de fase orgánica dispersa se generan varias gotículas de

menor tamaño debido a su fragmentación progresiva a causa de la diferencia en las tensiones superficiales entre el solvente orgánico y el agua. Dicha diferencia de tensiones superficiales hace que el solvente de menor tensión superficial (solvente orgánico en este caso), penetre en el solvente de mayor tensión superficial (agua), generando una turbulencia que fracciona la fase orgánica en múltiples gotas. Cuando el punto máximo de fragmentación es alcanzado, el solvente orgánico contenido en las gotas de fase orgánica difunde libremente hacia el agua gracias a su solubilidad. Como el material lipídico se encuentra disuelto en el solvente orgánico, al momento de presentarse la difusión del solvente estos lípidos se encuentran en un medio en el que ya no son solubles y por lo tanto se produce su solidificación en forma de partículas (Quintanar y col., 2005; Mora y col., 2011).

De otro lado, Moinard y col. (2008) sugieren que la formación de las partículas por el método de emulsificación-difusión ocurre a través de la fragmentación de la fase dispersa por efecto de la elevada fuerza de corte utilizada en la etapa de emulsificación y la posterior difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa. Así, cada gota de emulsión da origen a una partícula cuyo tamaño es determinado por las condiciones de emulsificación, tales como la velocidad y el tiempo emulsificación, así como la naturaleza del agente estabilizante (Mora y col., 2011).

Teniendo en cuenta los materiales de partida y la tecnología empleada en el método de emulsificación-difusión, este presenta ciertas ventajas con respecto a los otros métodos para la preparación de partículas lipídicas. Por ejemplo, aunque como se ha mencionado, la homogenización a elevadas presiones (en caliente o en frío) que es el método más utilizado (Montaño, 2012), requiere la fusión de los materiales lipídicos a temperaturas superiores a sus puntos de fusión para facilitar la incorporación del activo. Bajo esas condiciones, los lípidos, el activo y otros materiales (e.g., los estabilizantes) pueden sufrir degradación. Además, el proceso de homogenización puede producir un aumento adicional de la temperatura del sistema, lo que hace necesario un sistema de refrigeración

(Quintanar y col., 2005). Respecto al método de ultrasonificación y homogenización a altas velocidades, se ha reportado que la reducción del tamaño de partícula no es eficiente, produciendo partículas con rangos de tamaño bastante amplios que pueden dar lugar a inestabilidades físicas durante el almacenamiento. Aunque esto se puede corregir adicionando elevadas concentraciones de surfactantes, es necesario considerar las implicaciones toxicológicas que esto conlleva. Adicionalmente, otra de las desventajas de este método es la posible contaminación por metales (e.g., titanio) y un incremento de la temperatura del sistema (Quintanar y col., 2005). En cuanto al método de emulsificación- evaporación del solvente, el uso de solventes clasificados por la guía ICHQ3C (R5) (ICH, 2011) como clase 2 (solventes tóxicos como diclorometano o acetonitrilo), puede resultar en serios problemas de toxicidad, principalmente en el desarrollo de productos para administración parenteral (Quintanar y col., 2005). De otro lado, el método de microemulsificación presenta principalmente dos inconvenientes. El primero es que necesita que el material lipídico esté fundido durante la formación de la microemulsión y el segundo es la elevada concentración de agentes surfactantes y co-surfactantes (Trotta y col., 2003).

### **1.3 Materiales de partida para la elaboración de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión**

El estudio acerca de los materiales utilizados para la elaboración de partículas lipídicas ha sido objeto de varias investigaciones en las que se trabajan especialmente materiales lipídicos que sean tanto biocompatibles como biodegradables, con la capacidad de transportar y liberar una gran variedad de moléculas activas a través de diferentes vías de administración (Müller y col., 1996; Miglietta y col., 2000; Weyhers y col., 2006; Harshad y col., 2011; Silva y col., 2011; Yang y col., 2012; Qi y col., 2012; Weber y col., 2014). Normalmente

se emplean materias primas reconocidas como seguras (GRAS, Generally Recognized as Safe) (Hommos, 2009).

Como se reporta en la **Tabla 1-2**, cuando el método de emulsificación–difusión es utilizado para la preparación de partículas lipídicas, los materiales esenciales son lípidos sólidos y líquidos (aceites) que conforman la matriz, estabilizantes, solventes orgánicos y agua (Montaño, 2012). El término lípido se utiliza con un sentido amplio, pueden ser de origen natural, semisintético o sintético e incluye triglicéridos como la triestearina (Salminen y col., 2014), glicéridos parciales como el monoestearato de glicerilo (Trotta y col., 2003), ácidos grasos como el ácido esteárico (Qiang y col., 2005), esteroides como el colesterol (Yung y col., 2014) y ceras como la cera de abejas (Tan y col., 2014) y la cera carnauba (Kheradmandnia y col., 2010; Finke y col., 2013). En la actualidad se prefieren combinaciones de ácidos grasos naturales con lípidos sintéticos para mejorar el comportamiento de la matriz, optimizando las propiedades de encapsulación y evitando la liberación no controlada de los principios activos (Lourdes y col., 2009).

Para la selección de los agentes estabilizantes se deben considerar la vía de administración y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos que van a ser encapsulados (Lourdes y col., 2009). Su concentración ha demostrado tener incidencia en la estabilidad del sistema y en la eficiencia de encapsulación de activos. Así, un aumento en la proporción de agentes estabilizantes puede favorecer la formación de partículas más estables retardando el tiempo de aparición de las transiciones polimórficas de los materiales que conforman la matriz sólida. Igualmente, puede disminuir la agregación de las partículas. No obstante, el aumento en las concentraciones del sistema estabilizante reduce la cantidad de activo atrapado y podría generar posibles eventos de toxicidad (Rosenblatt y col., 2009; Müller y col., 2011). Normalmente la preparación de partículas lipídicas se puede realizar utilizando únicamente agentes estabilizantes de naturaleza hidrofílica como polivinilpirrolidona (Quintanar y col., 2005), poloxámero 188 (Quintanar y col., 2005), alcohol polivinílico (Urbán y col., 2010),

polisorbato 80 (Trotta y col., 2003). Sin embargo, algunos investigadores recomiendan el uso de surfactantes lipofílicos como fosfolípidos (Trotta y col., 2003; Trotta y col., 2005; Shah y col., 2007; Battaglia y col., 2007), Taurodeoxicolato de sodio (Trotta y col., 2003) y Colato de sodio (Trotta y col., 2003).

Dentro de los solventes orgánicos, la literatura reporta ésteres como acetato de etilo (Quintanar y col., 2005), acetato de metilo (Quintanar y col., 2005), acetato de isopropilo (Quintanar y col., 2005) y lactato de butilo (Trotta y col., 2003), cuya selección debe atender consideraciones de seguridad si se pretende el uso de las partículas en el desarrollo de medicamentos o cosméticos. Es de destacar que algunos trabajos han utilizado ácido isovalérico, específicamente cuando se pretendía la encapsulación de moléculas hidrofílicas (Battaglia y col., 2007).

**Tabla 1-1:**

Ejemplos de materiales de partida empleados para la elaboración de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión.

Fase orgánica			Agente estabilizante	Fase de dilución	Condiciones de trabajo		Tamaño de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)	Referencia
Lípido sólido	Solvente orgánico	Otros			Emulsificación	Difusión				
GMS (2.5-10%)	BA BL		Epikuron 200 Polisorbato 80 TDC CA Oramix CG - 110	Agua	12000 rpm, 1 min	Agitación constante 60 min	205-295	(-20)-(-37)	NA	(Trotta y col., 2003)
Compritol®ATO 888 Geleol® Gelucire ® 44/14 Gelucire ® 50/13	EtAc MEK MetAc IsoAc		PVP PLX PLX-407 Polisorbato 80 BSA PVA Mw 26 KDa	Agua (160 ml)	1800 rpm, 10 min	Agitación constante	171-385	NR	NA	(Quintanar y col., 2005)
GMS GMS-Cho (9:1)	IVA	Insulina	Epikuron 200 TDC	Agua (50 ml)	15000 rpm, 1 min (HP) 5000 PSI, 1 min	NR.	375-1138	(-9)-(-45)	48-66	(Trotta y col., 2005)
GMS Compritol® ATO 888 Cutina ® CBS Dynasan ® 116	BA	Tretinoína	Polisorbato 80 Epikuron 200	Agua	3000 rpm, 1 min	Agitación constante	317-520	NR	48.9	(Shah y col., 2007)

(Continúa)

**Tabla 1-2:**

Ejemplos de materiales de partida empleados para la elaboración de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión. (continuación).

Fase orgánica			Agente estabilizante	Fase de dilución	Condiciones de trabajo		Tamaño de partícula (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)	Referencia
Lípido sólido	Solvente orgánico	Otros			Emulsificación	Difusión				
GMS GMS-Cho (9:1)	IVA	Insulina	Lecitina Epikuron 200 TDC	Agua (50 ml)	15000 rpm, 1 min (HP) 5000 PSI, 1 min	NR.	375-1138	(-9)-(-45)	48-66	Battaglia y col., 2007)
Softisan® 601	BA	Etopósido	Polisorbato 20	Solución salina 0.9%	2500 rpm, 1 min	NR	233	NR	66	(Fernandes y col., 2013)
Dynasan® 114 Esterilamina	BA	Ropinirol	PLX Phospholipon® 90	Agua	600 rpm, 30 min (HP) 8000 PSI, 1 min (9 ciclos)	Agitación mecánica	180-270	(-16)-(-47)	55-65	Pardeshi y col., 2013)
Compritol®ATO888 Gelucire® 44/14	EtAc MEK	Ciclosporina	PVA	Agua (160 ml)	1400 rpm, 10 min	NR.	280-789	23-39	92-99	(Urbán y col., 2010)
Manteca de cacao Cera de Abejas	EtAc	Anfotericina B	CA Lecitina	Agua (20 ml)	10000 rpm, 10 min	Agitación constante, Ultrasonido (amplitud 35%)	210-380	(-45)-(-70)	59	(Tan y col., 2014)

NR: Datos no reportados; NA: No aplica; Compritol® ATO 888 (behenato glicerilo), Geleol® (Mono y diestearato de glicerilo), Gelucire® 44/14 (lauroilpolioxiglicéridos), Gelucire® 50/13 (estearoilpolioxiglicéridos), GMS (monoestearato de glicerilo), Cho (colesterol), Dynasan® 116 (tripalmitato de glicerilo), Softisan® 601 (cocoato de glicerilo), Cutina® CBS (Mezclas de estearato de glicerilo, alcohol cetearílico, palmitato de cetilo y cocoglicéridos), Phospholipon® 90 (fosfatidilcolina hidrogenada), PVP (polivinilpirrolidona), PLX (poloxámero188), PLX-407 (poloxámero 407), BSA (albumina sérica bovina), PVA (alcohol polivinílico), polisorbato 80, IVA (ácido isovalérico), Epikuron 200 (lecitina de soya), TDC (taurodeoxicolato de sodio), Oramix CG-110 (glucósidos de alcohol caprílico), CA (colato de sodio), BA (alcohol bencílico), BL (lactato de butilo), EtAc (acetato de etilo), MEK (metil etil cetona), MetAc (acetato de metilo), IsoAc (acetato de isopropilo).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Contribuir al conocimiento de la emulsificación-difusión como método para la preparación de partículas lipídicas, haciendo énfasis particular en los aspectos mecanísticos asociados a la formación de las partículas.

### **Objetivos específicos**

Evaluar la influencia de las variables asociadas a los materiales de partida sobre el mecanismo de formación y los comportamientos de tamaño y potencial zeta de las partículas lipídicas.

Estudiar la influencia de las variables asociadas al método de preparación sobre el mecanismo de formación y los comportamientos de tamaño y potencial zeta de las partículas lipídicas.



# METODOLOGÍA

## 3.1 Materiales y equipos

Los materiales lipídicos evaluados en la presente investigación fueron diestearato de glicerilo (GDS, Precirol<sup>®</sup> ATO 5) gentilmente suministrado por Gattefossé (Francia); monoestearato de glicerilo (GMS, Cutina<sup>®</sup> GMS, BASF), ácido esteárico (SAc, Emersol<sup>®</sup> 132 NF, Parchem) y alcohol estearílico (SAIc, Lorol<sup>®</sup> C18, BASF), obsequio de Handler Colombia. Como agentes estabilizantes se ensayaron poloxámero 188 (PLX, Kolliphor<sup>®</sup> P188, BASF), obsequiado por HÄNDLER Colombia; alcohol polivinílico (PVA), 31-51 kDa, 87-89% de hidrólisis adquirido en Sigma-Aldrich; lauril sulfato de sodio (SLS), bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB, Cetrimida) y cloruro de alquildimetilbencil amonio (ADBAC, Cloruro de benzalconio), adquiridos en MERCK y polisorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80) adquirido en Panreac. Los solventes orgánicos evaluados fueron alcohol bencílico (BA), acetato de metilo (MetAc) y metil etil cetona (MEK) adquiridos en MERCK y acetato de etilo (EtAc) adquirido en TEDIA. Los demás reactivos empleados en este trabajo fueron grado analítico. El agua destilada usada en todos los experimentos se obtuvo a partir del sistema Milli-Q, resistividad 17 MΩcm.

**Equipos:** Homogenizador de alta velocidad ultraturrax IKA<sup>®</sup> T18; plancha de calentamiento IKA<sup>®</sup> C-MAG HS, 2102; balanza analítica PA214, OHAUS<sup>®</sup> sensibilidad 0.1 mg; zetasizer Nano ZS, Malvern<sup>®</sup>; rotaevaporador IKA RV10; plancha de calentamiento GEHAKA<sup>®</sup> MS7-H550-Pro.

### **3.2 Métodos**

En el presente trabajo se investigó la influencia de algunas variables asociadas a los materiales de partida y a las condiciones de proceso sobre los comportamientos de tamaño, índice de polidispersidad (PDI) y potencial zeta de partículas lipídicas preparadas por el método de emulsificación-difusión. Teniendo en cuenta que el procedimiento de obtención de las partículas requiere la preparación de una solución del material lipídico en los solventes orgánicos saturados con agua, ésta fue investigada siguiendo para tal fin un ensayo de carácter semicuantitativo. Igualmente, con el objetivo de explicar algunos de los resultados obtenidos, se evaluó la estabilidad de las dispersiones de partículas frente a la adición de electrolitos. En todos los casos, los ensayos realizados fueron llevados a cabo al menos por triplicado.

#### **3.2.1 Determinación de la solubilidad semicuantitativa de los lípidos en solventes orgánicos saturados con agua**

En un baño termostatado a  $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,  $30^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  ó  $40^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  dependiendo del lípido bajo estudio, se colocaron pesa-sustancias conteniendo 2 ml del solvente orgánico que previamente había sido saturado con agua durante 24 h. Una vez el sistema alcanzó la temperatura del estudio, progresivamente se adicionaron cantidades exactamente pesadas, de aproximadamente 10 mg, del material lipídico. Después de cada adición, las muestras fueron tapadas y agitadas magnéticamente para facilitar la disolución del lípido en el solvente (100 rpm, plancha de calentamiento IKA<sup>®</sup> C-MAG HS, 2102). Para determinar el punto final del ensayo, las muestras fueron inspeccionadas con un haz de luz que se

hacia pasar a través del medio de ensayo, siendo la pérdida de transparencia de la solución, el punto final del ensayo.

### 3.2.2 Preparación de las dispersiones de partículas lipídicas

La preparación de las partículas lipídicas se realizó por el método de emulsificación-difusión utilizando la metodología propuesta por Quintanar y col. (2005). Inicialmente, el material lipídico fue disuelto a la temperatura requerida según su solubilidad, en un volumen específico del solvente orgánico previamente saturado con agua. La fase orgánica resultante fue emulsificada utilizando elevada fuerza de corte (Homogenizador Ultraturrax IKA<sup>®</sup> T18) con una fase acuosa saturada con el solvente orgánico y que contenía el agente estabilizante. En los casos en los que fue necesario, durante la emulsificación se garantizó la temperatura de solubilidad del lípido utilizando un baño de agua termostatado (plancha de calentamiento IKA<sup>®</sup> C-MAG HS, 2102). La emulsión resultante fue adicionada rápidamente y bajo agitación magnética (plancha de calentamiento, GEHAKA<sup>®</sup> MS7-H550-Pro) a 300 ml de agua a una temperatura específica. Las partículas lipídicas se formaron inmediatamente. El solvente orgánico y parte del agua fueron removidos bajo presión reducida a una temperatura de  $45^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  hasta un volumen final de 20 ml (Rotaevaporador IKA<sup>®</sup> RV10). En las **Tablas 3-1 y 3-2** se presenta una síntesis del diseño experimental utilizado para evaluar el efecto de los materiales de partida y las condiciones de operación sobre el comportamiento de las partículas.

**Tabla 3-1:**  
Condiciones para evaluar la Influencia de los materiales de partida en la preparación de partículas lipídicas

Parámetro estudiado	Condiciones de los materiales de partida				Concentración agente estabilizante (%)	
	Tipo de lípido	Cantidad de lípido (g)	Solvente orgánico (10 ml)	Tipo de agente estabilizante		
Tipo y cantidad de lípido	GDS	0.1	EtAc	PLX	5	
	GDS	0.25	EtAc	PLX	5	
	GDS	0.5	EtAc	PLX	5	
	GDS	0.75	EtAc	PLX	5	
	GDS	1	EtAc	PLX	5	
	GDS	1.5	EtAc	PLX	5	
	SAlc	0.1	EtAc	PLX	5	
	SAlc	0.25	EtAc	PLX	5	
	SAlc	0.5	EtAc	PLX	5	
	SAlc	1	EtAc	PLX	5	
	SAlc	1.5	EtAc	PLX	5	
	SAc	0.1	EtAc	PLX	5	
	SAc	0.25	EtAc	PLX	5	
	SAc	0.5	EtAc	PLX	5	
	SAc	1	EtAc	PLX	5	
SAc	1.5	EtAc	PLX	5		
Solvente orgánico	GDS	0.1	EtAc	PLX	5	
	SAlc	0.1	EtAc	PLX	5	
	SAc	0.1	EtAc	PLX	5	
	GDS	0.1	MEK	PLX	5	
	SAlc	0.1	MEK	PLX	5	
	SAc	0.1	MEK	PLX	5	
	GDS	0.1	MetAc	PLX	5	
	SAlc	0.1	MetAc	PLX	5	
	SAc	0.1	MetAc	PLX	5	
Tipo de agente estabilizante	GDS	0.25	EtAc	PVA	5	
	GDS	0.25	EtAc	PLX	5	
	GDS	0.25	EtAc	SDS	5	
	GDS	0.25	EtAc	Polisorbato 80	5	
	GDS	0.25	EtAc	CTAB	5	
	GDS	0.25	EtAc	ADBAC	5	
	SAlc	0.25	EtAc	PVA	5	
	SAlc	0.25	EtAc	PLX	5	
	SAlc	0.25	EtAc	SDS	5	
	SAlc	0.25	EtAc	Polisorbato 80	5	
	SAlc	0.25	EtAc	CTAB	5	
	SAlc	0.25	EtAc	ADBAC	5	
	Concentración de agente estabilizante	GDS	0.25	EtAc	PLX	1
		GDS	0.25	EtAc	PLX	2.5
		GDS	0.25	EtAc	PLX	5
GDS		0.25	EtAc	PLX	7.5	
GDS		0.25	EtAc	PLX	10	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	1	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	2.5	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	5	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	7.5	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	10	
GDS		0.25	EtAc	PVA	1	
GDS		0.25	EtAc	PVA	2.5	
GDS		0.25	EtAc	PVA	5	
GDS		0.25	EtAc	PVA	7.5	
GDS		0.25	EtAc	PVA	10	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	1	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	2.5	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	5	
SAlc	0.25	EtAc	PVA	7.5		
SAlc	0.25	EtAc	PVA	10		

\*Las condiciones asociadas al método de preparación se mantuvieron constantes: La relación de fases fue 0.25:1, velocidad de agitación 11200 rpm, tiempo de agitación 10 min, temperatura de la fase de dilución (ambiente  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ) y velocidad de agitación de la fase de dilución (750 rpm).

**Tabla 3-2:**  
**Condiciones para evaluar las variables asociadas al método de preparación**

Parámetro estudiado	Condiciones de las variables asociadas al método de preparación				
	Volumen de solvente orgánico (ml)	Velocidad de emulsificación (rpm)	Tiempo de emulsificación (min)	Temperatura de la fase de dilución (°C)	Velocidad de agitación durante la etapa de dilución (rpm)
Relación de fases (O/W)	5	11,200	10	TL	750
	10	11,200	10	TL	750
	15	11,200	10	TL	750
	20	11,200	10	TL	750
	30	11,200	10	TL	750
	40	11,200	10	TL	750
Velocidad de emulsificación	10	3,200	10	TL	750
	10	7,200	10	TL	750
	10	11,200	10	TL	750
	10	15,600	10	TL	750
	10	20,000	10	TL	750
	10	24,000	10	TL	750
Tiempo de emulsificación	10	11,200	2.5	TL	750
	10	11,200	5	TL	750
	10	11,200	7.5	TL	750
	10	11,200	10	TL	750
	10	11,200	12.5	TL	750
	10	11,200	15	TL	750
Temperatura de la fase de dilución	10	11,200	10	20	750
	10	11,200	10	30	750
	10	11,200	10	40	750
	10	11,200	10	50	750
	10	11,200	10	60	750
Velocidad de agitación durante la etapa de dilución	10	11,200	10	TL	0
	10	11,200	10	TL	750
	10	11,200	10	TL	1,500

\*Los materiales de partida se mantuvieron constantes en todos los ensayos. Tipo y cantidad de lípido (GDS, 0.25 g), solvente orgánico (EtAc, 10 ml), tipo y concentración de agente estabilizante (PVA, 5%).

TL = temperatura ambiente  $18 \pm 2^\circ\text{C}$ ,

### 3.2.3 Caracterización de las partículas lipídicas

Las partículas obtenidas durante el presente estudio fueron caracterizadas respecto a su tamaño, distribución de tamaño y potencial zeta. Así, el tamaño y el índice de polidispersidad fue determinado mediante la método dispersión dinámica de luz (DLS, Dynamic Light Scattering) usando un equipo Zetasizer Nano ZS, Malvern<sup>®</sup>. Las muestras se diluyeron en agua según se recomienda en el protocolo de manejo del equipo y se realizaron 5 mediciones/muestra, 5 corridas de 10 s/medición a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$  y un ángulo de  $173^\circ$ . De otro lado, la determinación del potencial zeta se realizó utilizando el mismo equipo, mediante la determinación de la movilidad electroforética. Para tal fin, las

muestras se diluyeron en una solución 1 mM de cloruro de sodio a un pH de  $6.4 \pm 0.2$  y se realizaron 5 mediciones/muestra, 10 corridas de 10 s/medición a una temperatura de 25°C.

