

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Efecto de las propiedades estructurales de la partícula sobre la liberación de moléculas encapsuladas en sistemas lipídicos coloidales

Aldemar Gordillo Galeano

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Área Curricular de Farmacia
Bogotá D.C., Colombia
Enero de 2021

Efecto de las propiedades estructurales de la partícula sobre la liberación de moléculas encapsuladas en sistemas lipídicos coloidales

Aldemar Gordillo Galeano

Químico, M.Sc.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Claudia Elizabeth Mora Huertas

Química Farmacéutica., MBA, Ph.D.

Departamento de Farmacia

Universidad Nacional de Colombia

Codirector:

Arturo Ponce Pedraza

Químico., M.Sc., Ph.D.

Department of Physics and Astronomy

The University of Texas at San Antonio

Línea de Investigación:

Farmacotecnia

Grupo de Investigación en Diseño y Calidad de Productos Farmacéuticos, GIDECA

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Área Curricular de Farmacia

Bogotá D.C., Colombia

Enero de 2021

Toute chose ne saurait exister sans son mystère. C'est d'ailleurs le propre de l'esprit que de savoir qu'il y a le mystère. (...) Chaque chose que nous voyons en cache une autre, nous désirons toujours voir ce qui est caché par ce que nous voyons. Il y a un intérêt pour ce qui est caché et que le visible ne nous montre pas. Cet intérêt peut prendre la forme d'un sentiment assez intense, une sorte de combat dirais-je, entre le visible caché et le visible apparent.

No hay cosa que pueda existir sin su misterio. Es, además, lo propio del espíritu saber que hay misterio. (...) Cada cosa que vemos esconde otra, decidimos ver siempre eso que está oculto en lo que vemos. Hay un interés por eso que está oculto y que lo visible no nos muestra. Ese interés puede tomar la forma de un sentimiento tan intenso, una suerte de combate diría yo, entre lo visible oculto y lo visible aparente (traducción libre).

René Magritte

*Les mots et les images,
La Révolution surréalist*

Agradecimientos

Que la gratitud en mi corazón bese todo el universo

Hafiz

Este trabajo fue financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación-Colciencias, Convocatoria 617 para la Formación de Investigadores de Alto Nivel para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, y por la División de Investigación de la Sede Bogotá (DIB) de la Universidad Nacional de Colombia, proyectos 28405, 36019 y 40987. Las fuentes de financiamiento no participaron en el diseño del estudio, la recopilación, el análisis, la interpretación de la información o la redacción de este manuscrito.

Resumen

Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) han atraído la atención durante más de dos décadas como una alternativa para la entrega de fármacos poco solubles en agua. Sin embargo, a pesar de su presumida relevancia frente a las nanoemulsiones (NE), todavía son escasas las investigaciones relacionadas con la organización estructural de estos sistemas. Este trabajo aborda el estudio de las características estructurales de las SLN, NLC y NE mediante el análisis comparativo de la estructura interna, las características de superficie y el comportamiento liberación. Los resultados muestran que las mezclas de trimiristina (MMM) y triglicérido cáprico/caprílico (TCC) conducen a la formación de una estructura bifásica en la que la MMM forma un cristal β rodeado de una fase líquida de MMM y TCC. Durante la cristalización, las moléculas modelo a incorporar (metil y propilparabeno) se concentran en la superficie en donde se distribuyen entre el tensioactivo (Poloxamer® 188) y la fase acuosa, en función de su coeficiente de distribución ($\log D$). La interacción de los segmentos hidrófilos e hidrófobos del tensioactivo con las partículas depende de la proporción de TCC en la matriz lipídica. En las SLN hay un aumento de parches hidrófobos sobre las superficies sólidas mientras que en las NE ocurre interpenetración de los segmentos hidrófobos. El comportamiento de liberación es una consecuencia de la solubilidad de las moléculas en la fase lipídica y de la estructura de dicha fase. Por consiguiente, la liberación *in vitro* procede en el orden NE-MMM>SLN>NLC>NE-TCC.

Palabras clave: Portadores lipídicos coloidales, nanoemulsiones, organización estructural, comportamiento de liberación, localización del fármaco, nanopartículas lipídicas.

Abstract

Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) have attracted attention during the last two decades as a delivery method of drugs that are poorly soluble in water. However, despite its presumed relevance against nanoemulsions (NE), there is still little research related to the structural organization of these systems. This work aims the study of the structural characteristics of SLN, NLC, and NE by a comparative analysis of the internal structure, surface characteristics, and drug release. The results show that the mixtures of trimyristin (MMM) and capric/caprylic triglyceride (CCT) lead to the formation of a biphasic structure in which the MMM forms a β -crystal surrounded by a liquid phase of MMM and CCT. During crystallization, the model molecules to be entrapped (methyl and propylparaben) are concentrated to the surface where there are distributed between the surfactant (Poloxamer® 188) and the aqueous phase based on their distribution coefficients ($\log D$). The interaction of the hydrophilic and hydrophobic segments of the surfactant with the particles depends on the proportion of CCT in the lipid matrix. In SLN there is an increase in hydrophobic patches on the solid surfaces, while interpenetration of hydrophobic segments occurs in NE. The release behavior is a consequence of the solubility of the molecules in the lipid phase and the lipid phase

structure. Accordingly, *in vitro* release proceeds in the order NE-MMM>SLN>NLC>NE-CCT.