### **3.2.4 Evaluación de la estabilidad de las dispersiones de partículas lipídicas frente a electrolitos**

La estabilidad coloidal de las suspensiones de partículas fue evaluada mediante un ensayo de agregación inducida con sulfato de sodio, siguiendo el procedimiento propuesto por Avgoustakis y col. (2003). En este caso, 0.1 ml de la dispersión de partículas fue adicionada a 2.5 ml de una solución de sulfato de sodio manteniendo una agitación constante de 100rpm, a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  (plancha de calentamiento IKA<sup>®</sup> C-MAG HS, 2102). Al cabo de 10 min se determinó visualmente la concentración mínima de coagulación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los últimos años, las partículas lipídicas han despertado particular interés en el campo farmacéutico por la potencial aplicación que tienen como transportadores de moléculas activas. En este sentido, su desempeño depende en gran medida de sus propiedades físicas y fisicoquímicas (Battaglia y col., 2012). Hasta el momento, diferentes investigadores han centrado la atención en el estudio del comportamiento de tamaño, reportando su estrecha dependencia con los materiales de partida y las condiciones de preparación (Schwarz y col., 1994; Schubert y col., 2003; Trotta y col., 2003; Quintanar y col., 2005; Weyhers y col., 2006; Rosenblatt y col., 2009; Surajit y col., 2011; Martins y col., 2011; Kovacevic y col., 2011).

En la misma dirección y como una contribución al entendimiento de las propiedades de estos sistemas coloidales, la presente investigación reporta un estudio sistemático acerca de la preparación de partículas por el método de emulsificación-difusión, con el propósito de establecer la influencia de algunas variables asociadas a los materiales de partida y a las condiciones de proceso, sobre su comportamiento. Así, en adición al tamaño de partícula, se ha considerado el potencial zeta y a diferencia de otros análisis, el enfoque de este trabajo está basado en las propiedades fisicoquímicas y la afinidad química de los materiales utilizados.

Como se ha mencionado en los aspectos metodológicos, en una primera etapa de la investigación se estudió la solubilidad de los lípidos en los solventes orgánicos saturados con agua, una condición requerida para la preparación de

partículas por el método de emulsificación-difusión. Sobre esta base, se llevó a cabo el estudio del método modificando sistemáticamente cada una de las variables de interés. Para facilitar la interpretación de los resultados, estos han sido organizados considerando primero su influencia en el tamaño e índice de polidispersidad y posteriormente en el comportamiento electrocinético de las partículas lipídicas.

#### **4.1 Determinación de la solubilidad de los lípidos en solventes orgánicos saturados con agua**

El estudio del método de emulsificación-difusión para la preparación de partículas lipídicas exige la determinación de la solubilidad semicuantitativa de los lípidos en los solventes orgánicos previamente saturados con agua, con el fin de establecer la cantidad de lípido que puede ser disuelta. Con este propósito se llevó a cabo un ensayo semicuantitativo para evaluar la solubilidad, cuyos resultados se reportan en la **Tabla 4-1**. En términos generales, ninguno de los lípidos bajo estudio se disolvió a temperaturas cercanas a la ambiente ( $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ). Como se observa, GMS y GDS requirieron temperaturas de  $40^{\circ}\text{C}$  para disolver una cantidad de lípido útil para la preparación de partículas. Por su parte, SAc y SAIC exhibieron los mejores resultados considerando la temperatura de trabajo y la cantidad disuelta.

Los resultados de solubilidad obtenidos (**Tabla 4-1**) podrían ser explicados a partir de la interacción lípido-solvente, considerando los parámetros de solubilidad de los materiales de partida. Adicionalmente, se revisaron algunas propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos y de los lípidos evaluados (**Tablas 4-3 y 4-4**).

**Tabla 4-1:**

Solubilidad semicuantitativa de los lípidos en los diferentes solventes orgánicos previamente saturados con agua

Lípido estudiado	Solubilidad semicuantitativa en solventes orgánicos saturados con agua (mg/ml)			
	EtAc	MEK	BA	MetAc
GMS	30 (40°C)	30 (40°C)	20 (40°C)	40 (40°C)
GDS	20 (40°C)	30 (40°C)	20 (40°C)	30 (40°C)
SAC	90 (30°C)	100 (30°C)	70 (30°C)	110 (30°C)
SAlc	80 (30°C)	90 (30°C)	70 (30°C)	100 (30°C)

\*Precisión del baño termostataado:  $\pm 0.5^\circ\text{C}$

El concepto de parámetro de solubilidad ( $\delta$ ), postulado por Hildebrand en el año 1936, es definido como la raíz cuadrada de la densidad de energía cohesiva. (**Ecuación 1.1**) (Martin y col., 1993; van Krevelen y te Nijenhuis, 2009).

$$\delta = \left( \frac{E_{coh}}{V_m} \right)^{1/2} = \left( \frac{\Delta H_{vap} - RT}{V_m} \right)^{1/2} \quad (1.1)$$

Donde  $\delta$  es el parámetro de solubilidad;  $E_{coh}$ , la energía cohesiva;  $\Delta H_{vap}$ , la entalpía de vaporización;  $V_m$ , el volumen molar;  $R$ , la constante de los gases ideales y  $T$ , la temperatura absoluta en  $^\circ\text{K}$  (van Krevelen y te Nijenhuis, 2009).

El parámetro de solubilidad ( $\delta$ ) fue planteado en un principio para evaluar el comportamiento de líquidos simples (solventes no polares y no estructurados) en los que las fuerzas intermoleculares predominantes son fuerzas de dispersión (fuerzas de London). No obstante, su aplicación fue extendiéndose al estudio de solventes polares y polímeros (Barton, 1975) y hoy se considera una aproximación útil para estimar la interacción entre componentes. Gracias a los aportes de la teoría de Hansen, se amplió el concepto del parámetro de solubilidad propuesto por Hildebrand, desglosándolo en tres parámetros parciales de solubilidad que consideran de manera diferente las posibles interacciones

intermoleculares, definiéndolas como fuerzas de dispersión ( $\delta_d$ ), fuerzas polares ( $\delta_p$ ) y las interacciones a causa de la formación de puentes de hidrógeno ( $\delta_h$ ). Así, como se deduce en la **Ecuación 1.2**, el parámetro de solubilidad establece que la densidad de energía cohesiva corresponde a la suma de los cuadrados de los parámetros parciales de solubilidad (Hansen, 1969; van Krevelen y te Nijenhuis, 2009;).

$$\delta_T^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (1.2)$$

Algunas aproximaciones, en su mayoría *“in silico”*, se han realizado correlacionando el parámetro de solubilidad en la preparación de partículas poliméricas (Mora y col., 2012) y lipídicas (Shah y col., 2013). Al comparar los parámetros de solubilidad parciales de dos componentes, por ejemplo el lípido y el solvente orgánico, es predecible que valores similares permitan predecir un buen comportamiento de solubilidad. Por tal razón, en el presente trabajo se estimaron los parámetros parciales de solubilidad para los materiales de partida de interés, utilizando el método de contribución de grupos reportado por Hoftyzer - van Krevelen (van Krevelen y te Nijenhuis, 2009) utilizando las **Ecuaciones 1.3 a 1.5**.

$$\delta_d = \frac{\sum F_{di}}{V_m} \quad (1.3)$$

$$\delta_p = \frac{\sqrt{\sum F_{pi}^2}}{V_m} \quad (1.4)$$

$$\delta_h = \sqrt{\frac{\sum E_{hi}}{V_m}} \quad (1.5)$$

Donde  $F_{di}$  es la contribución de grupos para las fuerzas de dispersión,  $F_{pi}$  es la contribución de grupos para fuerzas polares,  $E_{hi}$  es la energía de puentes de hidrógeno por grupo estructural y  $V_m$  corresponde al volumen molar.

Los resultados obtenidos se sintetizan en la **Tabla 4-2**. Para el caso de los lípidos, los que en realidad constituyen mezclas de diferentes lípidos, los parámetros de solubilidad fueron estimados para cada uno de los componentes principales.

Para una mejor interpretación de la afinidad entre los lípidos y solventes, en la **Figura 4-1** se representan los datos de parámetros parciales de solubilidad en forma del gráfico de Teas, los que son construidos a partir de los valores de fracción  $f_d$ ,  $f_p$  y  $f_h$ , que corresponden a una relación entre cada uno de los parámetros respecto a la sumatoria de los tres parámetros parciales de solubilidad de Hansen ( $\delta_d$ ,  $\delta_p$  y  $\delta_h$ ). Dichas fracciones fueron utilizando las **Ecuaciones 1.6 a 1.8**. (Mora y col., 2012). Entre más próxima sea la ubicación de dos puntos, es decir de dos materiales de partida, en el diagrama ternario, se predice una mayor afinidad química entre ellos.

$$f_d = \frac{100x \delta_d}{\delta_d + \delta_p + \delta_h} \quad (1.6)$$

$$f_p = \frac{100x \delta_p}{\delta_d + \delta_p + \delta_h} \quad (1.7)$$

$$f_h = \frac{100x \delta_h}{\delta_d + \delta_p + \delta_h} \quad (1.8)$$

**Tabla 4-2:**

Parámetros parciales de solubilidad para los lípidos y los solventes orgánicos (estimación realizada por el método Hoftyzer-van Krevelen)

Materiales de partida	Formula	Parámetros calculados de Solubilidad						
		$\delta_d$	$\delta_p$	$\delta_h$ (Mpa) <sup>1/2</sup>	$\delta_{Total}$	$f_d$	$f_p$ %	$f_h$
Agua	H <sub>2</sub> O	12.3	31.3	34.2	45.9	15.8	40.2	44.0
<b>Solventes orgánicos</b>								
EtAc	CH <sub>3</sub> COOCH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	15.2	5.3	9.2	18.6	51.2	17.8	31.0
MetAc	CH <sub>3</sub> COOCH <sub>3</sub>	15.5	7.2	7.6	18.7	51.2	23.8	25.1
MEK	CH <sub>3</sub> COCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15.9	9.0	5.1	19.0	53.0	30.0	17.0
BA	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> OH	18.4	6.3	13.7	23.8	47.9	16.4	35.7
<b>Lípidos</b>								
<b>Cutina GMS</b>								
SAC + PAc >= 90%								
GMS (40-55%)	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	17.1	3.1	11.4	20.8	54.1	9.8	36.1
GDS (30-45%)	C <sub>39</sub> H <sub>76</sub> O <sub>5</sub>	16.8	1.7	7.2	18.4	65.5	6.5	28.0
GTS (5-15%)	C <sub>57</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	16.7	1.5	4.7	17.4	72.9	6.7	20.4
GMP (40-55%)	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	17.2	3.4	12.0	21.2	52.8	10.4	36.8
GDP (30-45%)	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	16.8	1.8	7.6	18.5	64.1	7.0	28.8
GTP (5-15%)	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	16.7	1.7	4.9	17.5	71.5	7.3	21.2
<b>Precirol ATO 5</b>								
SAC + PAc >= 90%								
GMS (8-22%)	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>4</sub>	17.1	3.1	11.4	20.8	54.1	9.8	36.1
GDS (40-60%)	C <sub>39</sub> H <sub>76</sub> O <sub>5</sub>	16.8	1.7	7.2	18.4	65.5	6.5	28.0
GTS (25-35%)	C <sub>57</sub> H <sub>110</sub> O <sub>6</sub>	16.7	1.5	4.7	17.4	72.9	6.7	20.4
GMP (8-22%)	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	17.2	3.4	12.0	21.2	52.8	10.4	36.8
GDP (40-60%)	C <sub>35</sub> H <sub>68</sub> O <sub>5</sub>	16.8	1.8	7.6	18.5	64.1	7.0	28.8
GTP (25-35%)	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	16.7	1.7	4.9	17.5	71.5	7.3	21.2
<b>Emersol 132 NF</b>								
SAC + PAc >= 93%								
SAC (>40%)	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	16.5	1.3	5.6	17.5	70.5	5.6	23.9
PAc (>40%)	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	16.5	1.5	5.9	17.5	69.1	6.1	24.8
<b>Lorol C18</b>								
SAlc (98.2 %)	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O	16.5	1.6	7.9	18.3	63.4	6.1	30.6
CetAlc(0.4%)	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O	16.4	1.8	8.4	18.5	61.8	6.6	31.5
icosan-1-ol (0.5%)	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O	16.5	1.4	7.6	18.2	64.7	5.6	29.7

EtAc (acetato de etilo), MetAc (acetato de etilo), MEK (metil etil cetona), BA (alcohol bencílico), SAC (ácido esteárico), PAc (ácido palmítico), GMS (monoesteárate de glicerilo), GDS (diesteárate de glicerilo), GTS (triesteárate de glicerilo) GMP (monopalmitato de glicerilo), GDP (dipalmitato de glicerilo), GTP (tripalmitato de glicerilo), SAlc (alcohol esteárico), CetAlc (alcohol cetílico).

Como se observa en la **Tabla 4-2** las contribuciones relacionadas con las fuerzas de dispersión son las que predominan tanto en los solventes orgánicos como en los lípidos evaluados ( $f_d > 50\%$ ). Estos valores sugieren que este podría ser un mecanismo para explicar cómo los solventes orgánicos pueden interactuar con los lípidos. Teniendo en cuenta los resultados de la solubilidad de los lípidos en BA, que fueron las más bajas respecto a los otros solventes estudiados, y los parámetros de solubilidad calculados, particularmente  $\delta_h$ , es posible deducir que

la formación de puentes de hidrogeno no es la afinidad que permite la solubilidad de los lípidos. De otro lado, la gran diferencia entre las fuerzas polares de los lípidos y de los solventes orgánicos, sugiere que este no es el mecanismo predominante de interacción entre estos componentes.

Así se observa en la **Figura 4-1** al tener en cuenta la composición completa de los lípidos, SAic y SAc tienen parámetros parciales de solubilidad cercanos a los de los solventes orgánicos, lo que explica los resultados de solubilidad obtenidos. Por el contrario, los triglicéridos de los ácidos esteárico y palmítico, que corresponden al 15% y 35% de la composición de GMS y GDS respectivamente, explican los bajos valores de solubilidad encontrados experimentalmente. Estos componentes lipídicos tienen los parámetros parciales de solubilidad más alejados de los solventes orgánicos evaluados, lo que puede interpretarse como una interacción lípido-solvente más débil.

De otro lado, aunque el análisis de los parámetros solubilidad permite un acercamiento al grado de interacción entre los materiales de partida, es importante tener en cuenta que sus propiedades fisicoquímicas también pueden influenciar el comportamiento de solubilidad del lípido en el solvente orgánico. Así, como se observa en la **Tabla 4-3**, el punto fusión estaría relacionado con el grado de cohesión intermolecular de los lípidos. Siendo los puntos de fusión de SAc > SAic > GMS > GDS se presumiría que para SAc las interacciones soluto-soluto fueran mayores disminuyendo la solubilidad del mismo. Sin embargo, la afinidad que se establece entre el lípido y el solvente orgánico es capaz de superar esta interacción soluto-soluto y como resultado disolver SAc. Como se explicó anteriormente, los resultados de solubilidad semicuantitativa fueron mejores empleando SAc y SAic.

**Tabla 4-3:**

Propiedades fisicoquímicas de interés de los lípidos empleados.

Lípido	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	Punto de fusión (°C)
GMS	NR	55-60 <sup>c</sup>
GDS	0.800-1.200 <sup>b</sup>	52-55 <sup>c</sup>
SAlc	0.8124 <sup>a</sup>	59.4-59.8 <sup>c</sup>
SAC	0.9408 <sup>a</sup>	69-70 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> (Haynes y col., 2013)<sup>b</sup> (Calderone y col., 2007)<sup>c</sup> (Rowe y col., 2009)

\*NR = No reportado

Las propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos pueden afectar también la solubilidad de los lípidos. Como se observa en la **Tabla 4-4**, los valores de viscosidad toman cierta relevancia en los resultados obtenidos. El BA presenta los valores más altos de viscosidad y los peores resultados en cuanto a la capacidad de disolver los lípidos. Los otros solventes orgánicos (EtAc, MetAc y MEK) no presentan diferencias importantes entre sus valores de viscosidad.

**Tabla 4-4:**

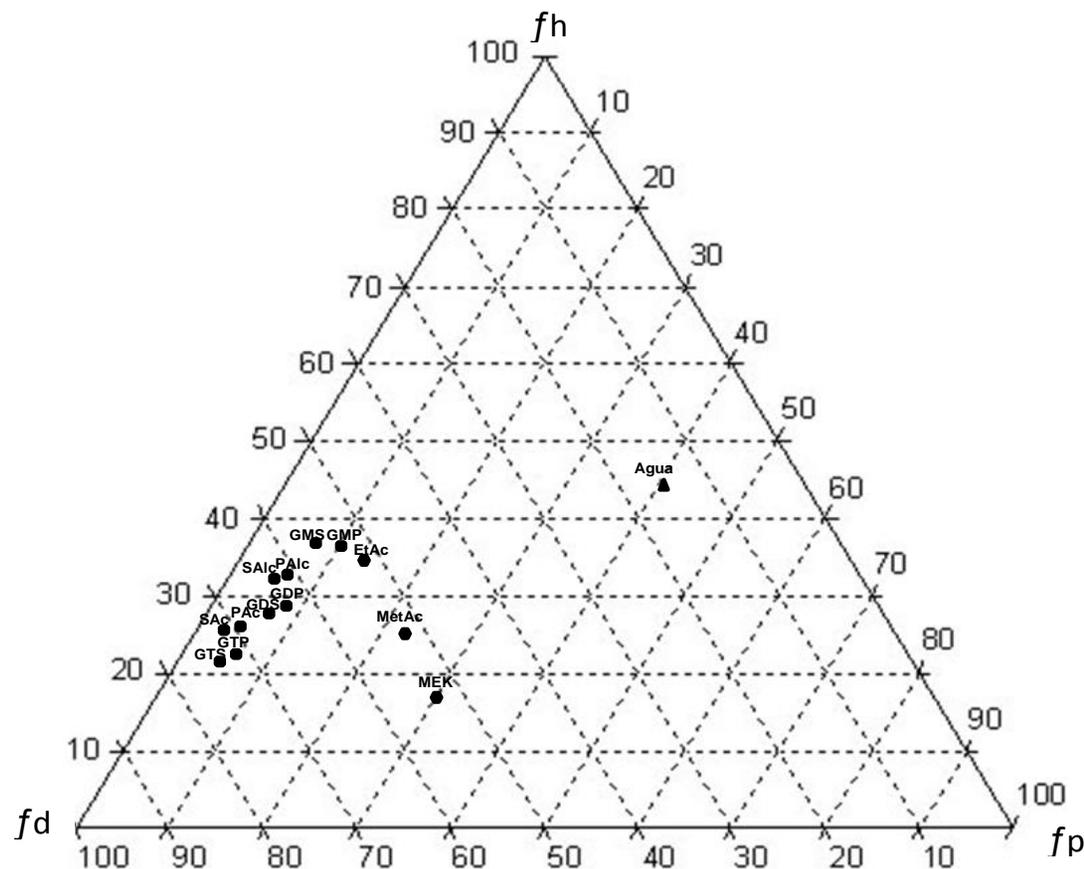
Propiedades fisicoquímicas de interés para los solventes orgánicos empleados.

Solvente Orgánico	$\rho$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\gamma$ (10 <sup>-3</sup> ; N/m; 20°C)	$\eta$ (mPas; 20°C)	Miscibilidad en agua (%; 20°C)	Clase de solvente (ICH)
MetAc	0.934 <sup>a</sup>	24.6 <sup>a</sup>	0.36 <sup>a</sup>	24.3 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
EtAc	0.901 <sup>a</sup>	23.9 <sup>a</sup>	0.44 <sup>a</sup>	8.2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
MEK	0.805 <sup>a</sup>	~24.3 <sup>a</sup>	0.42 <sup>a</sup>	27.5 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
BA	1.05 <sup>a</sup>	39 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	4.3 <sup>d</sup>	NR

<sup>a</sup> (Van Krevelen y col., 2009)<sup>b</sup> (Quintanar y col., 2005)<sup>c</sup> (ICH Q3C(R5), 2011)<sup>d</sup> (Sujit, 1984)

\*NR = No reportado

**Figura 4-1:** Diagramas ternario de Teas construido a partir de los valores  $f_d$ ,  $f_p$  y  $f_h$  para los lípidos y los solventes orgánicos evaluados.



EtAc (acetato de etilo), MéAc (acetato de etilo), MEK (metil etil cetona), BA (alcohol bencílico), SAc (ácido esteárico), PAc (ácido palmítico), GMS (monoestearato de glicerilo), GDS (diestearato de glicerilo), GTP (tripalmitato de glicerilo) GMP (monopalmitato de glicerilo), GDP (dipalmitato de glicerilo), GTP (tripalmitato de glicerilo), SAic (alcohol estearílico), CetAlc (alcohol cetílico).

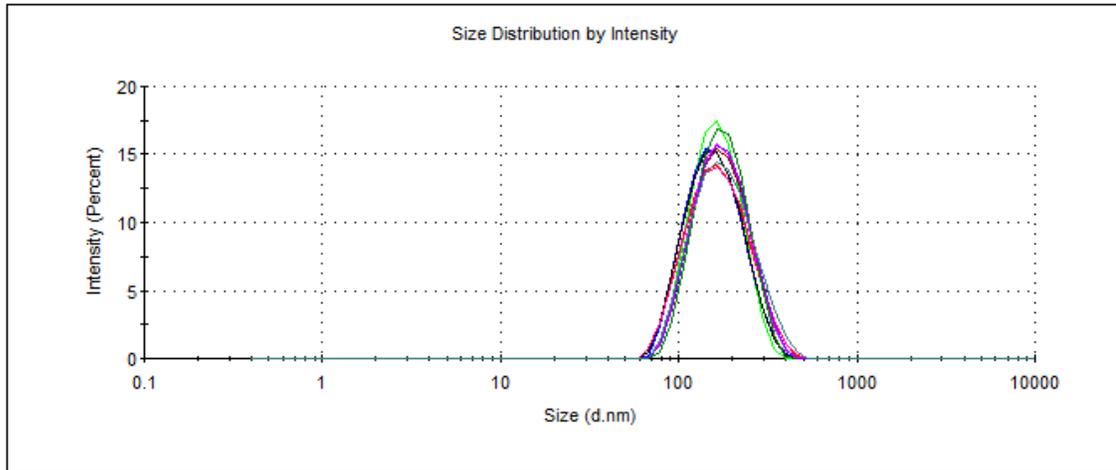
Es importante aclarar que los valores reportados en la **Tabla 4-4** corresponden a las propiedades determinadas en solventes puros. Como se indicó anteriormente, los solventes orgánicos empleados fueron previamente saturados con agua, lo que posiblemente afectaría no solo las propiedades fisicoquímicas de los solventes orgánicos sino la interacción que se establece entre el lípido-solvente orgánico. Es predecible que al incorporar agua en el solvente orgánico se disuelva una menor cantidad de lípido que si se utilizara el solvente orgánico puro.

#### **4.2 Estudio sistemático de la preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión**

Los resultados obtenidos acerca de la solubilidad de los lípidos en solventes orgánicos saturados con agua permitieron establecer el punto de partida para seleccionar las condiciones de trabajo durante el presente estudio, garantizando la formación de partículas que exhibieran una distribución unimodal de su tamaño, tal como se presenta en la **Figura 4-2**. En la **Tabla 4-5** se presenta una síntesis de tales condiciones, las que son denominadas condiciones estándar de preparación. Como solvente orgánico, lípido y agente estabilizante se seleccionaron EtAc, GDS y PLX, debido a que al ser los materiales de partida comúnmente empleados para la preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión, permiten realizar comparaciones con los trabajos publicados por otros investigadores. De otro lado, conociendo que la solubilidad en el solvente orgánico de dos de los lípidos de interés requería la preparación de las partículas a 40°C, se estableció una temperatura de trabajo de 45°C ± 0.1°C en todos los casos.

**Figura 4-2:** Distribución de tamaño de las partículas lipídicas preparadas con GDS-EtAc al 2.5% de contenido de lípido con respecto a la fase orgánica. La distribución fue simétrica y centrada alrededor de 170 nm.

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
<b>Z-Average (d.nm):</b> 153,1	<b>Peak 1:</b> 176,3	100,0	68,56
<b>Pdl:</b> 0,123	<b>Peak 2:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Intercept:</b> 0,959	<b>Peak 3:</b> 0,000	0,0	0,000
<b>Result quality:</b> Good			



**Tabla 4-5:**

Condiciones estándar de preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión.

Variables	Condición estandar
Tipo y cantidad de lípido	GDS (0.25 g)
Solvente orgánico	EtAc (10 ml)
Tipo y concentración de agente estabilizante	PLX (5%, p/v)
Relación de las fases orgánica / acuosa	0.25:1
Volumen de fase acuosa	40 ml
Velocidad de agitación	11200 rpm
Tiempo de agitación	10 min
Volumen de dilución	300 ml
Temperatura de la fase de dilución	Ambiente
Velocidad de agitación en la fase de dilución	750 rpm

#### **4.2.1 Influencia de los materiales de partida y las condiciones de operación sobre el tamaño y la polidispersidad de las partículas**

El tamaño de las partículas lipídicas, así como su polidispersidad, son propiedades críticas desde el punto de vista del diseño de nuevos sistemas de entrega de fármacos, debido a que determinan la uniformidad y la eficiencia de la liberación de las moléculas activas (Gaumet y col., 2008). En el presente estudio, tal como se explicó en los apartes metodológicos, fue investigada la influencia tanto de la naturaleza y la concentración de los materiales de partida como de las condiciones de operación, sobre estas dos propiedades de las partículas.

##### **a. Influencia de los materiales de partida sobre el tamaño y la polidispersidad de las partículas**

En términos generales, la preparación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión requiere como materiales de partida un agente lipídico, un solvente orgánico parcialmente miscible con agua y un agente estabilizante. Sobre esta base, en la presente tesis fue estudiada la influencia de la naturaleza y concentración de cada uno de ellos sobre el comportamiento de tamaño de las partículas. A continuación se presentan y analizan los resultados obtenidos.

### - **Influencia del material lipídico**

La influencia del material lipídico sobre el tamaño de las partículas fue estudiada a partir de un ensayo en el que se varió la naturaleza del lípido manteniendo constante el EtAc como solvente orgánico. De acuerdo con los resultados presentados en la **Tabla 4-6**, la naturaleza del lípido es un factor determinante tanto para la formación de las partículas como para su estabilidad en dispersión acuosa. Así, aunque todos los materiales permitieron la formación de las partículas, aquellas preparadas a partir de GMS exhibieron fenómenos de agregación durante la etapa de concentración a presión reducida, los que fueron evidentes en un periodo de tiempo inferior a las 48 horas de preparadas, presentando un tamaño de partícula y PDI antes de concentrar de  $(202 \pm 95)$  nm y 0.256 y después de concentrar de  $(472 \pm 112)$  nm y 0.293.

Igualmente, la naturaleza del lípido influyó el tamaño de las partículas. Como se ilustra en la **Figura 4-3**, el tamaño de las partículas obtenidas guardó el orden: SAc > SAic > GDS. Las diferencias encontradas según el lípido podrían ser explicadas por sus posibles interacciones con los otros materiales de la formulación y por sus propiedades físicas, como se explica a continuación.

**Tabla 4-6:**

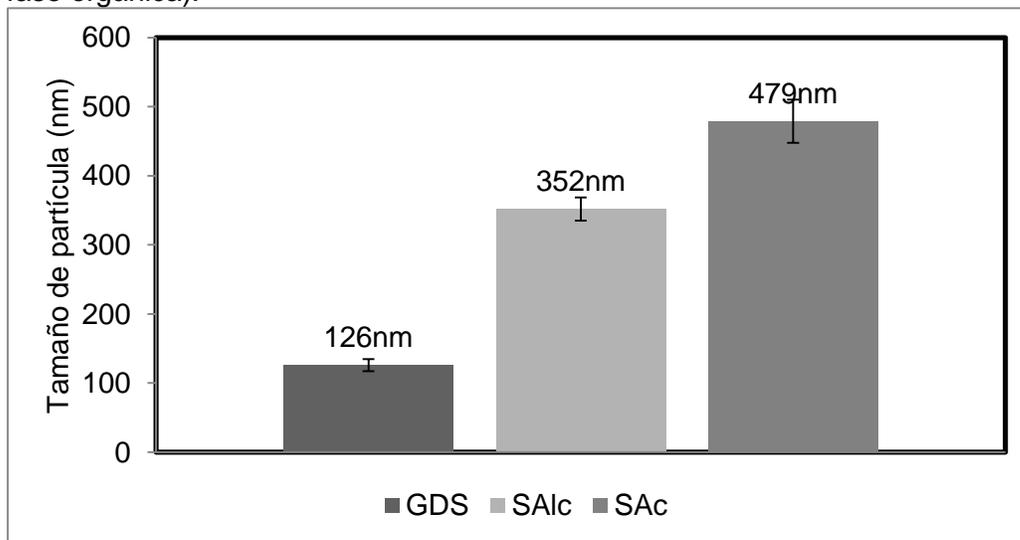
Resultados de la Influencia de los materiales de partida sobre el tamaño, la polidispersidad y el potencial zeta de las partículas.

Parámetro estudiado	Condiciones de los materiales de partida					Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)	
	Tipo de lípido	Cantidad de lípido (g)	Solvente orgánico (10 ml)	Tipo de agente estabilizante	Concentración agente estabilizante (%)				
Tipo y cantidad de lípido	GDS	0.1	EtAc	PLX	5	126 ± 9	0.246	-12.7 ± 2.3	
	GDS	0.25	EtAc	PLX	5	159 ± 5	0.143	-11.4 ± 1.9	
	GDS	0.5	EtAc	PLX	5	197 ± 8	0.127	-13.8 ± 4.5	
	GDS	0.75	EtAc	PLX	5	213 ± 4	0.132	-10.5 ± 2.7	
	GDS	1	EtAc	PLX	5	256 ± 19	0.145	-11.1 ± 1.7	
	GDS	1.5	EtAc	PLX	5	449 ± 151	0.269	-16.6 ± 5.9	
	SAlc	0.1	EtAc	PLX	5	352 ± 17	0.092	-14.5 ± 4.4	
	SAlc	0.25	EtAc	PLX	5	353 ± 14	0.150	-16.6 ± 2.0	
	SAlc	0.5	EtAc	PLX	5	317 ± 18	0.080	-16.7 ± 1.0	
	SAlc	1	EtAc	PLX	5	299 ± 11	0.199	-14.1 ± 1.5	
	SAlc	1.5	EtAc	PLX	5	304 ± 27	0.107	-14.3 ± 1.9	
	SAc	0.1	EtAc	PLX	5	479 ± 31	0.165	-20.6 ± 4.8	
	SAc	0.25	EtAc	PLX	5	380 ± 18	0.076	-	
	SAc	0.5	EtAc	PLX	5	401 ± 57	0.104	-20.7 ± 4.1	
	SAc	1	EtAc	PLX	5	404 ± 32	0.104	-22.0 ± 0.5	
	SAc	1.5	EtAc	PLX	5	398 ± 27	0.109	-21.3 ± 2.7	
	Solvente orgánico	GDS	0.1	EtAc	PLX	5	126 ± 9	0.109	-12.7 ± 2.3
		SAlc	0.1	EtAc	PLX	5	352 ± 17	0.092	-14.5 ± 4.4
SAc		0.1	EtAc	PLX	5	479 ± 31	0.165	-20.6 ± 4.8	
GDS		0.1	MEK	PLX	5	257 ± 16	0.118	-8.7 ± 0.2	
SAlc		0.1	MEK	PLX	5	392 ± 13	0.060	-13.5 ± 0.5	
SAc		0.1	MEK	PLX	5	522 ± 11	0.053	-15.4 ± 0.3	
GDS		0.1	MetAc	PLX	5	222 ± 31	0.129	-5.4 ± 0.6	
SAlc		0.1	MetAc	PLX	5	442 ± 64	0.100	-10.6 ± 0.5	
SAc		0.1	MetAc	PLX	5	519 ± 67	0.161	-15.7 ± 0.5	
Tipo de agente estabilizante		GDS	0.25	EtAc	PVA	5	355 ± 12	0.195	-5.7 ± 0.8
		GDS	0.25	EtAc	PLX	5	206 ± 20	0.220	-11.4 ± 1.9
		GDS	0.25	EtAc	SDS	5	N/A	N/A	N/A
	GDS	0.25	EtAc	Polisorbato 80	5	155 ± 20	0.453	-7.4 ± 2.5	
	GDS	0.25	EtAc	CTAB	5	N/A	N/A	N/A	
	GDS	0.25	EtAc	ADBAC	5	N/A	N/A	N/A	
	SAlc	0.25	EtAc	PVA	5	362 ± 13	0.140	-3.8 ± 0.4	
	SAlc	0.25	EtAc	PLX	5	352 ± 14	0.150	-16.7 ± 1.0	
	SAlc	0.25	EtAc	SDS	5	N/A	N/A	N/A	
	SAlc	0.25	EtAc	Polisorbato 80	5	509 ± 112	0.387	-7.9 ± 2.9	
	SAlc	0.25	EtAc	CTAB	5	N/A	N/A	N/A	
	SAlc	0.25	EtAc	ADBAC	5	N/A	N/A	N/A	
	Concentración de agente estabilizante	GDS	0.25	EtAc	PLX	1	668 ± 177	0.517	-14.4 ± 0.9
		GDS	0.25	EtAc	PLX	2.5	546 ± 46	0.309	-10.6 ± 1.7
		GDS	0.25	EtAc	PLX	5	206 ± 20	0.220	-11.4 ± 1.9
		GDS	0.25	EtAc	PLX	7.5	208 ± 9	0.211	-8.3 ± 1.0
		GDS	0.25	EtAc	PLX	10	153 ± 10	0.162	-6.5 ± 0.9
		SAlc	0.25	EtAc	PLX	1	525 ± 152	0.223	-14.5 ± 4.4
SAlc		0.25	EtAc	PLX	2.5	489 ± 69	0.166	-13.3 ± 1.4	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	5	352 ± 14	0.150	-16.7 ± 1.0	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	7.5	369 ± 52	0.144	-12.2 ± 1.6	
SAlc		0.25	EtAc	PLX	10	434 ± 33	0.179	-10.0 ± 1.0	
GDS		0.25	EtAc	PVA	1	387 ± 53	0.297	-4.9 ± 0.9	
GDS		0.25	EtAc	PVA	2.5	378 ± 19	0.239	-5.3 ± 0.4	
GDS		0.25	EtAc	PVA	5	355 ± 12	0.195	-5.7 ± 0.8	
GDS		0.25	EtAc	PVA	7.5	321 ± 5	0.166	-4.1 ± 1.0	
GDS		0.25	EtAc	PVA	10	273 ± 14	0.129	-4.3 ± 1.0	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	1	358 ± 19	0.151	-4.3 ± 1.6	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	2.5	375 ± 21	0.141	-3.0 ± 0.7	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	5	362 ± 13	0.140	-3.8 ± 0.4	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	7.5	448 ± 47	0.145	-3.2 ± 1.0	
SAlc		0.25	EtAc	PVA	10	430 ± 65	0.162	-2.1 ± 0.5	

\*Las condiciones asociadas al método de preparación se mantuvieron constantes: La relación de fases fue 0.25:1, velocidad de agitación 11200 rpm, tiempo de agitación 10 min, temperatura de la fase de dilución (ambiente 18 ± 2°C) y velocidad de agitación de la fase de dilución (750 rpm).

\*N/A: No aplica

**Figura 4-3:** Influencia de la naturaleza del lípido sobre el tamaño de partícula. (Las partículas fueron preparadas a una concentración de lípido al 1% p/v con respecto a la fase orgánica).



De acuerdo con lo propuesto por otros investigadores, trabajando con el método de emulsificación-difusión para la preparación de partículas poliméricas (Quintanar y col., 1998; Mora y col., 2011) y para la obtención de partículas lipídicas (Trotta y col., 2003; Quintanar y col., 2005), la formación de la partícula ocurre cuando el solvente orgánico difunde desde la gota de la emulsión hacia la fase acuosa en el momento en el que se rompe el equilibrio termodinámico al diluir la emulsión en agua. El agente estabilizante utilizado tiene como función contribuir a garantizar la integridad de la gota de emulsión durante la formación de las partículas. De acuerdo con esto, teóricamente una mayor afinidad entre el lípido y el solvente orgánico dificultaría la difusión de este último hacia la fase acuosa, incrementando la posibilidad de coalescencia entre las pequeñas gotas de emulsión. Como consecuencia, el tamaño de las partículas sería mayor.

Efectivamente, en términos generales, los resultados de tamaño de partícula obtenidos guardan relación con la afinidad entre el lípido y el solvente orgánico, interpretada ésta como la solubilidad del lípido en el solvente orgánico. En este

sentido, SAc y SAIC que presentaron los mejores resultados en cuanto a solubilidad en EtAc (**Tabla 4-1**) tienen los mayores tamaños de partícula (**Tabla 4-6**) y GDS que exhibe baja solubilidad, permite obtener tamaños de partícula menores. Como establece la predicción teórica, debido a que SAc y SAIC presentan la mayor solubilidad en EtAc, se podría causar una disminución en la velocidad de difusión del solvente conduciendo a la formación de gotas de tamaño superior, asociado a la incorporación de una mayor cantidad de moléculas del lípido que generarían la formación de partículas de mayor tamaño. Así mismo, al tener mayor cantidad de moléculas de lípido en la fase orgánica, esta podría ser más viscosa dificultando la difusión del solvente en la etapa de dilución.

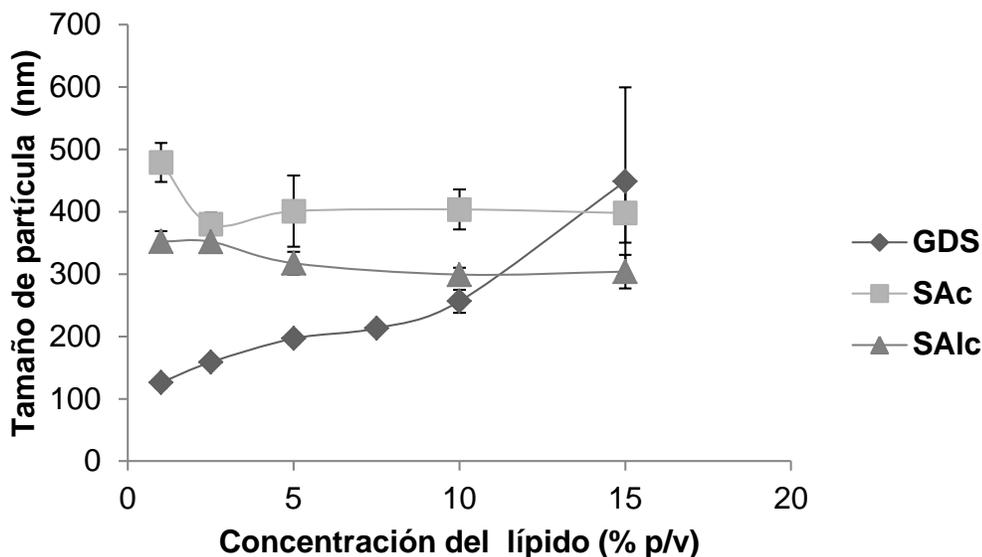
No obstante, a pesar de que las solubilidades de SAc y SAIC en EtAc no presentan diferencias importantes, el tamaño de las partículas resultantes sí es diferente. alguna explicación al respecto podría construirse a partir de los valores de densidad para cada lípido. Como se observa en la **Tabla 4-3**, SAc es más denso que SAIC (valores de densidad de  $0.94 \text{ g/cm}^3$  y de  $0.81 \text{ g/cm}^3$ , respectivamente), lo que podría reflejarse en una diferencia de densidades entre las fases orgánica y acuosa al momento de la emulsificación. Es posible que una mayor diferencia de densidades dificulte el proceso de emulsificación y en adición, forme un sistema más propenso a fenómenos de coalescencia de las gotas de fase orgánica, dando como resultado partículas más grandes con SAc.

Por otro lado, la influencia de la naturaleza del lípido sobre el tamaño de partícula podría estar determinada por la composición de cada lípido. Así, GDS corresponde a una mezcla de mono-, di- y triglicéridos de los ácidos esteárico y palmítico. Como es reportado en la literatura, los monoglicéridos se caracterizan por sus propiedades emulsificantes (Wang y col., 2005; Rowe y col., 2009). Si se tiene en cuenta que la emulsificación es una de las etapas más importantes del método de preparación utilizado, GDS actuaría de forma sinérgica con el agente

estabilizante PLX que se encuentra en la fase acuosa, facilitando el proceso de formación de una emulsión del tipo aceite-en-agua y como consecuencia, se favorecería la formación de tamaños de partícula más pequeños.

Complementario con el ensayo acerca de la influencia de la naturaleza del lípido sobre el comportamiento del tamaño de partícula, en el presente estudio también se evaluó el efecto de la concentración del lípido, trabajando en un rango entre el 1% y el 15% p/v de la fase orgánica. Como se observa en la **Figura 4-4**, las concentraciones de SAc y SAIC no tienen efecto de importancia sobre el tamaño de partícula. Sin embargo, a concentraciones del 15% p/v, el tamaño de partícula presentó elevada polidispersidad. Estos resultados coinciden con los reportados por Quintanar y col. (2005) utilizando Gelucire<sup>®</sup>44/14 (lauroil polioxiglicéridos) y Gelucire<sup>®</sup>50/13 (estearil polioxiglicéridos) y pueden ser debidos a una sobresaturación de la fase orgánica, lo que podría incrementar la viscosidad y la densidad de la fase orgánica dificultando la eficiente formación de la emulsión y la difusión del solvente orgánico en agua durante la etapa de dilución, tal como se explicó previamente.

**Figura 4-4:** Influencia de la concentración del lípido en la preparación de partículas por el método de emulsificación-difusión. La variación de la concentración del lípido se realizó con respecto a la fase orgánica.



De otro lado, GDS presentó un comportamiento diferente al observado para SAc y SAic. En este caso, a medida que incrementa la concentración del lípido, el tamaño de partícula aumenta. Sin embargo, este aumento se hace más marcado cuando se trabajan concentraciones del 15%, las que también producen dispersiones de partículas con elevada polidispersidad. Este comportamiento puede atribuirse a la pobre capacidad del EtAc para disolver este lípido haciéndose más evidente el efecto de la saturación de la fase orgánica con pequeños aumentos en la concentración del lípido.

Finalmente, es importante destacar que al parecer, la concentración de lípido utilizado repercute en la estabilidad del sistema coloidal. Independientemente del lípido, todas las dispersiones de partículas preparadas a una concentración superior al 5% p/v presentaron formación de agregados, en un periodo de tiempo inferior a las 48 h, lo que podría atribuirse a dos factores. En primer lugar, como se explicará más adelante, el potencial zeta de estos sistemas presenta valores máximos de  $-21.3 \pm 2.7$  mV, que no se consideran suficientes para garantizar estabilidad por efecto de cargas. Así, al tener mayor cantidad de partículas como consecuencia de haber utilizado una mayor cantidad de lípido, existe también una mayor probabilidad de choque entre ellas que pueden dar origen a la formación de agregados. De otro lado, la elevada polidispersidad de estos sistemas en función del incremento de la cantidad de lípido, podría favorecer la adherencia de partículas pequeñas a partículas más grandes, ocasionando la inestabilidad del sistema.

- **Influencia del solvente orgánico**

Los solventes orgánicos evaluados en la presente tesis fueron EtAc, MetAc, MEK y BA. Para el estudio de su efecto sobre las propiedades de las partículas se utilizaron como lípidos GDS, SAc y SAlc a una concentración del 1% y PLX al 5% como agente estabilizante. Como se observa en la **Tabla 4-7**, el tamaño de las partículas preparadas con SAc y SAlc no depende del tipo de solvente orgánico utilizado. Caso contrario sucede con GDS, en donde el tamaño de las partículas presenta el siguiente orden dependiendo del solvente orgánico: MEK > MetAc > EtAc.

**Tabla 4-7:**

Influencia del tipo de solvente sobre el tamaño y potencial zeta de partículas lipídicas preparadas por el método emulsificación-difusión.

Solvente orgánico estudiado	Tipo de lípido (0.1 g)	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
EtAc	GDS	126 ± 9	0.246	-7.5 ± 2.3
	SAlc	352 ± 17	0.092	-13.8 ± 4.4
	SAc	448 ± 20	0.165	-14.8 ± 4.8
MEK	GDS	257 ± 16	0.118	-8.5 ± 0.2
	SAlc	392 ± 13	0.060	-12.6 ± 0.5
	SAc	522 ± 11	0.053	-14.8 ± 0.3
MetAc	GDS	221 ± 31	0.129	-5.9 ± 0.6
	SAlc	442 ± 64	0.161	-10.8 ± 0.5
	SAc	518 ± 67	0.100	-15.4 ± 0.5

Los anteriores resultados pueden interpretarse considerando el grado de afinidad del solvente orgánico por los lípidos (**Figura 4-1**) y los resultados experimentales de la solubilidad semicuantitativa de los lípidos (**Tabla 4-1**). Como se ha mencionado, SAlc y SAc presentan una mayor afinidad con los solventes

orgánicos evaluados comparados con GDS lo que explica que en general, los tamaños de partícula con GDS, sean siempre los más pequeños. No obstante, si se analizan los parámetros de solubilidad y los resultados de solubilidad de GDS en diferentes solventes, no es posible establecer alguna correlación que explique las diferencias en cuanto al tamaño de partícula. De acuerdo con la **Tabla 4-3**, la principal diferencia entre EtAc, MetAc y MEK es su miscibilidad en agua a 20°C, y sobre esta base, sería posible explicar estos resultados. Para tal fin se acepta que el mecanismo de formación de las partículas por el efecto Gibbs–Marangoni podría ser válido. Así, la diferencia de tensiones superficiales entre la fase orgánica y la fase acuosa es el factor que determina la posibilidad de fragmentación sucesiva de la fase orgánica para dar origen a las partículas. A mayor diferencia de tensión superficial, mayor capacidad de fragmentación y por lo tanto, se obtienen partículas más pequeñas. Teniendo en cuenta que unos solventes son más solubles en agua que otros (MEK  $\approx$  MetAc  $\gg$  EtAc) es posible suponer que si hay una mayor cantidad de solvente orgánico en agua, la tensión superficial de la mezcla agua–solvente orgánico es menor. De esta forma, cuando se diluye la emulsión en agua se encontrará más MEK en agua que EtAc, la diferencia de tensión superficial entre la fase orgánica (MEK) y la acuosa será menor y el efecto Gibbs–Marangoni no tendría la misma eficiencia que si se trabaja con EtAc, y como consecuencia las partículas preparadas a partir de MEK resultan de mayor tamaño.