Keywords: Colloid lipid carriers, nanoemulsions, structural organization, drug release behavior, drug incorporation, lipid nanoparticles.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras	XVI
Lista de tablas	XXI
Lista de símbolos y abreviaturas	XXVI
Introducción.....	1
1. Marco conceptual y generalidades.....	5
1.1 Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC)	5
1.2 Materiales de partida frecuentemente utilizados para la obtención de SLN y NLC	6
1.2.1 Lípidos	7
1.2.2 Agentes estabilizantes empleados en la preparación de las dispersiones de SLN y NLC.....	9
1.2.3 Otros componentes	10
1.3 Moléculas activas incorporadas en SLN y NLC.....	11
1.4 Métodos de preparación	12
1.5 Características generales de las partículas lipídicas.....	17
1.5.1 Tamaño, morfología y comportamiento electrocinético de las nanopartículas lipídicas	18
1.6 Estructura de las partículas lipídicas.....	23
1.6.1 Comportamiento cristalino de los lípidos de la matriz	23
1.6.2 Modelos de estructura propuestos para las partículas lipídicas	26
1.6.3 Localización del activo en SLN y NLC.....	30
1.6.4 Las SLN y los NLC como sistemas de liberación de moléculas activas	

2.	Objetivos	47
2.1	Objetivo general	47
2.1.1	Objetivos específicos.....	47
3.	Métodos y materiales.....	48
3.1.1	Características de la estructura interna de las nanopartículas	52
3.1.2	Características de superficie.....	55
3.1.3	Comportamiento de las nanopartículas lipídicas como sistemas de entrega de moléculas.....	61
4.	Resultados y discusión.....	67
4.1	Preparación de sistemas coloidales basados en lípidos	67
4.2	Caracterización de la matriz de los sistemas lipídicos.....	76
4.2.1	Estudios por calorimetría diferencial de barrido	77
4.2.2	Densidad y estabilidad de las dispersiones frente a fuerzas centrífugas 104	
4.2.3	Difracción de rayos X.....	107
4.2.4	Espectroscopía Raman	118
4.2.5	Incorporación de moléculas modelo en nanopartículas lipídicas ..	124
4.3	Características de superficie	149
4.3.1	Potencial zeta.....	149
4.3.2	Tensioactivo en superficie	156
4.3.3	Agregación inducida por electrolitos	162
4.3.4	Hidrofobicidad de superficie.....	166
4.4	Comportamiento de las nanopartículas como sistemas de entrega de moléculas modelo.....	171
4.4.1	Capacidad de carga y eficiencia de incorporación.....	173
4.4.2	Determinación del comportamiento de liberación.....	180
5.	Observaciones finales y conclusiones	195
6.	Recomendaciones.....	203
A.	Datos primarios para la estimación del tamaño medio de partícula	209
B.	Datos primarios para la caracterización de la matriz lipídica	213
B.1	Análisis térmico diferencial	213
B.2	Difracción de rayos X.....	223
B.3	Espectrometría Raman.....	225
C.	Datos primarios para la caracterización de las propiedades de superficie.....	227

C.1	Estimación del potencial zeta	227
C.2	Determinación del P188 en la superficie de las nanopartículas	230
C.3	Agregación inducida por electrolitos	234
C.4	Hidrofobicidad de superficie.....	236
D.	Datos primarios para la determinación del comportamiento de liberación.....	245
D.1	Ensayo de compatibilidad entre el P188 y los parabenos	245
D.2	Estandarización de la metodología analítica para la cuantificación de los parabenos	247
	Referencias	255

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1–1. Distribución porcentual aproximada de los lípidos más empleados para la preparación de nanopartículas lipídicas.	8
Figura 1–2. Distribución porcentual aproximada de los estabilizantes más empleados para la preparación de nanopartículas lipídicas.	10
Figura 1–3. Clasificación general de los métodos de preparación de SLN y NLC. ...	13
Figura 1–4. Distribución porcentual de los métodos más conocidos para la preparación de nanopartículas lipídicas.	14
Figura 1–5. Distribución de tamaño, índice de polidispersidad (PI) y potencial ζ	19
Figura 1–6. Técnicas utilizadas para la caracterización de la morfología de las nanopartículas.	21
Figura 1–7. Representación esquemática de los modelos propuestos para SLN.	27
Figura 1–8. Representación esquemática de los modelos propuestos para NLC.	29
Figura 1–9. Representación de los modelos de incorporación de activos en SLN.	32
Figura 1–10. Comportamiento de liberación esperado de acuerdo con la estructura de las partículas.	43
Figura 3–1. Esquema general usado en la preparación de las dispersiones de lípidos.	50
Figura 3–2. Esquema general para separación de las fases en dispersiones de lípidos mediante ultrafiltración.	57
Figura 3–3. Cuantificación por espectrofotometría en el visible del P188.	58
Figura 3–4. Esquema general para la cuantificación del contenido total de parabenos en las dispersiones de los sistemas lipídicos.	63
Figura 3–5. Esquema general para la determinación del comportamiento de liberación de parabenos a partir de los sistemas lipídicos investigados.	64