Desde otro punto de vista, otras propiedades fisicoquímicas de los solventes (**Tabla 4-3**) pueden influenciar la formación de las partículas. EtAc, MetAc y MEK no presentan diferencias marcadas en sus valores de densidad, viscosidad y tensión superficial y en todos los casos, fue posible la obtención de dispersiones de partículas caracterizadas por una distribución unimodal. Sin embargo, este comportamiento contrasta con el obtenido cuando se empleó BA como solvente orgánico, el cual se caracterizó por exhibir distribuciones de tamaño de partícula no unimodales. Estos resultados no corresponden con los reportados por Trotta y

col. (2003), donde partículas de GMS preparadas utilizando BA como solvente orgánico, tienen tamaños cercanos a 200 nm con un PDI de 0.08. En donde se mantuvo una agitación constante en la etapa de dilución por un tiempo de 60 minutos.

Como se observa en la **Tabla 4-4**, a pesar de que BA es poco soluble en agua (Lo que según se ha discutido podría permitir partículas de pequeño tamaño) las otras propiedades fisicoquímicas de este solvente son significativamente diferentes a los otros solventes empleados. Este solvente tiene los valores de densidad y viscosidad más elevados, lo que contribuye a respaldar los planteamientos realizados anteriormente acerca de que la densidad de la fase orgánica podría influenciar la eficiencia de emulsificación. En efecto, siendo la densidad del BA mayor que la de agua (1,056 g/ml) es posible que el efecto estabilizante de PLX no sea suficiente para garantizar la integridad de las gotas de emulsión. De otro lado, la viscosidad de BA podría dificultar la difusión del solvente orgánico durante la etapa de dilución, que al intentar contrarrestarla con elevada alta agitación, promueve un aumento no controlado en la agregación del lípido. Sobre la base de todo lo anterior, es posible afirmar que BA no resulta una alternativa apropiada para la preparación de partículas lipídicas siguiendo el procedimiento y las condiciones experimentales establecidas en el presente estudio.

#### - ***Influencia del agente estabilizante***

En la preparación de partículas lipídicas, el agente estabilizante permite un proceso de emulsificación eficiente y promueve la estabilidad física de las dispersiones coloidales. En el presente estudio se intentaron preparar partículas lipídicas a base de GDS y SAIc, evaluando diferentes agentes estabilizantes, seleccionados según su naturaleza tensioactiva y sus propiedades estabilizantes.

En este sentido, se evaluaron tres tensioactivos no iónicos (PLX, polisorbato 80 y PVA), un tensioactivo aniónicoj (SDS) y dos tensioactivos catiónicos (CTAB y ADBAC). Es importante aclarar que aunque algunos polímeros como PLX o PVA poseen propiedades tensioactivas, el mecanismo mediante el cual estabilizan las emulsiones se fundamenta en el aumento de la viscosidad del sistema y el efecto estérico que se logra, lo que evita la coalescencia de las gotas (Tadros y col., 1983; Trotta y col., 2003).

Como se observa en la **Tabla 4-8**, los tensioactivos iónicos, sean estos catiónicos o aniónicos, no permiten la formación de sistemas particulados lipídicos. En todos los casos, las dispersiones se caracterizaron por la formación de agregados durante la difusión del solvente. De otro lado, cuando se emplean tensioactivos no iónicos, se obtienen dispersiones cuyo tamaño de partícula siguen el orden: PVA > PLX > Polisorbato 80. Aunque polisorbato 80 es el agente estabilizante que permite los menores tamaños de partícula, no es recomendable su uso considerando los resultados de índice de polidispersidad, las distribuciones bimodales del tamaño de las partículas y la formación de un sedimento no redispersable durante las 24 horas siguientes a su preparación. De acuerdo con los estudios desarrollados por Quintanar y col. (2005), al utilizar polisorbato 80 como agente estabilizante de partículas preparadas a partir de behenato de glicerilo, se obtuvo también una distribución bimodal. Dichos investigadores atribuyen este comportamiento a que el efecto protector del polisorbato 80 no permite mantener la integridad de las gotas en la etapa de dilución.

El objetivo de evaluar tensioactivos iónicos y no iónicos en la presente investigación era establecer si las dispersiones de partículas lipídicas podían ser estabilizadas por efecto electrostático y por efecto estérico. Los resultados obtenidos evidencian que el mecanismo más adecuado es el efecto estérico, lo que podría deberse a que al tratarse de materiales lipídicos, la densidad de las partículas será siempre menor que la del agua y por consiguiente, existirá una

tendencia natural a la separación del sistema en donde las partículas lipídicas se ubican en la superficie de la dispersión. En consecuencia, es de esperarse que tal proximidad entre ellas facilite su agregación. En adición, como se discutirá más adelante, las partículas lipídicas no se caracterizan por exhibir valores de potencial zeta que garanticen un mecanismo electrostático para la estabilización de las dispersiones.

De otro lado, es importante tener en cuenta que las partículas lipídicas tienen naturaleza principalmente hidrofóbica. Esto podría dificultar la eficiencia con la que el agente estabilizante puede formar la película protectora alrededor de la partícula, característico de una estabilización estérica. Así, es de esperarse que entre mayor sea la viscosidad de la fase acuosa, mayor será la eficiencia de las partículas y la estabilidad de sus dispersiones. Esto explica el por qué PLX y PVA son los agentes estabilizantes que ofrecen los mejores resultados.

**Tabla 4-8:**

Influencia de la naturaleza del agente estabilizante sobre el tamaño, el índice de polidispersidad y el potencial zeta de partículas lipídicas preparadas por el método emulsificación-difusión.

Agente estabilizante (5%)	Tipo de Lípido					
	GDS (0.25 g)			SAIc (0.25 g)		
	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mv)	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mv)
PVA	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8	362 ± 13	0.140	-3.7 ± 0.4
PLX	206 ± 20	0.220	-11.4 ± 1.9	352 ± 14	0.150	-16.6 ± 1.0
Polisorbato 80	155 ± 20	0.453	-7.4 ± 2.5	509 ± 112	0.387	-7.9 ± 2.9
SDS	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CTAB	NA	NA	NA	NA	NA	NA
ADBAC	NA	NA	NA	NA	NA	NA

\* NA = No aplica.

Lo anterior también encuentra respaldo en los resultados reportados por Trotta y col. (2003) y Quintanar y col. (2005). Trotta y col. (2003) evaluaron la asociación de tensioactivos iónicos y no iónicos con el objeto de preparar sistemas lipídicos particulados, encontrando que la estabilización por cargas únicamente, no es suficiente. Por su parte, Quintanar y col. (2005) evaluaron dispersiones de PVA

como agente estabilizante obteniendo sistemas dispersos estables hasta por 30 días, con tamaños de partícula entre 225-300 nm.

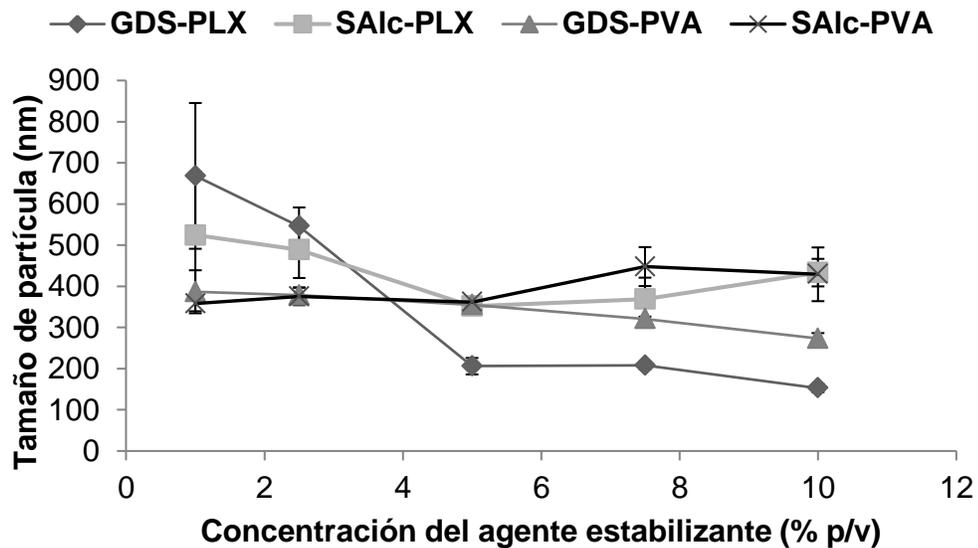
Sin embargo, el efecto de la viscosidad de las dispersiones debe analizarse con precaución. Si bien es necesaria una viscosidad que evite la separación de las partículas a causa de la diferencia de densidades entre el medio disperso y el dispersante, elevadas concentraciones del agente estabilizante podrían conducir a un aumento exagerado en la viscosidad de la fase acuosa, lo que afectaría desfavorablemente la difusión del solvente en el agua y como consecuencia, facilitaría la coalescencia de las gotas de emulsión dando como resultado partículas de mayor tamaño.

Con el propósito de verificar esta hipótesis, en la presente investigación se evaluó el efecto de la concentración del agente estabilizante (PLX y PVA) sobre el comportamiento de tamaño de las partículas preparadas a partir de GDS y de SAIc. Como se deduce a partir de los datos reportados en la **Tabla 4-8**, las dispersiones de PVA, caracterizadas por una elevada viscosidad (4% p/v;  $\eta$ : 3.5 cps; Swati y col., 2009), permiten tamaños de partícula más grandes, aunque con mejor distribución de tamaño y estabilidad física en el tiempo, si se les compara con los sistemas particulados preparados utilizando PLX como agente estabilizante (4 % p/v;  $\eta$ : 2.0cps; Swati y col., 2009).

Igualmente, como se observa en la **Figura 4-5**, la eficiencia del agente estabilizante parece ser la resultante de la influencia de la viscosidad de la fase acuosa y de la densidad del material lipídico. A concentraciones inferiores al 5 %, independientemente del lípido, PLX forma dispersiones de partículas caracterizadas por una elevada polidispersidad. Por encima del 5 %, la densidad del lípido parece marcar una diferencia en el desempeño del PLX como estabilizante. Así, el tamaño de las partículas preparadas a partir de GDS, el cual tiene una densidad mayor que SAIc (entre 0.8 y 1.2 g/ml y alrededor de 0.8 g/ml, respectivamente), parece no ser sensible a la dificultad de difusión del solvente

orgánico que supone una elevada viscosidad de la fase acuosa, derivada de un incremento en la concentración del agente estabilizante. Por el contrario, el comportamiento observado para SAIc, el lípido de menor densidad, revela que el tamaño de la partícula incrementa a medida que la concentración de PLX incrementa, sugiriendo que en estos casos la dificultad de difusión del solvente y la baja densidad del lípido podrían facilitar la coalescencia de las gotas de emulsión.

**Figura 4-5:** Influencia de la concentración del agente estabilizante sobre el tamaño de partícula.



De otro lado, aunque se observan tendencias similares cuando se trabaja con PVA como agente estabilizante, debido a que las viscosidades de las dispersiones acuosas de PVA son mayores que las de PLX, el tamaño de partícula resulta menos sensible a los cambios debidos a la concentración del agente estabilizante o a la densidad del lípido. En efecto, como se presenta en la **Tabla 4-8**, no se evidenció una diferencia importante en los tamaños de partícula cuando se emplearon PVA (5%, p/v) como estabilizante y GDS y SAIc como lípidos. Aun así, es posible observar que aunque el tamaño de partícula no varía

de forma importante cuando la concentración de PVA se incrementa desde 1% p/v hasta 10% p/v, el PDI si depende de la concentración de PVA. A una concentración de 1% p/v, la formación de la partícula presenta dificultades que se reflejan en un valor de PDI cercano a 0.3; al aumentar la concentración al 5%p/v el PDI disminuye considerablemente (0.19). No obstante, el aumento exagerado de la viscosidad del sistema afecta la etapa de difusión, tal y como ha sido reportado en estudios de preparación de partículas poliméricas por el mismo método (Han y col., 2008; Feczko y col., 2008; Zambrano y col., 2011).

#### **b. Influencia de las condiciones de operación sobre el tamaño y la polidispersidad de las partículas**

Entender la emulsificación-difusión como estrategia para la preparación de partículas lipídicas requiere, además de conocer la influencia de los materiales de partida sobre las propiedades de las partículas, identificar el efecto de las condiciones de operación. Para tal fin, en la presente tesis se investigó el efecto sobre el comportamiento de tamaño de las partículas, de la proporción de fase orgánica respecto a la fase acuosa, la velocidad y el tiempo de emulsificación y la temperatura y su velocidad de agitación durante la fase de dilución. En este estudio, los materiales de partida y sus concentraciones correspondieron a lo indicado en la fórmula estándar (**Tabla 4-5**). Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio del efecto del agente estabilizante, se sustituyó PLX por PVA. Esto permitió obtener dispersiones de partículas con menores índices de polidispersidad (**Tabla 4-9**).

Respecto a la proporción de fase orgánica/acuosa, esta variable resulta de interés en la presente investigación debido a que podría determinar la eficiencia con la que la fase orgánica es dispersada en la fase acuosa y como consecuencia,

podría influir en el tamaño de partícula final. Los resultados presentados en la **Figura 4-6** confirman este supuesto. A bajas proporciones de fase orgánica (0.125:1), se observan los mayores tamaños de partícula e índice de polidispersidad, lo que sugiere alguna dificultad para la distribución homogénea de la fase orgánica en la acuosa. Al incrementar la proporción de fase orgánica desde una relación 0.25:1 hasta 1:1, no se observa diferencia en los tamaños de partícula e índice de polidispersidad.

**Tabla 4-9:**

Resultados de la Influencia de las condiciones de operación sobre el tamaño la polidispersidad y el potencial zeta de las partículas.

Parámetro estudiado	Condiciones de las variables asociadas al método de preparación					Tamaño de partícula (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
	Volumen de solvente orgánico (ml)	Velocidad de emulsificación (rpm)	Tiempo de emulsificación (min)	Temperatura de la fase de dilución (°C)	Velocidad de agitación durante la etapa de dilución (rpm)			
Relación de fases (O/W)	5	11,200	10	TL	750	546 ± 80	0.252	-2.4 ± 0.4
	10	11,200	10	TL	750	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8
	15	11,200	10	TL	750	404 ± 121	0.232	-2.3 ± 0.8
	20	11,200	10	TL	750	359 ± 100	0.244	-1.5 ± 0.2
	30	11,200	10	TL	750	214 ± 3	0.138	-2.8 ± 1.8
	40	11,200	10	TL	750	286 ± 54	0.246	-2.5 ± 1.4
Velocidad de emulsificación	10	3,200	10	TL	750	944 ± 720	0.215	-1.9 ± 0.3
	10	7,200	10	TL	750	775 ± 87	0.233	-2.4 ± 0.4
	10	11,200	10	TL	750	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8
	10	15,600	10	TL	750	208 ± 8	0.145	-1.8 ± 1.0
	10	20,000	10	TL	750	148 ± 7	0.146	-1.3 ± 1.1
	10	24,000	10	TL	750	149 ± 2	0.205	-1.3 ± 0.5
Tiempo de emulsificación	10	11,200	2.5	TL	750	705 ± 139	0.169	-5.6 ± 1.8
	10	11,200	5	TL	750	500 ± 64	0.252	-3.7 ± 1.1
	10	11,200	7.5	TL	750	411 ± 7	0.175	-1.8 ± 1.0
	10	11,200	10	TL	750	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8
	10	11,200	12.5	TL	750	366 ± 48	0.305	-2.8 ± 0.2
	10	11,200	15	TL	750	332 ± 23	0.312	-3.6 ± 1.4
Temperatura de la fase de dilución	10	11,200	10	20	750	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8
	10	11,200	10	30	750	348 ± 11	0.151	-3.0 ± 0.9
	10	11,200	10	40	750	441 ± 32	0.335	-4.7 ± 1.6
	10	11,200	10	50	750	430 ± 66	0.247	-5.3 ± 1.3
	10	11,200	10	60	750	470 ± 116	0.246	-6.1 ± 1.5
Velocidad de agitación durante la etapa de dilución	10	11,200	10	TL	0	353 ± 12	0.159	-2.6 ± 0.9
	10	11,200	10	TL	750	355 ± 12	0.194	-5.7 ± 0.8
	10	11,200	10	TL	1,500	333 ± 26	0.124	-2.4 ± 0.9

\*Los materiales de partida se mantuvieron constantes en todos los ensayos. Tipo y cantidad de lípido (GDS, 0.2 g), solvente orgánico (EtAc, 10 ml), tipo y concentración de agente estabilizante (PVA, 5%).

TL = temperatura ambiente 18 ± 2°C,

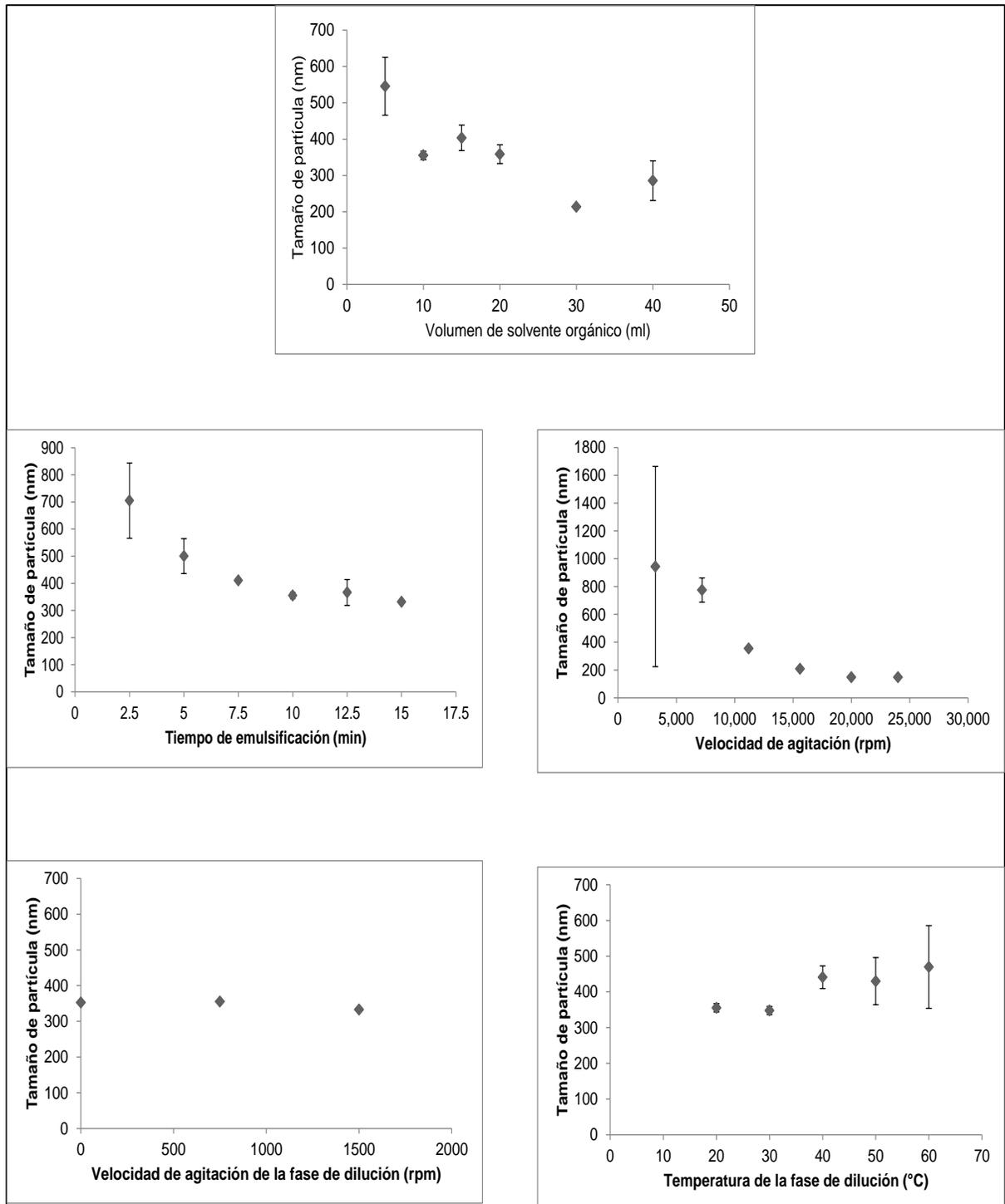
La anterior explicación se corrobora si se tienen en cuenta los resultados presentados en la **Figura 4-6**, a partir de los que se concluye que a bajas fuerzas de corte el proceso de emulsificación no es eficiente, dando lugar a tamaños cercanos a los 900 ± 700 nm y a valores de PDI de 0.215 cuando se trabaja por ejemplo, a velocidades de emulsificación de 3200 rpm. A medida que se

incrementa la velocidad de emulsificación, los tamaños de partícula disminuyen y las distribuciones de tamaño son menores. Así, a una velocidad de emulsificación de 11200 rpm el tamaño de partícula es de  $355 \pm 12$  nm y el valor de PDI de 0.194. Sin embargo, como se observa en la misma figura, la eficiencia de la emulsificación a causa del incremento en la velocidad de emulsificación, tiene un límite ya que al incrementar la velocidad de emulsificación por encima de las 15600 rpm, la variación en el tamaño y la dispersión de las partículas no es relevante.

Un comportamiento similar se obtuvo al estudiar la influencia del tiempo de emulsificación (Figura 4-6). Durante los primeros minutos, el sistema no logra una emulsificación adecuada dando como resultado tamaños cercanos a los 700 nm con un PDI de 0.17 al emulsificar durante 2.5 min. Al incrementar el tiempo de emulsificación, los tamaños de partícula y los valores de PDI disminuyeron hasta un límite de 10 min de tiempo de emulsificación a partir del cual no se observa una influencia relevante.

De otro lado, el presente estudio consideró la temperatura y el volumen de la fase de dilución como variables operativas de interés, teniendo en cuenta que hipotéticamente podrían influenciar la eficiencia de difusión del solvente orgánico hacia la fase acuosa. En este sentido, es posible que al incrementar la temperatura del medio de dilución, se disminuyan la viscosidad y la tensión superficial del medio acuoso. Igualmente, podría incrementarse la solubilidad del solvente orgánico en el agua. En conjunto, esto favorecería la formación de partículas de menor tamaño. Sin embargo, el aumento de la temperatura también podría afectar la estabilidad del sistema promoviendo fenómenos de coalescencia o de agregación debido a que se puede disminuir la viscosidad del medio estabilizante o debilitar la estructura de la partícula por un ablandamiento cuando se trabaja a temperaturas próximas al punto de fusión del lípido.

**Figura 4-6:** Influencia de las condiciones asociadas al método emulsificación-difusión en el comportamiento de tamaño y polidispersidad de las partículas lipídicas



De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se observa una ligera relación directa entre el tamaño de partícula y la temperatura del medio de dilución, lo que favorece la segunda hipótesis planteada, es decir, el incremento de la temperatura puede afectar la estabilidad del sistema. Así, como se presenta en la **Figura 4-6**, al trabajar a temperaturas cercanas al punto de fusión del GDS (50 – 60°C; Rowe y col., 2009), el tamaño de la partícula aumenta. Estos resultados no coinciden con los reportados por Quintanar y col. (2005) quienes encontraron que a medida que se aumenta la temperatura de la fase de dilución, el tamaño de partícula disminuye debido, según dichos investigadores, a que este aumento en la temperatura aumenta la velocidad de difusión del solvente orgánico a la fase de dilución. Así, a una temperatura de 60°C en tales estudios se obtuvieron partículas con tamaños inferiores a los 100 nm.

De forma complementaria se evaluó el efecto de la velocidad de agitación durante la etapa de dilución. Los resultados obtenidos evidencian que este no es un factor determinante en la formación de la partícula, pues en ausencia de agitación logran tamaños de partícula de  $353 \pm 12$  nm y mayores fuerzas de corte (1500 rpm) dan lugar a tamaños de partícula de  $333 \pm 26$  nm.

Esto contribuye a apoyar la conclusión acerca de que el efecto de la etapa de dilución sobre el tamaño de partícula está estrechamente ligado a si se favorece o no la estabilidad del sistema. Los resultados evidencian que una vez garantizada dicha estabilidad, la condición de agitación durante la dilución no define el tamaño de la partícula.

#### 4.2.2 Influencia de los materiales de partida y de las condiciones de operación sobre el potencial zeta de las partículas

En términos generales, el potencial zeta de las partículas lipídicas puede relacionarse directamente con la estabilidad de las dispersiones coloidales y con el desempeño *in vivo* de este tipo de transportadores de moléculas activas. En este último caso, partículas cargadas positivamente podrían tener una mejor adherencia a las membranas celulares, caracterizadas por su carga negativa (Calvo y col., 1997; Lück y col., 1998, Owens y Peppas 2006; Prego y col., 2006).

Para el caso de las partículas lipídicas obtenidas en el presente estudio, fue de interés investigar la influencia de los factores asociados a la formulación y al método de preparación, sobre su comportamiento electrocinético. Como se observa a partir de los resultados ya reportados, la naturaleza del solvente orgánico (**Tabla 4-7**) y las condiciones de operación propias del método de preparación (**Tabla 4-9**) no tienen incidencia sobre el potencial zeta de las partículas. Por el contrario, la naturaleza tanto del material lipídico como del agente estabilizante (**Tabla 4-6**) determina la densidad de carga de las partículas lipídicas, obteniéndose los mayores valores de potencial zeta cuando se preparan partículas a partir de SAc utilizando como agente estabilizante PLX (**Tabla 4-6**).

Desde un punto de vista teórico, el potencial zeta de las partículas es originado por la ionización de grupos en la superficie de la partícula o por el atrapamiento o adsorción de moléculas cargadas en la superficie de la partícula (Hiemenz y col., 1997).

Evidentemente, de los materiales lipídicos estudiados, el SAc posee la mayor cantidad de grupos ionizables, los que provienen de los ácidos grasos que lo componen. A las condiciones de pH utilizadas para el desarrollo de los diferentes experimentos ( $\text{pH } 6.4 \pm 0.2$ ), dichos ácidos grasos deberían estar parcialmente disociados exponiendo los grupos carboxilato ( $\text{COO}^-$ ;  $\text{pKa } 4.95$ ) en la superficie,

conduciendo a un leve aumento en el potencial zeta. Sin embargo, el mecanismo de efecto estérico por medio del cual el PLX estabiliza las dispersiones coloidales, podría dificultar que tales cargas se exhiban completamente y como consecuencia, que los valores observados sean relativamente bajos (menores de 30 mV), insuficientes para la estabilización del sistema por efecto electrostático (Hunter y col., 1981).

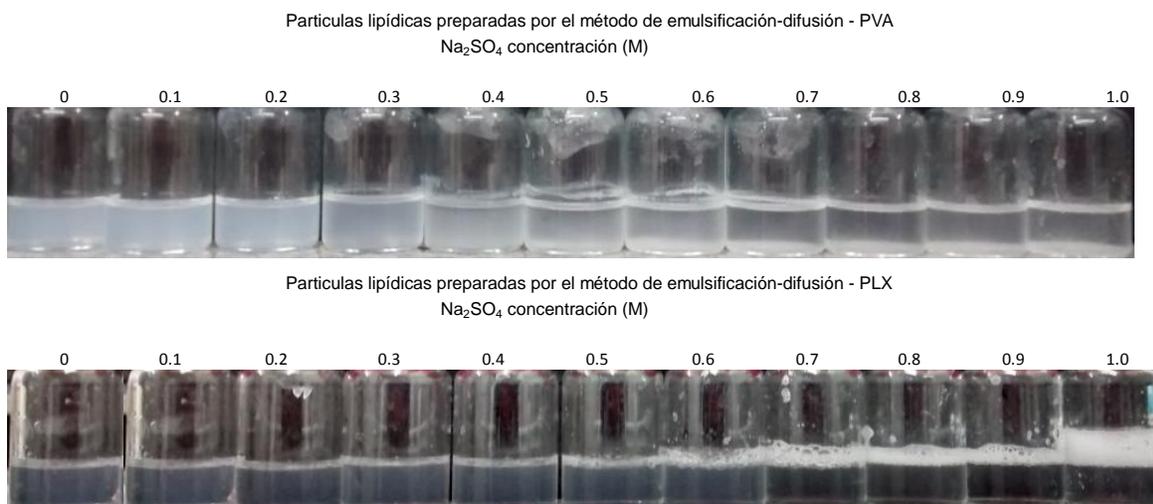
Este efecto es más evidente al utilizar PVA como agente estabilizante en donde independientemente del material lipídico, se observan valores de potencial zeta cercanos a la neutralidad (alrededor de -5 mV). Como se ha discutido y como también lo proponen Rosenblatt y col. (2009), estos resultados pueden ser explicados porque PVA forma una capa protectora alrededor de las gotas de emulsión evitando su coalescencia y luego impidiendo la agregación de las partículas en suspensión. Es posible que la mayor viscosidad de las dispersiones acuosas de PVA guarde relación con la formación de una capa más compacta (más viscosa) alrededor de la partícula, lo que a diferencia de PLX, no permite detectar diferencias según el lípido utilizado como material de partida.

Para demostrar experimentalmente lo anterior, en el presente estudio se evaluó la estabilidad coloidal de partículas lipídicas preparadas a partir de GDS, utilizando EtAc como solvente orgánico y PLX o PVA como agentes estabilizantes. Para tal fin se llevó a cabo el ensayo de agregación inducida con sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) propuesto por Avgoustakis y col. (2003), en el que se evalúa el comportamiento de agregación del sistema disperso frente a concentraciones crecientes de electrolitos. Teniendo en cuenta que la protección de PLX y PVA frente a la atracción de las partículas lipídicas se fundamenta en la fuerza de repulsión originada por el efecto estérico a causa del hinchamiento en agua de las cadenas poliméricas que rodean la partícula, entre más eficiente sea dicho efecto estérico el sistema aceptará la adición de concentraciones mayores de electrolito sin evidenciar fenómenos de agregación (frecuentemente denominados de

coagulación). Tales fenómenos de agregación podrían ser ocasionados por la competencia entre los iones sodio y las fracciones hidrofílicas del agente estabilizante, por el agua disponible. Así la fracción hidrofílica de los polímeros podría verse parcialmente deshidratada por lo cual se contrae disminuyendo su capacidad como estabilizante haciendo evidente la agregación de las partículas (Mora y col., 2012). La concentración de electrolitos a la que se evidencia la agregación de los sistemas particulados es denominada la concentración crítica de coagulación.

Como se observa en la **Figura 4-7**, las concentraciones críticas de coagulación para las dispersiones de partículas bajo estudio fueron de 0.7M de sulfato de sodio, independientemente de si el agente estabilizante es PLX o PVA. Sin embargo, llama la atención que el comportamiento de estos dos estabilizantes, es diferente. Mientras que las dispersiones preparadas con PLX evidencian una total agregación del sistema particulado, lo que se ve reflejado en la transparencia del agua sobrenadante, las dispersiones preparadas con PVA conservan alguna turbidez, aún a las concentraciones más elevadas de electrolito. Probablemente, esto es debido a algún tipo de afinidad entre el PVA y el lípido. A manera de hipótesis, podría pensarse que el PLX al ser un copolímero de bloque podría tener una menor interacción con el lípido que la que tendría PVA cuya unidad monomérica es significativamente más pequeña. Sin embargo, para lograr algún avance al respecto es necesario el desarrollo de experimentos más dirigidos, que permitan determinar la cantidad de polímero estabilizante adsorbido en la superficie de la partícula, como aquellos realizados por Murakami y col (1997) en sus investigaciones sobre el efecto estabilizante de PVA cuando se preparan partículas poliméricas a base de poli- $\epsilon$ -caprolactona. El diseño y la estandarización de tales experimentos, supera el alcance de la presente investigación pero abre posibilidades de investigación para profundizar en el entendimiento de la estabilidad de los sistemas lipídicos nanoparticulados.

**Figura 4-7:** Agregación inducida por la adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en partículas lipídicas preparadas por la método de emulsificación-difusión, utilizando diferentes agentes estabilizantes.



#### 4.2.3 Una aproximación al mecanismo de formación de las partículas sólidas lipídicas preparadas por el método de emulsificación-difusión

Como se mencionó en el marco teórico, hasta la fecha se han postulado dos mecanismos que permiten explicar la formación de partículas lipídicas por el método de emulsificación-difusión. En síntesis, el primero de ellos fue propuesto por Quintanar y col. (2005) y se fundamenta en las propiedades fisicoquímicas del solvente orgánico y la fase acuosa, más puntualmente sus tensiones superficiales. Así, la diferencia entre las tensiones superficiales del solvente que forma parte de la gota de emulsión y la fase acuosa, originaría la fragmentación continua de cada gota de emulsión hasta un punto en donde la diferencia de tensiones superficiales es insignificante, el solvente difunde hacia el agua y el lípido precipita en forma de partícula. Este mecanismo es conocido también como el efecto Gibbs–Marangoni. El segundo mecanismo fue propuesto por Moinard y col. (2008), fundamentado en sus estudios acerca de la relación proporcional que

existe entre el tamaño de gota de la emulsión y el tamaño de la partícula. Sobre esta base, dichos investigadores proponen que el tamaño de la partícula es definido en la etapa de emulsificación, es decir, todas las variables que determinen la eficiencia de la emulsificación, determinarán también el tamaño de la partícula.

De acuerdo con lo anterior, resulta interesante para el presente trabajo de investigación analizar a la luz de los resultados obtenidos, cuál de las dos aproximaciones mecánicas podría ser la más adecuada.

Suponiendo como válida la teoría Gibbs–Marangoni, las propiedades fisicoquímicas de los solventes empleados (tensión superficial, viscosidad, etc.) determinarían la fragmentación de las gotas de emulsión y por lo tanto el tamaño de las partículas. Esto fue evidente en el caso de BA. Igualmente, parece existir una relación entre la solubilidad en agua de EtAc, MetAc y MEK, y el tamaño de partícula, la que podría encontrar una explicación en su efecto sobre las tensiones superficiales entre la fase orgánica y la acuosa.

De otro lado, los estudios acerca de la afinidad química entre los materiales de partida demuestran que la relación lípido–solvente orgánico es decisiva en términos de la facilidad de difusión del solvente hacia la fase acuosa. De esta forma, cualquier factor asociado a los componentes de la formulación que afecte la velocidad de difusión del solvente afectará también el mecanismo Gibbs–Marangoni.

Sin embargo, los resultados de tamaño de partícula cuando se utiliza PLX o PVA como agentes estabilizantes contradicen el postulado de la teoría Gibbs–Marangoni. En este estudio, los menores tamaños de partícula se lograron cuando PLX era el agente estabilizante. A diferencia de PVA, PLX es un agente tensioactivo para el que es previsible que reduzca en mayor grado la tensión superficial de la fase acuosa. Si la teoría Gibbs–Marangoni fuera el mecanismo predominante, dicha reducción de tensión superficial reduciría también la diferencia de tensión superficial con el solvente orgánico y en consecuencia, se

obtendrían los tamaños de partícula mayores, lo que no ocurrió en la presente investigación.

Igualmente, al incrementar la temperatura de la fase de dilución, se espera que la diferencia de tensiones superficiales entre el solvente orgánico y la fase acuosa disminuya y por lo tanto se esperaría que el tamaño de las partículas aumente en relación directa con la temperatura. Sin embargo, los resultados obtenidos que evidencian que la temperatura de la fase de dilución no tiene efecto sobre el tamaño de la partícula, cuestionan la aplicabilidad del efecto Gibbs-Marangoni.

De otro lado, el mecanismo que sugiere que a partir de cada gota de emulsión se forma una partícula es respaldado por los resultados experimentales de este trabajo, fundamentalmente cuando se investigó la incidencia de las variables de proceso sobre el tamaño de partícula. Es claro que la velocidad de emulsificación y el tiempo de emulsificación determinan el tamaño de partícula. Igualmente, al utilizar materiales lipídicos con alguna característica emulsificante, el tamaño de las partículas disminuyó en comparación con otros lípidos que no exhibían este tipo de comportamiento (lo que de cierta manera también contradice las predicciones según la teoría Gibbs-Marangoni). De hecho, los cambios de tamaño de partícula observados al cambiar la condición de trabajo son significativamente más evidentes que aquellos que se lograron cuando por ejemplo, la afinidad lípido-solvente orgánico sugería que el efecto Gibbs-Marangoni podría estar presente.

De acuerdo con lo anterior, en la presente tesis se descarta el mecanismo que se basa únicamente en el efecto Gibbs-Marangoni. La evidencia experimental sugiere que la manipulación de las variables operacionales asociadas al método de preparación, son las que deben considerarse en la definición y en la estandarización de las condiciones de trabajo que permitan obtener un tamaño de partícula deseado.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1 Conclusiones

En la presente investigación se llevó a cabo un estudio sistemático de la influencia de los materiales de partida y las variables asociadas al proceso de emulsificación-difusión, sobre las características de tamaño y potencial zeta de partículas lipídicas. Así, se identificaron como factores determinantes la velocidad de emulsificación y el tiempo de emulsificación, es decir, aquellos que están relacionados de forma directa en la eficiencia del proceso de emulsificación.

Respecto al efecto de los materiales de partida, se concluye que las partículas preparadas a partir de GDS como lípido, EtAc como solvente orgánico y PLX como estabilizante, presentan los menores tamaños de partícula y que el uso de MEK, MetAc y EtAc como solventes orgánicos, empleando como lípidos SAc y SAic, no evidencia diferencias en el tamaño de las partículas. El empleo de solventes orgánicos que no permitan su fácil difusión en la fase de dilución (como por ejemplo BA) da lugar a partículas de gran tamaño con un elevado PDI. De otro lado, los tensioactivos iónicos no son adecuados para la preparación de partículas lipídicas. Para este tipo de sistemas se requieren agentes estabilizantes tales como PLX y PVA, siendo el primero más eficiente en la disminución del tamaño y el segundo, en la estabilización de las dispersiones. Ambos agentes estabilizantes actúan mediante un mecanismo estérico que para el caso de PLX resulta más sensible a la adición de electrolitos.

Finalmente, y considerando todos los resultados obtenidos, aunque se demuestra la validez del parámetro de solubilidad como una herramienta para el diseño racional de partículas lipídicas, que permite proponer y predecir la interacción de los materiales de partida en las características finales de las partículas, en el presente trabajo de investigación se favorece la hipótesis de que cada partícula lipídica se origina a partir de cada gota de emulsión formada en la etapa de emulsificación y que son las variables asociadas a dicha etapa, las que deben ser consideradas para el diseño de partículas que satisfagan un requisito específico de tamaño.

## **5.2 Recomendaciones**

El presente estudio significa un avance para el Grupo de Investigación en Desarrollo y Calidad de Productos Farmacéuticos y Cosméticos – GIDECA, respecto al entendimiento y a la identificación de los factores determinantes para definir las características de partículas lipídicas preparadas por el método de emulsificación-difusión. Esto abre la puerta a nuevas investigaciones tanto básicas como aplicadas, dirigidas al fin último de diseñar productos y procesos que sean transferibles al sector industrial.

Respecto a la investigación básica, los próximos pasos a seguir deben orientarse hacia el estudio de la interacción lípido – agente estabilizante, ya que si bien es la base para la estabilización de este tipo de sistemas coloidales, podría tener repercusiones significativas respecto a la purificación de las partículas. En adición, es bien conocido que elevadas concentraciones de agentes tensioactivos como las utilizadas en este estudio, podrían generar respuestas adversas en seres vivos. De otro lado, aún no se tiene claridad acerca de cómo la estructura y la reología de las dispersiones de partículas lipídicas determina los fenómenos de

gelación reportados en la literatura. En adición, el trabajo en este tema también debe dirigirse hacia el conocimiento de las partículas lipídicas como transportadores de moléculas activas. Así, una etapa subsecuente se debe contribuir a dar respuesta a preguntas relacionadas con la organización estructural y el sitio exacto en donde podrían localizarse las moléculas activas que sean eventualmente incorporadas en la matriz de partículas lipídicas. Con este propósito se debe avanzar en la aplicación de técnicas de caracterización de materiales para determinar, entre otros, el grado de cristalinidad (p.ej., difracción de rayos X), las temperaturas y entalpías de fusión (p.ej., calorimetría diferencial de barrido) y la organización estructural interna (p.ej., resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  NMR y  $^{13}\text{C}$  NMR).

De otro lado, desde el punto de vista de la investigación aplicada, este trabajo puede debe ser continuado con la evaluación de la estabilidad de este tipo de material particulado, tanto al estado sólido como en dispersión. Igualmente, es necesario identificar estrategias para incorporar estos materiales en vehículos de interés para el diseño de productos farmacéuticos y cosméticos. Una vez se disponga de la información aportada por las investigaciones anteriormente propuestas, es recomendable proceder a evaluar el rendimiento y posibilidades de escalamiento del método considerando su posible implementación en el desarrollo sostenible de productos que involucren este tipo de tecnología.



## BIBLIOGRAFÍA

Almeida A., Souto E. (2007). Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(6), 478-90.

AL-Saden A.A., Whateley T.L., Florence A.T. (1982). Poloxamer association in aqueous solution. *Journal of Colloid and Interface Science*. 90 (2), 303-309.

Avgoustakis K., Beletsi A., Panagi Z., Klepetsanis P., Livaniou E., Evangelatos G., Ithakissios D.S. (2003). Effect of copolymer composition on the physicochemical characteristics, in vitro stability, and biodistribution of PLGA–mPEG nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 259 (1-2), 115-127.

Barton A. Solubility parameters (1975). *Chemical reviews*. 75 (6), 731-753.

Battaglia L., Trotta M., Gallarate M., Carlotti M.E., Zara G.P. Bargoni A. (2007). Solid lipid nanoparticles formed by solvent-in-water emulsion–diffusion technique: Development and influence on insulin stability. *Journal of Microencapsulation*. 24(7), 672-684.

Battaglia L., Gallarate M. (2012). Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 9(5), 497-508.

Blas P., Giovagnoli S., Schoubben A., Ricci M., Rossi C. (2007). Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(6), 454–477.

Bunjes H., Westesen K., Koch M. (1996). Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 129(1-2), 159-173.

Calderone M., Rodier E., Letourneau J.J., Fages J. (2007). Solidification of Precirol® by the expansion of a supercritical fluid saturated melt: From the thermodynamic balance towards the crystallization aspect. *Journal of Supercritical Fluids*. 42 (2), 189-199.

Calvo P., Vila Jato J.L., Alonso M.J. (1997). Effect of lysozyme on the stability of polyester nanocapsules and nanoparticles: stabilization approaches. *Biomaterials*. 18, 1305-1310.

Cavallia R., Gasco M., Chetoni P., Burgalassi S., Saettone M. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal of Pharmaceutics*. 238 (1–2), 241–245.

Charcosset C., El-Harati A., Fessi H. (2005). Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of Controlled Release*. 108(1), 112–120.

Chattopadhyay P., Shekunov B., Yim B., Cipolla D. & Boyd, B. (2007). Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(6), 444-453.

Dingler A., Gohla S. (2002). Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *Journal of Microencapsulation*. 19 (1), 11-16.

Feczko T., Tóth J., Gyenis J. (2008). Comparison of the preparation of PLGA–BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 319 (1-3), 188-195.

Fernandes C., Mandawgade S., Patravale V. (2013). Solid lipid nanoparticles of etoposide using solvent emulsification diffusion technique for parenteral administration. *International Journal of Pharmabioscience and Technology*. 1(1), 27-33.

Finke J., Schomlke H., Klages C. Müller C. (2013). Controlling solid lipid nanoparticle adhesion by polyelectrolyte multilayer surface modifications. *International Journal of Pharmaceutics*. 449(1-2), 59-71.

Freitas C., Müller RH. (1999). Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 47 (2), 125-132.

Gasco M. (1993). Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent No 5.250.236.

Gasco M., Morel S., Carpignano R. (1992). Optimization of the incorporation of deoxycorticosterone acetate in lipospheres. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 38, 7-10.

Gaumet M., Vargas A., Gurny R., Delie F. (2008). Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 69(1), 1–9.

González M., Nikolić S., García M., Egea M., Souto E., Calpena A. (2011). Potential use of nanostructured lipid carriers for topical delivery of flurbiprofen. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(1), 242-51.

Gordillo Galeano A. (2012). Preparación y caracterización de micropartículas sólidas lipídicas cargadas con aceite esencial de Cidrón (*Aloysia triphylla*) mediante emulsificación por ultrasonido. Tesis de maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia.

Grenha A., López C., Carvalho E., Seijo B. (2008). Microspheres containing lipid/chitosan nanoparticles complexes for pulmonary delivery of therapeutic proteins. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(1), 83–93.

Guzmán Pulido J.S. (2013). Evaluación de la influencia del material lipídico en el diseño de partículas sólidas lipídicas. Trabajo de grado Carrera de Farmacia. Universidad nacional de Colombia.

Han F., Li S., Yin R., Liu H., Xu L. (2008). Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: Nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 315, 210-216.

Hansen M. (1969) The Universality of the solubility parameter. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 8 (1), 2-11

Harshad H., Manasmita D., Sanyog J. (2011). Solid lipid nanoparticles: an oral bioavailability enhancer vehicle. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 8(11), 1407-1424.

Haynes W.M. (2013). *Handbook of Chemistry and Physics*. (Edition 93<sup>RD</sup>) London. CRC Press Taylor and Francis group. 424:488

Helgason T., Awad T. S., Kristbergsson K., McClements D. J., Weiss J. (2008) Influence of polymorphic transformations on gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 85 (6), 501-511.

Hiemenz P.C. Rajagopalan R (1997) *Principles of Colloid and Surface Chemistry*. (Third edition) Boca Raton, CRC Press. Chapter 3.

Hommos A. (2009). Nanostructured lipid carriers (NLC) in dermal and personal care formulations. Tesis doctoral "Doctor rerum naturalium". University of Berlin.

Hou, D., Xie, C., Huang, K., Zhu, C. (2003). The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24(10), 1781–1785.

Hunter R.J., Ottewill R., Rowell R.L. (1981). Zeta potential in colloid science. Principles and applications. Academic Press Inc., London. Chapter 6, 219-257.

Institute of Nanotechnology. (2013). ¿What is nanotechnology?. Disponible URL: <http://www.nano.org.uk/what-is-nanotechnology>. Consultada el 24 de Noviembre de 2013.

International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Impurities: Guideline for residual solvents Q3C(R5), ICH, Ginebra, 2011.

Jores K., Mehnert W., & Mäder K. (2003). Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electro spin resonance study. *Pharmaceutical Research*. 20(8), 1272-1283.

Kheradmandnia S., Vasheghani-Farahani E., Nosrati M., Atyabi F. (2010). Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 6 (6), 753-759.

Kovacevic A., Savic S., Vuleta G., Müller RH., Keck CM. (2011). Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics*. 406 (1-2), 163-172.

L'Oréal. (2010). The Use Of Nanotechnologies In Cosmetology, Sustainability Factsheet. 1-2. Disponible URL:

<http://sustainabledevelopment09.loreal.com/pdf/topics/Cosmetology.pdf>.

Consultado el 24 de Noviembre de 2013.

Lippacher A., Müller R.H., Mäder K. (2001). Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 214 (1-2), 9–12.

Liu J., Gong T., Fu H., Wang C., Wang X., Chen Q. (2008). Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *International Journal of Pharmaceutics*, 356(1-2), 333–344.

Lourdes Garzón M., Hernández A., Vázquez R., Villafuerte L., García, B. (2008). Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y de acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 39 (4), 50-66.

Lourdes Garzón M., Vázquez R., Villafuerte L., García B., Hernández, A. (2009). Efecto de los componentes de la formulación en las propiedades de las nanopartículas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 40(2), 26-40.

Lück M, Paulke B.R, Schröder W., Blunk T., Müller R.H. (1998). Analysis of plasma protein adsorption on polymeric nanoparticles with different surface characteristics. *Journal of Biomedical Materials Research*. 39:478-485.

Lucks J.S., Müller R.H. (1993) Medication vehicles made of solid lipid particles (Solid Lipid Nanospheres - SLN) EP19920919477, WO/1993/005768.

Luo Q., Zhao J., Zhang X, Pan W. (2011). Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with chitosan oligosaccharides and it's potential use in ocular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*. 403(1–2), 185–191.

Luo Y., Chen D., Ren L., Zhao X., Qin J. (2006). Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*. 114 (1), 53–59.

Martin, A., Bustamante, P., & Chun, A. (1993). *Physical Pharmacy Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences* (Fourth edition). Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins.

Martínez Rodríguez, L (2014). Estudio de la encapsulación de quercetina en partículas sólidas lipídicas preparadas por la método de emulsificación difusión. Trabajo de grado Carrera de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia.

Martins S., Tho I., Ferreira DC., Souto E.B., Brandl M. (2011). Physicochemical properties of lipid nanoparticles: Effect of lipid and surfactant composition. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37 (7), 815-824.

Mighi, K., & Sebti, T. (2006). Solid lipid particles as pharmaceutically acceptable fillers or carriers for inhalation. European Patent EP1674085 A1. WO2006066367.

Miglietta A., Cavalli R., Bocca C., Gabriel L., Gasco M. (2000). Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *International Journal of Pharmaceutics*. 210 (1-2), 61-67.

Moinard D., Chevalier Y., Briançon S., Beney L., Fessi H. (2008). Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion–diffusion. *Journal of Colloid and Interface Science*. 317, 458–468.

Montaño Hernández, P. (2012). Nanopartículas sólidas lipídicas como vectores de ingredientes activos de interés en productos cosméticos y de cuidado personal. Trabajo final especialización en Ciencia y Tecnología Cosmética. Universidad Nacional de Colombia.

Mora-Huertas C., Fessi H., Elaissari A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*. 163, 90-122.

Mora-Huertas C., Couenne. F, Fessi H, Elaissari A. (2012). Electrokinetic properties of poly- $\epsilon$ -caprolactone-based nanoparticles prepared by nanoprecipitation and emulsification-diffusion methods: a comparative study. *Journal of Nanoparticle Research*, 14 (6), 876.

Mora-Huertas C., Garrigues O., Fessi H., Elaissari A. (2012). Nanocapsules prepared via nanoprecipitation and emulsification–diffusion methods: Comparative study. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80, 235-239.

Murakami H., Kawashima Y., Niwa T., Hino T. Takeuchi H., Kobayashi M (1997) Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticle. *International Journal of Pharmaceutics*. 149 (1), 43-49.

Müller R.H., Mehnert W., Lucks J.S., Schwarz C, Müller A., Weyhers H., Freitas C., Rü D. (1995). Solid lipid nanoparticles (SLN) an alternative colloidal carrier system for controled drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 41 62-69.

Müller RH., Rühl D., Runge S. (1996). Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutics*. 144 (1), 115-121.

Müller R.H., Maassen S., Weyhers H, Specht F., Lucks J.S. (1996). Cytotoxicity of magnetite-loaded polylactide, polylactide/glycolide particles and solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 138 (1), 85-94.

Müller R.H., Maassen S., Schwarz C., Mehnert W. (1997). Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes. *Journal of Controlled Release*. 47 (3), 261-269.

Müller R.H., Dingler A., Schneppe T., Gohla S. (2000). Large scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanosuspensions (DissoCubes). *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker Inc. 356-376.

Müller R.H., Radtke, M. & Wissing, S. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 121–128.

Müller R.H., Shegokar R. & Keck C. (2011). 20 Years of Lipid Nanoparticles (SLN & NLC): Present State of Development & Industrial Applications. *Current Drug Discovery Technologies*. 8, 207-227.

Nassimi M., Schleh C., Lauenstein H., Hussein R., Hoymann H., Koch W. Pohlmann G., Krug N., Sewald K., Rittinghausen S., Braun A., Müller-Goymann C. (2010). A toxicological evaluation of inhaled solid lipid nanoparticles used as a potential drug delivery system for the lung. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 75(2), 107–116.

Owens D.E., Peppas N.A. (2006). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 307:93-102.

Pardeike J., Hommoss A., Müller RH. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *International Journal of Pharmaceutics*. 366, 170–184.

Pardeshi C.V, Rajput P.V., Belgamwar V.S., Tekade A.R. Surana S.J. (2013). Novel surface modified solid lipid nanoparticles as intranasal carriers for ropinirole hydrochloride: application of factorial design approach. *Drug Delivery*. 20 (1), 47-56.

Prego C., Fabre M., Torres D., Alonso M.J. (2006). Efficacy and mechanism of action of chitosan nanocapsules for oral peptide delivery. *Pharmaceutical Research* 23, 549-556.

Priano L., Esposti D., Esposti R., Castagna G., De Medici C., Fraschini F. (2007). Solid lipid nanoparticles incorporating melatonin as new model for sustained oral and transdermal delivery systems. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(10), 3596-3601.

Qi J., Lu Y. & Wu W. (2012). Absorption, disposition and pharmacokinetics of solid lipid nanoparticles. *Current Drug Metabolism*. 13 (4), 418-428.

Qiang F H., Sai-Ping, J., Yong-Zhong, D., Hong, Y., Yi-Qing, Y., Su, Z. (2005) Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 45 (3-4), 167-173.

Quintanar-Guerrero D., Allémann E., Fessi H., Doelker E. (1998). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24 (12), 1113-1128.

Quintanar-Guerrero, D., Tamayo-Esquivel, D., Ganem-Quintanar, A., Allémann E., Doelker, E. (2005). Adaptation and optimization of the emulsification-diffusion technique to prepare lipidic nanospheres. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 26(2), 211-218.

Reithmeier H., Herrmann J. Gopferich A. (2001). Lipid microparticles as a parenteral controlled release device for peptides. *Journal of Control Release*. (73), 339–350.

Roco M. C. (2011). Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: the long view of nanotechnology development: The National Nanotechnology Initiative at 10 Years. *Science Policy Reports*. 1, 7.

Rosenblatt K.M., Bunjes H. (2009). Poly (vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the alpha-modification. *Molecular Pharmaceutics*. 6 (1), 105-120.

Rowe R., Sheskey P., Quinn ME. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. (Sixth edition). 293-295; 697-703.

Salmaso S., Elvassore N., Bertuccio A., Caliceti, P. (2009). Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas-assisted melting atomization process. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98(2), 640-650.

Salminen H., Helgason T., Aulbach S., Kristinsson B., Kristbergsson K., Weiss J. (2014). Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 426, 256-263.

Saraf S., Mishra D., Asthana A., Jain R., Singh S. (2006). Lipid microparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Vaccine* (24), 45-56.

Schlupp P., Blaschke T., Kramer K., Höltje H., Mehnert W.W., Schäfer-Korting M. (2011). Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: a systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. *Skin Pharmacology and Physiology*. 24 (4), 199–209.

Schubert M., Müller-Goymann. (2003). Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55(1), 125-131.

Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S. & Müller R.H. (1994) Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *Journal of Controlled Release*. 30, 83-96.

Serpe, L., Catalano, M., Cavalli, R., Ugazio, E., Bosco, O., Canaparo, R. (2004). Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 58(3), 673–680.

Shah K.A., Date A.A., Joshi M., Patravale VP. (2007) Solid lipid nanoparticles (SLN) of tretinoin: Potential in topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 345 (1-2), 163-171.

Shah M., Agrawal Y. (2013). High throughput screening an *in silico* solubility parameter approach for lipids and solvents in SLN preparations. *Pharmaceutical Development and Technology*. 18(3), 582-590.

Shegokar R., Singha K.K., Müller R.H. (2011) Production and stability of stavudine solid lipid nanoparticles — From lab to industrial scale. *International Journal of Pharmaceutics*, 416 (2), 461-470

Siekmann, B., Westesen, K. (1996). Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 42(2), 104-109.

Siekmann, B. & Westesen, K. (1992), Submicron-sized parenteral carrier systems based on solid lipids. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*. 1, 123-126.

Silva A.C., González-Mira E., García M.L., Egea M.A., Fonseca J., Silva R., Santos D., Souto E.B., Ferreira D. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 86 (1), 158-165.

Souto E. & Müller R.H. (2009). Lipid nanoparticles: effect on bioavailability and pharmacokinetic changes. *Drug Delivery: Handbook of Experimental Pharmacology*. 197, 115-141.

Sujit B. (1984). Solubility of organic mixtures in water. *Environmental Science & Technology*. 18(8), 587–591.

Surajit D., Wai K., Parijat K., Sanggu K., Reginald B.H. (2011). Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88(1), 483-489.

Surajit D. & Anumita C. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 12(1), 62-76.

Surajit D., Wai K., Reginald B.H., Tan B. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47 (1), 139-151.

Swati A.G., Vinod C.M., Padma V.D. (2009). Nanoparticles of polyethylene sebacate: A new biodegradable polymer. *American Association of Pharmaceutical Scientists. AAPS PharmSciTech*, 10 (3); 935-942.

Tadros T.F., Paul Becher (1983) Emulsion stability. *Encyclopedia of emulsion technology*. (First edition) New York. Marcel Dekker. 129-285.

Tan S.W. & Billa N. (2014). Lipid effects on expulsion rate of amphotericin B from solid lipid nanoparticles. *American Association of Pharmaceutical Scientists AAPS PharmSciTech.* 15 (2), 287-295.

Trotta M., Cavalli R., Carlotti M., Battaglia L., Deber F. (2005). Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion–diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics.* 288(2), 281–288.

Trotta M., Debernardi F., Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics.* (257), 153-160.

Urbán Morlán Z., Ganem Rondero A., Melgoza Contreras LM., Escobar Chávez JJ.Nava Arzaluz MG., Quintanar Guerrero D. (2010). Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *International Journal of Nanomedicine.* 5, 611-620.

van Krevelen., & te Nijehnhuisn. (2009). *Properties of polymers their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions (Fourth edition).* Amsterdam, Holanda. Elsevier. Chapter 7, 189-225.

Wang Y., Deng Y., Mao S., Jin S., Wang J., Bi D. (2005). Characterization and body distribution of beta-elemene solid lipid nanoparticles (SLN). *Drug Development and Industrial Pharmacy.* 31 (8), 769-778.

Weber S., Zimmer A., Pardeike J. (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for pulmonary application: A review of the state of the art. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 86 (1), 7-22.

Westesen, K. & Siekmann, B. (1997). Investigation of the gel formation of phospholipid stabilized solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 151, 35-45.

Weyhers H., Ehlers S, Hahn H., Souto E.B., Müller R H (2006). Solid lipid nanoparticles (SLN) – Effects of lipid composition on in vitro degradation and in vivo toxicity. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 61 (6), 539-544.

Wissing S., Kayser O., Müller, R.H. (2004). Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 56 (9), 1257-1272.

Yang X., Liu Y., Liu C., Zhang Na. (2012) Biodegradable solid lipid nanoparticle flocculates for pulmonary delivery of insulin. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 8 (5), 834-842.

Yung K. & Cheng-Chin W. (2014). Cationic solid lipid nanoparticles with cholesterol-mediated surface layer for transporting saquinavir to the brain. *Biotechnology Progress*. 30(1), 198-206.

Zambrano M.L., Mercado E., Gutiérrez E., Castaño E., Quintanar-Guerrero D. (2011). Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT - Food Science and Technology*. 44, 1362-1368.

Zara G., Cavalli R., Bargoni A., Fundarò A., Vighetto D., & Gasco M. (2002). Intravenous administration to rabbits of non-stealth and stealth doxorubicin-loaded solid lipid nanoparticles at increasing concentrations of stealth agent: pharmacokinetics and distribution of doxorubicin in brain and other tissues. *Journal of Drug Targeting*. 10(4), 327-35.

## ANEXOS

### Anexo 1: Datos primarios de la influencia de la concentración de GDS en cuanto al tamaño y el PDI de las partículas.

Influencia de la concentración de GDS													
Número de replica	Número de mediciones	GDS (0.1g)		GDS (0.25g)		GDS (0.5g)		GDS (0.75g)		GDS (1g)		GDS (1.5g)	
		Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI						
1	1	126	0.259	153	0.123	198	0.149	220	0.1660	289	0.133	488	0.354
	2	124	0.267	151	0.104	199	0.128	217	0.1390	278	0.160	664	0.294
	3	126	0.278	150	0.129	201	0.121	218	0.1070	288	0.164	532	0.326
	4	127	0.246	151	0.140	199	0.161	217	0.1080	276	0.145	545	0.312
	5	125	0.265	153	0.131	201	0.110	216	0.1520	271	0.143	647	0.283
2	1	137	0.297	163	0.150	210	0.130	213	0.0660	241	0.151	630	0.345
	2	130	0.301	162	0.113	205	0.121	208	0.1890	239	0.150	428	0.335
	3	136	0.312	164	0.085	201	0.110	211	0.1090	236	0.167	466	0.333
	4	137	0.338	162	0.109	200	0.110	207	0.1500	242	0.176	543	0.385
	5	142	0.297	163	0.118	204	0.141	212	0.1310	241	0.096	469	0.265
3	1	117	0.173	164	0.181	186	0.157	211	0.1560	244	0.098	271	0.148
	2	116	0.168	164	0.176	184	0.099	212	0.1410	253	0.111	246	0.204
	3	117	0.154	162	0.205	186	0.147	213	0.1340	250	0.167	283	0.161
	4	116	0.169	162	0.187	188	0.144	208	0.0910	247	0.174	248	0.144
	5	117	0.175	158	0.195	188	0.071	214	0.1400	251	0.141	271	0.139
	Promedio	126	0.247	159	0.143	197	0.127	213	0.132	256	0.145	449	0.269
	DesvEst	8.7	0.062	5.4	0.037	8.2	0.024	4.0	0.031	18.5	0.026	150.8	0.086
	%CV	6.9	25.2	3.4	26.0	4.1	19.2	1.9	23.7	7.2	17.8	33.6	32.1
	IC 95%	4.8	0.034	3.0	0.021	4.5	0.013	2.2	0.017	10.3	0.014	83.5	0.048

**Anexo 2:** Datos primarios de la influencia de la concentración de SAlc en cuanto al tamaño y el PDI de las partículas.

Influencia de la concentración de SAlc											
Número de replica	Número de mediciones	SAlc (0.1g)		SAlc (0.25g)		SAlc (0.5g)		SAlc (1g)		SAlc (1.5g)	
		Tamaño de partícula	PDI								
1	1	329	0.123	370	0.074	294	0.092	304	0.217	264	0.139
	2	332	0.158	367	0.159	289	0.127	313	0.168	273	0.104
	3	322	0.161	359	0.098	297	0.031	307	0.213	271	0.128
	4	330	0.199	365	0.142	297	0.164	313	0.110	265	0.113
	5	337	0.099	371	0.105	289	0.111	303	0.207	276	0.114
2	6	363	0.110	346	0.197	328	0.060	302	0.214	341	0.122
	7	367	0.016	332	0.094	335	0.071	303	0.141	333	0.113
	8	358	0.046	342	0.127	335	0.005	299	0.217	326	0.111
	9	365	0.025	330	0.130	330	0.036	314	0.286	329	0.137
	10	367	0.081	334	0.192	331	0.081	296	0.193	325	0.106
3	11	360	0.114	356	0.218	325	0.077	279	0.229	314	0.128
	12	369	0.124	358	0.139	328	0.141	284	0.207	315	0.086
	13	363	0.074	341	0.159	325	0.085	292	0.224	309	0.087
	14	360	0.016	355	0.220	334	0.037	284	0.174	307	0.048
	15	360	0.035	352	0.193	324	0.077	292	0.187	311	0.067
	Promedio	352	0.092	352	0.150	317	0.080	299	0.199	304	0.107
	DesvEst	16.8	0.057	13.9	0.046	18.1	0.043	11.1	0.041	26.8	0.025
	%CV	4.8	61.8	3.9	31.0	5.7	54.5	3.7	20.5	8.8	23.9
	IC 95%	9.3	0.031	7.7	0.026	10.0	0.024	6.2	0.023	14.8	0.014

**Anexo 3: Datos primarios de la influencia de la concentración de SAc en cuanto al tamaño y el PDI de las partículas.**

Influencia de la concentración de SAc											
Número de replica	Número de mediciones	SAc (0.1g)		SAc (0.25g)		SAc (0.5g)		SAc (1g)		SAc (1.5g)	
		Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI	Tamaño de partícula	PDI
1	1	465	0.211	410	0.071	406	0.117	389	0.068	345	0.101
	2	539	0.169	406	0.046	413	0.136	389	0.002	339	0.061
	3	453	0.217	398	0.009	404	0.082	392	0.026	364	0.124
	4	473	0.206	394	0.090	376	0.141	364	0.193	335	0.052
	5	472	0.254	403	0.063	407	0.087	382	0.119	346	0.119
2	1	482	0.165	369	0.126	388	0.157	404	0.093	411	0.155
	2	468	0.196	359	0.111	502	0.088	392	0.072	402	0.100
	3	504	0.169	364	0.062	483	0.183	390	0.054	384	0.120
	4	522	0.110	362	0.098	516	0.079	384	0.094	391	0.155
	5	524	0.174	370	0.115	349	0.089	381	0.065	381	0.097
3	1	488	0.087	384	0.011	369	0.138	419	0.180	475	0.107
	2	435	0.166	361	0.160	357	0.057	420	0.179	435	0.141
	3	465	0.078	380	0.018	338	0.043	493	0.159	467	0.094
	4	459	0.122	368	0.102	344	0.135	449	0.091	441	0.057
	5	435	0.155	376	0.058	358	0.034	408	0.16	450	0.146
	Promedio	479	0.165	380	0.076	401	0.104	404	0.104	398	0.109
	DesvEst	31	0.0	18	0.044	57	0.043	32	0.059	47	0.034
	%CV	6.6	29.873	4.7	58.2	14.3	41.6	7.9	57.0	11.9	31.0
	IC 95%	17.4	0.027	9.8	0.024	31.7	0.024	17.7	0.033	26.2	0.019

**Anexo 4:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza y concentración de los lípidos evaluados (GDS, SAlc y SAc) en cuanto al potencial zeta de las partículas.

Número de replica	Número de mediciones	Influencia de la concentración de GDS						Influencia de la concentración de SAlc				Influencia de la concentración de SAc			
		GDS (0.1g) Potencial z (mV)	GDS (0.25g) Potencial z (mV)	GDS (0.5g) Potencial z (mV)	GDS (0.75g) Potencial z (mV)	GDS (1g) Potencial z (mV)	GDS (1.5g) Potencial z (mV)	SAlc (0.1g) Potencial z (mV)	SAlc (0.5g) Potencial z (mV)	SAlc (1g) Potencial z (mV)	SAlc (1.5g) Potencial z (mV)	SAc (0.1g) Potencial z (mV)	SAc (0.5g) Potencial z (mV)	SAc (1g) Potencial z (mV)	SAc (1.5g) Potencial z (mV)
1	1	-13.8	-12.6	-9.3	-10.0	-10.8	-14.9	-9.0	-15.8	-13.5	-15.4	-27.0	-16.4	-22.3	-22.9
	2	-13.0	-11.8	-9.2	-10.5	-11.9	-14.4	-9.3	-16.4	-13.3	-15.2	-27.5	-14.6	-21.9	-23.1
	3	-11.3	-12.6	-9.4	-10.6	-11.0	-16.2	-9.0	-16.0	-13.6	-15.8	-26.2	-15.4	-22.0	-23.4
	4	-11.6	-13.0	-9.4	-10.7	-11.7	-13.0	-8.4	-16.9	-14.0	-16.9	-25.5	-15.2	-22.4	-23.2
	5	-11.5	-13.2	-9.9	-10.8	-10.6	-12.5	-8.6	-16.9	-13.7	-18.4	-25.3	-14.3	-21.9	-23.2
2	1	-15.8	-8.6	-18.1	-13.8	-13.7	-9.4	-15.7	-15.5	-11.9	-12.4	-21.2	-24.0	-21.7	-17.8
	2	-13.9	-9.2	-21.1	-12.9	-13.0	-10.2	-15.8	-15.2	-12.4	-12.8	-20.1	-23.4	-21.2	-18.0
	3	-14.9	-10.3	-19.6	-13.5	-12.2	-9.5	-19.3	-15.7	-12.7	-12.8	-20.9	-24.1	-22.2	-16.9
	4	-16.5	-10.3	-20.8	-14.2	-12.9	-28.3	-17.5	-16.0	-13.6	-12.4	-19.8	-24.0	-21.9	-17.6
	5	-15.6	-8.3	-18.1	-13.6	-12.9	-28.7	-17.0	-16.7	-13.8	-13.0	-20.4	-22.6	-21.9	-17.5
3	1	-11.0	-11.3	-13.0	-6.9	-8.9	-17.9	-16.1	-16.7	-14.1	-15.2	-15.4	-23.3	-22.4	-23.3
	2	-10.2	-10.6	-12.5	-7.6	-9.1	-18.0	-17.3	-17.3	-16.0	-14.6	-15.8	-23.2	-22.2	-22.9
	3	-12.0	-13.5	-11.7	-7.8	-9.3	-20.8	-17.1	-17.9	-16.5	-13.9	-14.4	-23.7	-22.3	-22.8
	4	-10.2	-14.9	-11.6	-7.1	-8.8	-17.5	-17.0	-18.2	-16.3	-12.8	-14.5	-23.0	-23.1	-23.4
	5	-9.2	-11.4	-14.0	-7.3	-8.9	-18.2	-20.9	-18.8	-16.5	-12.2	-14.9	-22.7	-21.2	-23.1
	Promedio	-12.7	-11.4	-13.8	-10.5	-11.1	-16.6	-14.5	-16.7	-14.1	-14.3	-20.6	-20.7	-22.0	-21.3
	DesvEst	2.3	1.9	4.5	2.7	1.7	5.9	4.4	1.0	1.5	1.9	4.8	4.1	0.5	2.7
	%CV	17.9	16.7	32.4	25.6	15.6	35.5	30.0	6.2	10.6	13.1	23.4	19.6	2.2	12.8
	IC 95%	1.3	1.1	2.5	1.5	1.0	3.3	2.4	0.6	0.8	1.0	2.7	2.2	0.3	1.5

**Anexo 5:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza del solvente orgánico sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando EtAc.

Influencia del solvente orgánico (MEK)							
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido					
		GDS (0.1g)		SAIc (0.1g)		SAc (0.1g)	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	241	0.114	387	0.044	519	0.079
	2	235	0.072	394	0.070	525	0.041
	3	234	0.093	391	0.092	506	0.062
	4	236	0.069	389	0.071	510	0.021
	5	234	0.103	380	0.112	510	0.102
2	1	260	0.041	387	0.022	516	0.066
	2	264	0.137	378	0.050	517	0.006
	3	263	0.178	384	0.033	521	0.123
	4	261	0.124	379	0.020	523	0.010
	5	262	0.139	372	0.127	523	0.061
3	1	276	0.121	415	0.018	542	0.054
	2	275	0.108	412	0.068	538	0.005
	3	272	0.228	405	0.025	537	0.053
	4	265	0.135	402	0.069	510	0.036
	5	272	0.103	405	0.072	530	0.081
	Promedio	257	0.118	392	0.060	522	0.053
	DesvEst	16	0.045	13	0.034	11	0.035
	%CV	6.2	38.3	3.4	56.5	2.1	65.1
	IC 95%	8.8	0.025	7.3	0.019	6.1	0.019

**Anexo 6:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza del solvente orgánico sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando MEK.

Influencia del solvente orgánico (MEK)							
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido					
		GDS (0.1g)		SAIc (0.1g)		SAc (0.1g)	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	241	0.114	387	0.044	519	0.079
	2	235	0.072	394	0.070	525	0.041
	3	234	0.093	391	0.092	506	0.062
	4	236	0.069	389	0.071	510	0.021
	5	234	0.103	380	0.112	510	0.102
2	1	260	0.041	387	0.022	516	0.066
	2	264	0.137	378	0.050	517	0.006
	3	263	0.178	384	0.033	521	0.123
	4	261	0.124	379	0.020	523	0.010
	5	262	0.139	372	0.127	523	0.061
3	1	276	0.121	415	0.018	542	0.054
	2	275	0.108	412	0.068	538	0.005
	3	272	0.228	405	0.025	537	0.053
	4	265	0.135	402	0.069	510	0.036
	5	272	0.103	405	0.072	530	0.081
	Promedio	257	0.118	392	0.060	522	0.053
	DesvEst	16	0.045	13	0.034	11	0.035
	%CV	6.2	38.3	3.4	56.5	2.1	65.1
	IC 95%	8.8	0.025	7.3	0.019	6.1	0.019

**Anexo 7:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza del solvente orgánico sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando MetAc.

Influencia del solvente orgánico (MetAc)							
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido					
		GDS (0.1g)		SAIc (0.1g)		SAc (0.1g)	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	234	0.105	516	0.082	568	0.159
	2	232	0.114	529	0.060	569	0.208
	3	232	0.112	534	0.168	587	0.188
	4	230	0.148	529	0.113	580	0.087
	5	236	0.119	537	0.171	582	0.155
2	1	211	0.213	399	0.057	489	0.062
	2	176	0.102	396	0.108	508	0.216
	3	175	0.098	385	0.136	503	0.202
	4	174	0.132	395	0.075	498	0.183
	5	177	0.121	390	0.084	659	0.260
3	1	250	0.126	405	0.084	444	0.122
	2	250	0.131	411	0.099	446	0.161
	3	254	0.139	405	0.082	444	0.151
	4	251	0.136	402	0.120	453	0.162
	5	246	0.143	402	0.061	453	0.096
	Promedio	222	0.129	442	0.100	519	0.161
	DesvEst	31	0.028	64	0.036	67	0.053
	%CV	13.9	21.4	14.4	36.2	13.0	32.9
	IC 95%	17.0	0.02	35.3	0.02	37.4	0.03

**Anexo 8:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza de los solventes orgánicos evaluados (EtAc, MEK y MetAc) en cuanto al potencial zeta de las partículas.

Número de replica	Número de mediciones	Influencia del solvente orgánico (EtAc)			Influencia del solvente orgánico (MEK)			Influencia del solvente orgánico (MetAc)		
		GDS (0.1g) Potencial z (mV)	SAlc (0.1g) Potencial z (mV)	SAc (0.1g) Potencial z (mV)	GDS (0.1g) Potencial z (mV)	SAlc (0.1g) Potencial z (mV)	SAc (0.1g) Potencial z (mV)	GDS (0.1g) Potencial z (mV)	SAlc (0.1g) Potencial z (mV)	SAc (0.1g) Potencial z (mV)
1	1	-13.8	-9.0	-27.0	-8.8	-13.7	-15.1	-5.3	-10.0	-15.8
	2	-13.0	-9.3	-27.5	-8.5	-12.6	-15.2	-5.6	-10.8	-14.8
	3	-11.3	-9.0	-26.2	-8.6	-13.0	-15.2	-6.1	-11.7	-16.1
	4	-11.6	-8.4	-25.5	-8.8	-13.9	-15.6	-6.0	-10.6	-15.3
	5	-11.5	-8.6	-25.3	-8.5	-13.5	-15.4	-5.2	-10.6	-15.5
2	1	-15.8	-15.7	-21.2	-8.5	-13.5	-15.3	-5.6	-10.5	-15.8
	2	-13.9	-15.8	-20.1	-8.4	-14.2	-15.9	-5.9	-11.2	-14.8
	3	-14.9	-19.3	-20.9	-8.8	-12.7	-15.7	-6.2	-10.8	-15.7
	4	-16.5	-17.5	-19.8	-9.2	-14.1	-14.9	-5.7	-10.4	-16.4
	5	-15.6	-17.0	-20.4	-8.7	-13.3	-16.1	-5.6	-10.9	-16.1
3	1	-11.0	-16.1	-15.4	-8.8	-13.5	-15.5	-5.1	-10.4	-16.3
	2	-10.2	-17.3	-15.8	-8.9	-13.1	-15.8	-5.2	-9.7	-15.7
	3	-12.0	-17.1	-14.4	-8.7	-13.5	-15.2	-4.8	-10.2	-15.3
	4	-10.2	-17.0	-14.5	-8.9	-13.7	-15.2	-5.0	-11.2	-15.7
	5	-9.2	-20.9	-14.9	-8.9	-13.9	-15.0	-3.8	-10.4	-16.0
	Promedio	-12.7	-14.5	-20.6	-8.7	-13.5	-15.4	-5.4	-10.6	-15.7
	DesvEst	2.3	4.4	4.8	0.2	0.5	0.3	0.6	0.5	0.5
	%CV	17.9	30.0	23.4	2.3	3.5	2.3	11.3	4.7	3.1
	IC 95%	1.3	2.4	2.7	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3

**Anexo 9:** Datos primarios de la influencia de la naturaleza del agente estabilizante sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia del tipo de agente estabilizante														
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Tipo de agente estabilizante											
			PVA (5%)		PLX (5%)		Polisorbato 80 (5%)		SDS (5%)		ADBAC (5%)		CTAB (5%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula	PDI
1	1	GDS	358	0.240	203	0.167	138	0.385	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	354	0.165	200	0.211	137	0.411	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	349	0.149	198	0.194	131	0.462	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	359	0.158	190	0.211	133	0.363	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	352	0.210	193	0.199	132	0.424	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	1	GDS	342	0.180	239	0.268	184	0.468	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	340	0.189	238	0.255	183	0.489	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	350	0.211	233	0.262	180	0.504	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	345	0.233	230	0.250	180	0.475	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	341	0.211	224	0.325	179	0.469	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	1	GDS	383	0.199	191	0.183	154	0.469	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	370	0.231	188	0.200	153	0.432	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	365	0.187	187	0.186	147	0.491	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	360	0.161	192	0.184	146	0.466	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	363	0.202	187	0.204	149	0.489	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Promedio	355	0.195	206	0.220	155	0.453	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		DesvEst	12	0.029	20	0.043	20	0.041	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		%CV	3	15	10	20	13	9	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		IC 95%	7	0.02	11	0.02	11	0.02	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

### Anexo 10: Datos primarios de la influencia de la naturaleza del agente estabilizante sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido SAlc

Influencia del tipo de agente estabilizante														
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Tipo de agente estabilizante											
			PVA (5%)		PLX (5%)		Polisorbato 80 (5%)		SDS (5%)		ADBAC (5%)		CTAB (5%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	SAlc	360	0.099	370	0.074	435	0.408	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	SAlc	352	0.086	367	0.159	451	0.309	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	SAlc	351	0.094	359	0.098	435	0.292	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	SAlc	350	0.115	365	0.142	442	0.305	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	SAlc	352	0.089	371	0.105	449	0.316	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
2	1	SAlc	356	0.058	346	0.197	710	0.615	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	SAlc	356	0.103	332	0.094	667	0.499	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	SAlc	351	0.137	342	0.127	712	0.514	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	SAlc	362	0.138	330	0.130	714	0.473	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	SAlc	350	0.078	334	0.192	717	0.444	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	1	SAlc	370	0.19	356	0.218	533	0.194	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	2	SAlc	369	0.244	358	0.139	582	0.249	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	3	SAlc	371	0.243	341	0.159	567	0.186	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	4	SAlc	383	0.194	355	0.220	542	0.28	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
	5	SAlc	392	0.233	352	0.193	582	0.365	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		Promedio	362	0,140	352	0.150	509	0.387	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		DesvEst	13	0.064	14	0.046	112	0.125	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		%CV	4	45.71	4	31	22	32.34	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
		IC 95%	7	0.035	8	0.0	62	0.069	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

### Anexo 11: Datos primarios de la influencia de la naturaleza del agente estabilizante en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS y SAlc.

Influencia del tipo de agente estabilizante															
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Tipo de agente estabilizante						Tipo de lípido (0,25g)	Tipo de agente estabilizante					
			PVA (5%)	PLX (5%)	Polisorbato 80 (5%)	SDS (5%)	ADBAC (5%)	CTAB (5%)		PVA (5%)	PLX (5%)	Polisorbato 80 (5%)	SDS (5%)	ADBAC (5%)	CTAB (5%)
			Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)		Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)
1	1	GDS	-5.3	-12.6	-8.0	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.5	-15.8	-4.5	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	-4.8	-11.8	-8.2	N/A	N/A	N/A	SAlc	-4.0	-16.4	-5.1	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	-5.5	-12.6	-6.3	N/A	N/A	N/A	SAlc	-4.4	-16.0	-4.8	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	-5.1	-13.0	-5.8	N/A	N/A	N/A	SAlc	-4.4	-16.9	-4.3	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	-5.4	-13.2	-5.2	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.4	-16.9	-5.4	N/A	N/A	N/A
2	1	GDS	-6.9	-8.6	-7.4	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.7	-15.5	-9.8	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	-5.8	-9.2	-13.2	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.6	-15.2	-10	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	-5.8	-10.3	-9.3	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.6	-15.7	-11.7	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	-5.5	-10.3	-7.1	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.1	-16.0	-10.6	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	-6.7	-8.3	-11.8	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.4	-16.7	-9.4	N/A	N/A	N/A
3	1	GDS	-7.5	-11.3	-5.9	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.3	-16.7	-11.7	N/A	N/A	N/A
	2	GDS	-6.6	-10.6	-6.4	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.8	-17.3	-11.7	N/A	N/A	N/A
	3	GDS	-5.4	-13.5	-4.4	N/A	N/A	N/A	SAlc	-4.3	-17.9	-5.6	N/A	N/A	N/A
	4	GDS	-4.8	-14.9	-7.0	N/A	N/A	N/A	SAlc	-3.9	-18.2	-6.3	N/A	N/A	N/A
	5	GDS	-4.8	-11.4	-4.6	N/A	N/A	N/A	SAlc	-4.2	-18.8	-6.7	N/A	N/A	N/A
		Promedio	-5.7	-11.4	-7.4	N/A	N/A	N/A	Promedio	-3.8	-16.7	-7.8	N/A	N/A	N/A
		DesvEst	0.8	1.9	2.5	N/A	N/A	N/A	DesvEst	0.4	1.0	2.9	N/A	N/A	N/A
		%CV	15	17	34	N/A	N/A	N/A	%CV	11	6	37	N/A	N/A	N/A
		IC 95%	0.5	1.1	1.4	N/A	N/A	N/A	IC 95%	0.2	0.6	1.6	N/A	N/A	N/A

**Anexo 12:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PLX) sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia de la concentración de PLX												
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PLX									
			PLX (1%)		PLX (2.5%)		PLX (5%)		PLX (7.5%)		PLX (10%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI								
1	1	GDS	932	0.680	598	0.428	203	0.167	217	0.220	142	0.146
	2	GDS	822	0.588	585	0.277	200	0.211	211	0.221	142	0.157
	3	GDS	730	0.521	556	0.276	198	0.194	216	0.194	138	0.123
	4	GDS	938	0.683	574	0.307	190	0.211	211	0.224	141	0.190
	5	GDS	847	0.635	563	0.346	193	0.199	216	0.191	141	0.157
2	1	GDS	777	0.663	469	0.331	239	0.268	220	0.215	149	0.125
	2	GDS	507	0.447	512	0.306	238	0.255	217	0.216	151	0.150
	3	GDS	819	0.747	488	0.325	233	0.262	209	0.182	153	0.154
	4	GDS	555	0.499	485	0.269	230	0.250	206	0.219	157	0.137
	5	GDS	659	0.521	482	0.283	224	0.325	204	0.201	156	0.095
3	1	GDS	475	0.270	582	0.271	191	0.183	209	0.185	167	0.193
	2	GDS	539	0.515	578	0.290	188	0.200	200	0.243	162	0.200
	3	GDS	476	0.317	600	0.316	187	0.186	197	0.203	164	0.200
	4	GDS	467	0.347	564	0.295	192	0.184	195	0.219	164	0.199
	5	GDS	485	0.324	556	0.317	187	0.204	192	0.238	165	0.211
		Promedio	668	0.517	546	0.309	206	0.220	208	0.211	153	0.162
		DesvEst	177	0.151	46	0.040	20	0.043	9	0.018	10	0.035
		%CV	27	29	8	13	10	20	4	9	6.7	21
		IC 95%	98.2	0.08	25.4	0.02	11.2	0.02	4.9	0.01	5.7	0.02

**Anexo 13:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PLX) sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido SAic.

Influencia de la concentración de PLX												
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PLX									
			PLX (1%)		PLX (2.5%)		PLX (5%)		PLX (7.5%)		PLX (10%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI								
1	1	SAic	606	0.124	577	0.130	370	0.074	442	0.246	414	0.178
	2	SAic	600	0.142	580	0.215	367	0.159	429	0.185	411	0.168
	3	SAic	593	0.282	588	0.159	359	0.098	430	0.168	401	0.108
	4	SAic	626	0.244	595	0.186	365	0.142	424	0.160	390	0.179
	5	SAic	607	0.160	566	0.231	371	0.105	439	0.262	397	0.152
2	1	SAic	634	0.679	448	0.201	346	0.197	317	0.115	423	0.108
	2	SAic	612	0.192	439	0.202	332	0.094	320	0.019	436	0.116
	3	SAic	695	0.496	445	0.198	342	0.127	304	0.080	414	0.226
	4	SAic	623	0.121	454	0.164	330	0.130	304	0.034	417	0.193
	5	SAic	675	0.269	452	0.140	334	0.192	308	0.045	418	0.120
3	1	SAic	322	0.089	457	0.131	356	0.218	366	0.183	467	0.223
	2	SAic	317	0.152	462	0.057	358	0.139	366	0.155	481	0.224
	3	SAic	323	0.139	445	0.121	341	0.159	362	0.150	480	0.208
	4	SAic	310	0.129	417	0.196	355	0.220	359	0.195	480	0.234
	5	SAic	327	0.131	411	0.160	352	0.193	368	0.162	475	0.250
		Promedio	525	0.223	489	0.166	352	0.150	369	0.144	434	0.179
		DesvEst	152	0.162	69	0.045	14	0.046	52	0.073	33	0.049
		%CV	29	73	14	27	4	31	14	50	8	27
		IC 95%	84.4	0.09	38.2	0.03	7.7	0.03	28.8	0.04	18.5	0.03

**Anexo 14:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PVA) sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia de la concentración de PVA												
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PVA									
			PVA (1%)		PVA (2.5%)		PVA (5%)		PVA (7.5%)		PVA (10%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI								
1	1	GDS	354	0.178	371	0.229	358	0.240	331	0.145	271	0.118
	2	GDS	345	0.196	363	0.221	354	0.165	324	0.141	259	0.123
	3	GDS	331	0.231	359	0.204	349	0.149	329	0.125	254	0.131
	4	GDS	336	0.153	351	0.203	359	0.158	325	0.176	253	0.109
	5	GDS	334	0.173	346	0.222	352	0.210	319	0.269	257	0.110
2	1	GDS	483	0.471	407	0.269	342	0.180	319	0.232	281	0.136
	2	GDS	484	0.476	401	0.283	340	0.189	319	0.152	272	0.136
	3	GDS	473	0.481	395	0.307	350	0.211	312	0.173	272	0.164
	4	GDS	399	0.350	401	0.253	345	0.233	326	0.148	266	0.159
	5	GDS	399	0.385	394	0.269	341	0.211	322	0.168	272	0.150
3	1	GDS	374	0.272	388	0.217	383	0.199	316	0.176	295	0.140
	2	GDS	376	0.278	381	0.231	370	0.231	316	0.102	289	0.104
	3	GDS	368	0.266	378	0.207	365	0.187	322	0.156	290	0.125
	4	GDS	378	0.270	374	0.234	360	0.161	317	0.166	284	0.086
	5	GDS	369	0.281	371	0.241	363	0.202	315	0.158	283	0.150
		Promedio	387	0.297	378	0.239	355	0.195	321	0.166	273	0.129
		DesvEst	53	0.112	19	0.031	12	0.029	5	0.040	14	0.022
		%CV	14	38	5	13	3	15	2	24	5	17
		IC 95%	29.1	0.1	10.5	0.0	6.6	0.0	3.0	0.0	7.5	0.0

**Anexo 15:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PVA) sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido SAic.

Influencia de la concentración de PVA												
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PVA									
			PVA (1%)		PVA (2.5%)		PVA (5%)		PVA (7.5%)		PVA (10%)	
			Tamaño de partícula (nm)	PDI								
1	1	SAic	355	0.090	406	0.174	360	0.099	468	0.035	364	0.074
	2	SAic	330	0.130	406	0.156	352	0.086	454	0.206	346	0.048
	3	SAic	341	0.126	406	0.178	351	0.094	452	0.211	343	0.066
	4	SAic	341	0.055	394	0.208	350	0.115	452	0.185	338	0.018
	5	SAic	337	0.104	403	0.167	352	0.089	444	0.126	343	0.136
2	1	SAic	362	0.224	372	0.127	356	0.058	502	0.200	470	0.206
	2	SAic	357	0.241	369	0.138	356	0.103	508	0.206	453	0.246
	3	SAic	347	0.187	360	0.167	351	0.137	494	0.208	436	0.189
	4	SAic	354	0.136	357	0.140	362	0.138	501	0.184	434	0.227
	5	SAic	347	0.164	360	0.147	350	0.078	496	0.205	433	0.144
3	1	SAic	393	0.181	373	0.093	370	0.190	399	0.053	490	0.187
	2	SAic	383	0.147	362	0.135	369	0.244	396	0.110	494	0.244
	3	SAic	380	0.220	363	0.068	371	0.243	393	0.042	492	0.229
	4	SAic	378	0.135	349	0.129	383	0.194	385	0.086	507	0.212
	5	SAic	362	0.129	351	0.092	392	0.233	379	0.114	499	0.211
		Promedio	358	0.151	375	0.141	362	0.140	448	0.145	430	0.162
		DesvEst	19	0.052	21	0.037	13	0.064	47	0.067	65	0.077
		%CV	5	34	6	26	4	45.7	11	46	15	47
		IC 95%	10.3	0.0	11.9	0.0	7.2	0.0	26.1	0.0	36.1	0.0

**Anexo 16:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PLX) en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS y SAIc.

Influencia de la concentración de PLX													
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PLX					Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PLX				
			PLX (1%) Potencial z (mV)	PLX (2.5%) Potencial z (mV)	PLX (5%) Potencial z (mV)	PLX (7.5%) Potencial z (mV)	PLX (10%) Potencial z (mV)		PLX (1%) Potencial z (mV)	PLX (2.5%) Potencial z (mV)	PLX (5%) Potencial z (mV)	PLX (7.5%) Potencial z (mV)	PLX (10%) Potencial z (mV)
1	1	GDS	-14.1	-8.4	-12.6	-8.4	-5.5	SAIc	-9.0	-12.0	-15.8	-11.7	-11.7
	2	GDS	-14.8	-8.5	-11.8	-8.1	-5.9	SAIc	-9.3	-12.0	-16.4	-11.5	-11.3
	3	GDS	-14.4	-7.8	-12.6	-7.9	-5.2	SAIc	-9.0	-12.0	-16.0	-10.4	-11.4
	4	GDS	-13.3	-8.5	-13.0	-8.5	-5.5	SAIc	-8.4	-11.9	-16.9	-10.4	-10.7
	5	GDS	-14.1	-8.7	-13.2	-8.4	-5.5	SAIc	-8.6	-12.1	-16.9	-10.7	-11.7
2	1	GDS	-13.7	-11.5	-8.6	-7.0	-6.9	SAIc	-15.7	-14.4	-15.5	-13.5	-12.0
	2	GDS	-14.1	-11.4	-9.2	-6.9	-7.9	SAIc	-15.8	-15.2	-15.2	-13.9	-11.6
	3	GDS	-12.8	-11.5	-10.3	-8.0	-7.2	SAIc	-19.3	-15.3	-15.7	-14.8	-11.5
	4	GDS	-13.6	-12.1	-10.3	-7.5	-6.6	SAIc	-17.5	-14.5	-16.0	-14.9	-11.7
	5	GDS	-14.4	-11.3	-8.3	-9.9	-8.0	SAIc	-17.0	-15.1	-16.7	-14.5	-11.5
3	1	GDS	-15.3	-11.6	-11.3	-7.9	-6.2	SAIc	-16.1	-13.5	-16.7	-11.0	-9.8
	2	GDS	-15.8	-12.3	-10.6	-8.6	-5.8	SAIc	-17.3	-13.3	-17.3	-11.7	-9.1
	3	GDS	-16.1	-11.8	-13.5	-8.5	-7.2	SAIc	-17.1	-13.6	-17.9	-11.5	-10.0
	4	GDS	-14.7	-12.6	-14.9	-10.8	-7.5	SAIc	-17.0	-13.4	-18.2	-11.5	-9.5
	5	GDS	-15.4	-11.6	-11.4	-8.1	-6.5	SAIc	-20.9	-11.4	-18.8	-11.4	-10.0
		Promedio	-14.4	-10.6	-11.4	-8.3	-6.5	Promedio	-14.5	-13.3	-16.7	-12.2	-10.9
		DesvEst	0.9	1.7	1.9	1.0	0.9	DesvEst	4.4	1.4	1.0	1.6	1.0
		%CV	6	16	17	12	14	%CV	30	10	6	13	9
		IC 95%	0.5	0.9	1.1	0.5	0.5	IC 95%	2.4	0.8	0.6	0.9	0.5

**Anexo 17:** Datos primarios de la influencia de la concentración del agente estabilizante (PVA) en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS y SAlc.

Influencia de la concentración de PVA															
Número de replica	Número de mediciones	Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PVA					Tipo de lípido (0,25g)	Concentración de PVA						
			PVA (1%)	PVA (2.5%)	PVA (5%)	PVA (7.5%)	PVA (10%)		PVA (1%)	PVA (2.5%)	PVA (5%)	PVA (7.5%)	PVA (10%)		
			Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)				Potencial z (mV)				
1	1	GDS	-4.5	-5.4	-5.3	-3.7	-4.0	SAlc	-6.7	-3.2	-3.5	-2.9	-1.7		
	2	GDS	-5.0	-4.6	-4.8	-4.1	-3.4	SAlc	-6.5	-3.5	-4.0	-3.0	-1.3		
	3	GDS	-5.0	-4.5	-5.5	-3.8	-4.5	SAlc	-6.1	-3.4	-4.4	-2.0	-1.7		
	4	GDS	-5.3	-4.9	-5.1	-4.0	-2.8	SAlc	-6.1	-3.4	-4.4	-2.7	-1.5		
	5	GDS	-5.0	-5.5	-5.4	-6.9	-5.1	SAlc	-6.5	-3.2	-3.4	-3.4	-1.5		
2	1	GDS	-3.8	-5.7	-6.9	-3.7	-4.9	SAlc	-3.6	-3.7	-3.7	-3.0	-2.5		
	2	GDS	-3.9	-5.5	-5.8	-4.6	-3.4	SAlc	-3.4	-3.5	-3.6	-3.2	-2.5		
	3	GDS	-4.0	-5.8	-5.8	-4.5	-4.8	SAlc	-3.4	-3.3	-3.6	-3.0	-2.1		
	4	GDS	-4.1	-5.8	-5.5	-4.8	-3.8	SAlc	-3.7	-3.7	-3.1	-3.1	-2.2		
	5	GDS	-3.7	-6.1	-6.7	-3.8	-5.3	SAlc	-3.3	-3.2	-3.4	-3.3	-2.5		
3	1	GDS	-6.4	-5.2	-7.5	-2.9	-3.0	SAlc	-2.5	-2.7	-3.3	-3.6	-2.2		
	2	GDS	-5.7	-5.6	-6.6	-3.4	-4.6	SAlc	-2.8	-1.6	-3.8	-4.1	-2.0		
	3	GDS	-6.0	-5.1	-5.4	-3.9	-4.1	SAlc	-3.3	-2.0	-4.3	-3.5	-2.4		
	4	GDS	-6.2	-5.1	-4.8	-3.4	-6.9	SAlc	-3.7	-2.7	-3.9	-3.8	-2.7		
	5	GDS	-5.0	-5.2	-4.8	-3.6	-4.7	SAlc	-2.9	-2.0	-4.2	-4.0	-2.8		
Promedio			-4.9	-5.3	-5.7	-4.1	-4.3	Promedio	-4.3	-3.0	-3.8	-3.2	-2.1		
DesvEst			0.9	0.4	0.8	1	1.0	DesvEst	1.6	0.7	0.4	1	0.5		
%CV			18	8	15	22	24	%CV	36	22	11	16	22		
IC 95%			0.5	0.2	0.5	0.5	0.6	IC 95%	0.9	0.4	0.2	0.3	0.3		

### Anexo 18: Datos primarios de la influencia de la relación de fases (O/W) sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia de la velocidad de emulsificación													
Número de replica	Número de mediciones	Velocidad de emulsificación (rpm)											
		3,200		7,200		11,200		15,600		20,000		24,000	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	325	0.291	661	0.265	358	0.240	206	0.091	150	0.114	151	0.218
	2	314	0.271	661	0.227	354	0.165	201	0.126	147	0.132	151	0.197
	3	394	0.164	720	0.048	349	0.149	199	0.119	147	0.148	148	0.238
	4	408	0.271	659	0.208	359	0.158	196	0.105	145	0.140	145	0.170
	5	482	0.277	691	0.247	352	0.210	192	0.089	144	0.136	145	0.184
2	1	1769	0.032	783	0.180	342	0.180	216	0.192	161	0.146	145	0.197
	2	1921	0.582	766	0.146	340	0.189	216	0.137	160	0.149	147	0.181
	3	1881	0.390	762	0.185	350	0.211	213	0.209	154	0.168	151	0.218
	4	1829	0.080	746	0.227	345	0.233	214	0.233	153	0.149	150	0.197
	5	2171	0.055	788	0.145	341	0.211	205	0.190	154	0.140	148	0.238
3	1	551	0.041	890	0.362	383	0.199	216	0.158	144	0.140	145	0.170
	2	396	0.280	843	0.342	370	0.231	215	0.144	142	0.200	151	0.218
	3	584	0.002	899	0.313	365	0.187	214	0.131	140	0.204	150	0.197
	4	539	0.323	862	0.224	360	0.161	211	0.147	141	0.128	148	0.238
	5	590	0.163	893	0.379	360	0.185	210	0.111	140	0.103	151	0.218
	Promedio	944	0.215	775	0.233	355	0.194	208	0.145	148	0.146	149	0.205
	DesvEst	720	0.159	87	0.090	12	0.029	8	0.043	7	0.027	2	0.023
	%CV	76	74	11	39	3	15	4	30	5	19	2	11
	IC 95%	399	0.09	48	0.05	7	0.02	4	0.02	4	0.02	1	0.01

**Anexo 19:** Datos primarios de la influencia de la relación de fases (O/W) en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS.

Influencia de la relación de fases (O/W)		Volumen de solvente orgánico (ml)					
Número de replica	Número de mediciones	5	10	15	20	30	40
		Potencial z (mV)	Potencial z (mV)(nm)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)	Potencial z (mV)
1	1	-2.2	-5.3	-1.9	-1.4	-5.3	-2.5
	2	-2.6	-4.8	-2.3	-1.4	-4.8	-2.3
	3	-2.6	-5.5	-2.0	-1.7	-5.5	-2.5
	4	-2.2	-5.1	-2.0	-1.3	-5.1	-2.3
	5	-2.4	-5.4	-2.2	-1.2	-5.4	-2.9
2	1	-2.5	-6.9	-1.4	-1.6	-1.4	-1.8
	2	-3.5	-5.8	-1.8	-1.3	-1.1	-1.8
	3	-2.4	-5.8	-1.1	-1.9	-1.8	-1.0
	4	-2.5	-5.5	-1.4	-1.7	-2.0	-1.8
	5	-2.1	-6.7	-1.8	-1.3	-1.1	-1.8
3	1	-2.7	-7.5	-3.2	-1.4	-1.4	-2.1
	2	-2.0	-6.6	-3.5	-1.1	-1.9	-1.5
	3	-2.0	-5.4	-3.3	-1.9	-1.9	-1.9
	4	-2.3	-4.8	-3.0	-1.4	-1.4	-3.3
	5	-2.1	-4.8	-3.1	-1.6	-1.6	-2.3
	Promedio	-2.4	-5.7	-2.3	-1.5	-2.8	-2.5
	DesvEst	0.4	0.8	0.8	0.2	1.8	1.4
	%CV	16	15	34	16	65	58
	IC 95%	0.2	0.5	0.4	0.1	1.0	0.8

## Anexo 20: Datos primarios de la influencia de la velocidad de emulsificación sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

		Influencia de la velocidad de emulsificación											
Número de replica	Número de mediciones	Velocidad de emulsificación (rpm)											
		3,200		7,200		11,200		15,600		20,000		24,000	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	325	0.291	661	0.265	358	0.240	206	0.091	150	0.114	151	0.218
	2	314	0.271	661	0.227	354	0.165	201	0.126	147	0.132	151	0.197
	3	394	0.164	720	0.048	349	0.149	199	0.119	147	0.148	148	0.238
	4	408	0.271	659	0.208	359	0.158	196	0.105	145	0.140	145	0.170
	5	482	0.277	691	0.247	352	0.210	192	0.089	144	0.136	145	0.184
2	1	1769	0.032	783	0.180	342	0.180	216	0.192	161	0.146	145	0.197
	2	1921	0.582	766	0.146	340	0.189	216	0.137	160	0.149	147	0.181
	3	1881	0.390	762	0.185	350	0.211	213	0.209	154	0.168	151	0.218
	4	1829	0.080	746	0.227	345	0.233	214	0.233	153	0.149	150	0.197
	5	2171	0.055	788	0.145	341	0.211	205	0.190	154	0.140	148	0.238
3	1	551	0.041	890	0.362	383	0.199	216	0.158	144	0.140	145	0.170
	2	396	0.280	843	0.342	370	0.231	215	0.144	142	0.200	151	0.218
	3	584	0.002	899	0.313	365	0.187	214	0.131	140	0.204	150	0.197
	4	539	0.323	862	0.224	360	0.161	211	0.147	141	0.128	148	0.238
	5	590	0.163	893	0.379	360	0.185	210	0.111	140	0.103	151	0.218
	Promedio	944	0.215	775	0.233	355	0.194	208	0.145	148	0.146	149	0.205
	DesvEst	720	0.159	87	0.090	12	0.029	8	0.043	7	0.027	2	0.023
	%CV	76	74	11	39	3	15	4	30	5	19	2	11
	IC 95%	399	0.09	48	0.05	7	0.02	4	0.02	4	0.02	1	0.01

**Anexo 21:** Datos primarios de la influencia de la velocidad de emulsificación en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS.

		Influencia de la velocidad de emulsificación					
Número de replica	Número de mediciones	Velocidad de emulsificación (rpm)					
		3,200 Potencial z (mV)	7,200 Potencial z (mV)(nm)	11,200 Potencial z (mV)	15,600 Potencial z (mV)	20,000 Potencial z (mV)	24,000 Potencial z (mV)
1	1	-1.9	-1.8	-5.3	-3.0	-1.3	-0.7
	2	-1.8	-1.9	-4.8	-1.4	-1.5	-1.1
	3	-1.8	-1.6	-5.5	-1.8	-1.5	-1.2
	4	-1.9	-2.0	-5.1	-1.9	-1.4	-1.2
	5	-2.1	-2.0	-5.4	-4.6	-5.2	-0.9
2	1	-1.5	-2.6	-6.9	-1.7	-1.6	-1.1
	2	-1.5	-2.8	-5.8	-1.7	-1.0	-1.2
	3	-1.7	-2.8	-5.8	-1.4	-0.9	-0.9
	4	-1.7	-2.9	-5.5	-1.8	-0.3	-1.2
	5	-1.8	-2.7	-6.7	-2.1	-1.1	-0.8
3	1	-2.2	-2.5	-7.5	-0.9	-1.0	-1.8
	2	-2.1	-2.5	-6.6	-0.6	-0.7	-2.3
	3	-2.1	-2.4	-5.4	-0.4	-0.8	-1.6
	4	-2.4	-2.6	-4.8	-1.6	-1.1	-1.6
	5	-2.4	-2.3	-4.8	-1.5	-0.9	-2.0
	Promedio	-1.9	-2.4	-5.7	-1.8	-1.3	-1.3
	DesvEst	0.3	0.4	0.8	1.0	1.1	0.5
	%CV	15	17	15	57	83	36
	IC 95%	0.2	0.2	0.5	0.6	0.6	0.3

## Anexo 22: Datos primarios de la influencia del tiempo de emulsificación sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia del Tiempo de emulsificación (min)													
Número de replica	Número de mediciones	Tiempo de emulsificación (min)											
		2.5		5		7.5		10		12.5		15	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	817	0.196	494	0.189	400	0.186	358	0.240	314	0.135	361	0.381
	2	826	0.180	485	0.164	415	0.090	354	0.165	306	0.130	347	0.404
	3	834	0.216	472	0.196	421	0.204	349	0.149	305	0.181	375	0.483
	4	840	0.245	467	0.173	409	0.170	359	0.158	306	0.152	336	0.386
	5	831	0.243	457	0.185	415	0.190	352	0.210	292	0.159	322	0.360
2	1	792	0.099	603	0.275	415	0.219	342	0.180	406	0.359	330	0.245
	2	742	0.162	588	0.268	407	0.179	340	0.189	423	0.509	313	0.200
	3	761	0.176	594	0.404	415	0.172	350	0.211	395	0.354	304	0.159
	4	751	0.218	572	0.285	403	0.189	345	0.233	371	0.326	296	0.221
	5	780	0.203	564	0.365	408	0.196	341	0.211	394	0.383	308	0.207
3	1	554	0.051	454	0.181	423	0.168	383	0.199	412	0.368	346	0.272
	2	520	0.080	454	0.257	397	0.212	370	0.231	399	0.380	334	0.360
	3	504	0.124	446	0.234	417	0.240	365	0.187	418	0.442	362	0.486
	4	499	0.170	429	0.233	407	0.162	360	0.161	383	0.365	318	0.248
	5	525	0.171	430	0.373	413	0.041	360	0.185	371	0.329	323	0.273
	Promedio	705	0.169	500	0.252	411	0.175	355	0.194	366	0.305	332	0.312
	DesvEst	139	0.058	64	0.077	7	0.050	12	0.029	48	0.121	23	0.103
	%CV	20	34.2	13	30.7	2	28.6	3	14.8	13	39.8	7	33.1
	IC 95%	76.9	0.03	35.5	0.04	4.1	0.03	6.5	0.02	26.4	0.07	12.7	0.06

**Anexo 23:** Datos primarios de la influencia del tiempo de emulsificación en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS.

		Influencia del Tiempo de emulsificación					
Número de replica	Número de mediciones	Tiempo de emulsificación (min)					
		2.5 Potencial z (mV)	5 Potencial z (mV)(nm)	7.5 Potencial z (mV)	10 Potencial z (mV)	12.5 Potencial z (mV)	15 Potencial z (mV)
1	1	-6.4	-4.0	-3.0	-5.3	-2.7	-2.2
	2	-9.1	-3.9	-1.4	-4.8	-3.1	-2.3
	3	-5.9	-3.6	-1.8	-5.5	-2.5	-2.8
	4	-7.0	-3.5	-1.9	-5.1	-3.5	-2.3
	5	-5.3	-3.7	-4.6	-5.4	-2.8	-1.8
2	1	-6.2	-3.2	-1.7	-6.9	-6.4	-3.1
	2	-6.1	-2.8	-1.7	-5.8	-3.7	-3.4
	3	-6.8	-2.8	-1.4	-5.8	-3.0	-3.5
	4	-5.9	-3.0	-1.8	-5.5	-2.7	-3.3
	5	-6.5	-3.1	-2.1	-6.7	-3.0	-4.1
3	1	-2.6	-3.6	-0.9	-7.5	-2.1	-3.7
	2	-4.7	-4.3	-0.6	-6.6	-1.5	-3.9
	3	-2.3	-3.4	-0.4	-5.4	-2.0	-4.8
	4	-3.4	-7.2	-1.6	-4.8	-2.0	-7.2
	5	-6.4	-3.0	-1.5	-4.8	-1.5	-5.6
	Promedio	-5.6	-3.7	-1.8	-5.7	-2.8	-3.6
	DesvEst	1.8	1.1	1.0	0.8	1.2	1.4
	%CV	32	29	57	15	42	39
	IC 95%	1.0	0.6	0.6	0.5	0.7	0.8

**Anexo 24:** Datos primarios de la influencia de la temperatura de la fase de dilución sobre el tamaño y el PDI de las partículas empleando como lípido GDS.

Influencia de la Temperatura de la fase de dilución											
Número de replica	Número de mediciones	Temperatura de la fase de dilución (°C)									
		20		30		40		50		60	
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI
1	1	358	0.240	336	0.181	394	0.304	477	0.316	397	0.322
	2	354	0.165	338	0.153	404	0.269	493	0.290	399	0.348
	3	349	0.149	346	0.216	400	0.258	497	0.308	396	0.314
	4	359	0.158	348	0.128	400	0.292	494	0.322	406	0.268
	5	352	0.210	359	0.061	399	0.287	493	0.279	409	0.303
2	1	342	0.180	349	0.161	452	0.391	453	0.288	376	0.171
	2	340	0.189	357	0.185	476	0.374	464	0.237	384	0.225
	3	350	0.211	359	0.167	456	0.322	464	0.268	382	0.257
	4	345	0.233	354	0.158	458	0.324	439	0.192	383	0.238
	5	341	0.211	373	0.134	467	0.411	463	0.305	385	0.238
3	1	383	0.199	350	0.130	457	0.291	350	0.155	581	0.108
	2	370	0.231	332	0.186	452	0.395	342	0.188	616	0.208
	3	365	0.187	341	0.136	479	0.313	336	0.194	632	0.222
	4	360	0.161	334	0.093	458	0.417	341	0.190	646	0.224
	5	360	0.185	339	0.179	463	0.373	342	0.168	656	0.251
	Promedio	355	0.194	348	0.151	441	0.335	430	0.247	470	0.246
	DesvEst	12	0.029	11	0.039	32	0.054	66	0.060	116	0.061
	%CV	3	15	3	26	7	16	15	24	25	25
	IC 95%	6.5	0.02	6.3	0.02	17.5	0.03	36.6	0.03	64.1	0.03

**Anexo 25:** Datos primarios de la influencia de la temperatura de la fase de dilución en cuanto al potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS.

		Influencia de la Temperatura de la fase de dilución				
Número de replica	Número de mediciones	Temperatura de la fase de dilución (°C)				
		20 Potencial z (mV)	30 Potencial z (mV)(nm)	40 Potencial z (mV)	50 Potencial z (mV)	60 Potencial z (mV)
1	1	-5.3	-3.6	-3.8	-5.0	-5.9
	2	-4.8	-3.4	-5.7	-4.5	-7.0
	3	-5.5	-3.6	-4.1	-5.8	-5.3
	4	-5.1	-4.6	-4.0	-5.4	-6.2
	5	-5.4	-4.3	-3.5	-4.9	-6.1
2	1	-6.9	-3.2	-4.1	-5.4	-6.8
	2	-5.8	-3.1	-3.3	-5.2	-7.6
	3	-5.8	-3.0	-3.2	-7.6	-8.4
	4	-5.5	-2.6	-3.0	-8.4	-4.4
	5	-6.7	-3.2	-3.5	-4.4	-6.4
3	1	-7.5	-1.9	-7.0	-6.4	-3.7
	2	-6.6	-2.0	-7.0	-4.8	-3.9
	3	-5.4	-2.3	-8.2	-4.2	-7.6
	4	-4.8	-1.7	-5.1	-4.4	-8.4
	5	-4.8	-2.0	-5.2	-3.6	-4.5
	Promedio	-5.7	-3.0	-4.7	-5.3	-6.1
	DesvEst	0.8	0.9	1.6	1.3	1.5
	%CV	15	30	34	24	25
	IC 95%	0.5	0.5	0.9	0.7	0.9

**Anexo 26:** Datos primarios de la influencia de la velocidad de agitación durante la etapa de dilución en cuanto al tamaño, el PDI y el potencial zeta de las partículas preparadas a partir de GDS.

Influencia de la velocidad de agitación durante la etapa de dilución (rpm)												
Número de replica	Número de mediciones	Velocidad de agitación durante la etapa de dilución (rpm)						Número de replica	Número de mediciones	Velocidad de emulsificación (rpm)		
		0		750		1,500				0	750	1,500
		Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI	Tamaño de partícula (nm)	PDI			Potencial z (mV)	Potencial z (mV)(nm)	Potencial z (mV)
1	1	356	0.193	358	0.240	331	0.145	1	1	-4.1	-5.3	-2.0
	2	372	0.181	354	0.165	324	0.141		2	-3.3	-4.8	-2.3
	3	366	0.211	349	0.149	318	0.137		3	-1.6	-5.5	-1.7
	4	369	0.189	359	0.158	311	0.133		4	-1.0	-5.1	-1.2
	5	364	0.163	352	0.210	304	0.129		5	-3.4	-5.4	-1.3
2	1	339	0.163	342	0.180	298	0.125	2	1	-3.1	-6.9	-3.3
	2	342	0.152	340	0.189	311	0.133		2	-1.8	-5.8	-3.0
	3	331	0.146	350	0.211	304	0.129		3	-1.7	-5.8	-3.1
	4	346	0.100	345	0.233	341	0.125		4	-2.3	-5.5	-3.5
	5	340	0.140	341	0.211	383	0.121		5	-3.2	-6.7	-4.1
3	1	362	0.113	383	0.199	370	0.117	3	1	-3.5	-7.5	-1.8
	2	349	0.202	370	0.231	365	0.113		2	-2.6	-6.6	-1.1
	3	358	0.136	365	0.187	354	0.109		3	-2.8	-5.4	-2.7
	4	345	0.144	360	0.161	345	0.105		4	-2.4	-4.8	-2.0
	5	352	0.149	360	0.185	336	0.101		5	-1.8	-4.8	-2.3
	Promedio	353	0.159	355	0.194	333	0.124		Promedio	-2.6	-5.7	-2.4
	DesvEst	12	0.032	12	0.029	26	0.013		DesvEst	0.9	0.8	0.9
	%CV	4	20	3	15	8	11		%CV	34	15	39
	IC 95%	6.9	0.02	6.5	0.02	14.6	0.01		IC 95%	0.5	0.5	0.5