Figura 4-1. Comportamiento del tamaño partícula y del PI para las dispersiones enfriadas a 20 °C.....	68
Figura 4-2. Comportamiento del tamaño partícula y del PI para las dispersiones enfriadas a 4 °C.	69
Figura 4-3. Representación esquemática de la adsorción del P188 sobre las nanopartículas.....	72
Figura 4-4. Aspecto de los sistemas lipídicos investigados durante el almacenamiento.	73
Figura 4-5. Representación esquemática del índice de polidispersidad en tamaño y forma.....	75
Figura 4-6. Estructura química de la trimiristina.	78
Figura 4-7. Transiciones térmicas de fusión y solidificación para las mezclas de MMM/TCC.	79
Figura 4-8. Apariencia física de las mezclas de MMM/TCC.	80
Figura 4-9. Diagrama de fases para la mezcla binaria MMM/TCC.	81
Figura 4-10. Entalpía de fusión para las mezclas binarias de MMM/TCC.	87
Figura 4-11. Entalpía de cristalización para las mezclas binarias de MMM/TCC. .	90
Figura 4-12. Transiciones térmicas de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C.....	93
Figura 4-13. Zona metaestable de sobresaturación para los sistemas lipídicos enfriados a 4 °C.....	97
Figura 4-14. Entalpía de fusión (A) y de cristalización (B) para las dispersiones enfriadas a 4 °C.	98
Figura 4-15. Transiciones térmicas de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 20 °C.....	99
Figura 4-16. Comportamiento térmico para la dispersión preparada con 50 % de TCC.	100
Figura 4-17. Índice de cristalinidad de las dispersiones calculado con diferentes ecuaciones.	101
Figura 4-18. Comportamiento de las dispersiones de lípidos bajo centrifugación. ..	104
Figura 4-19. Densidad de las dispersiones respecto al estado físico y a la proporción de TCC.	105

Figura 4–20. Representación esquemática de los polimorfos comunes de los triglicéridos.....	108
Figura 4–21. WAXS capilar de las dispersiones acuosas de los sistemas coloidales enfriados a 4 °C.....	110
Figura 4–22. Patrones de difracción de las dispersiones enfriadas a 4 °C y posteriormente liofilizadas.....	116
Figura 4–23. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm para las nanopartículas lipídicas.....	120
Figura 4–24. Estructura general de los parabenos.....	125
Figura 4–25. Tamaño medio de partícula y polidispersidad de los sistemas lipídicos con MP.....	127
Figura 4–26. Tamaño medio de partícula y polidispersidad de los sistemas lipídicos con PP.....	128
Figura 4–27. Transiciones térmicas de los sistemas lipídicos enfriados a 4 °C cargados con MP y PP.....	131
Figura 4–28. Zona metaestable de sobresaturación para las dispersiones de lípidos incorporadas con (A) MP y (B) PP.....	132
Figura 4–29. Entalpía de fusión (A y C) y de cristalización (B y D) para las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C conteniendo MP (arriba) y PP (abajo).	133
Figura 4–30. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas enfriadas a 4 °C conteniendo (A) MP y (B) PP.....	134
Figura 4–31. Patrones de difracción de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C cargadas con (A) MP y (B) PP y posteriormente liofilizadas.....	137
Figura 4–32. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C cargadas con metilparabeno.....	139
Figura 4–33. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C cargadas con propilparabeno.....	143
Figura 4–34. Representación esquemática de las posibles estructuras de las SLN y los NLC.....	148
Figura 4–35. Comportamiento del potencial ζ durante el almacenamiento de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C durante 24 h.....	151

Figura 4–36. Comportamiento del potencial ζ durante el almacenamiento de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 20 °C durante 24 h.....	152
Figura 4–37. Comportamiento del potencial ζ de las dispersiones de lípidos con parabenos.	155
Figura 4–38. Estructura general del Poloxamer 188.....	156
Figura 4–39. Cantidad de P188 adsorbido y en solución en dispersiones lipídicas. .	157
Figura 4–40. Complejo entre el P188 y el tiocianato de cobalto.	158
Figura 4–41. Arreglo estructural del P188 sobre superficies líquidas y sólidas.....	160
Figura 4–42. Agregación inducida por electrolitos en dispersiones lipídicas enfriadas a 4 °C.....	164
Figura 4–43. Comportamiento de la constante de unión del rosa de Bengala (A) y del azul de Nilo (B) sobre la superficie de las partículas lipídicas obtenidas a 4 °C en función de la proporción de TCC.	168
Figura 4–44. Reacción del FeCl ₃ con los parabenos.....	174
Figura 4–45. Identificación colorimétrica del MP y del PP en la fase acuosa.	175
Figura 4–46. Capacidad de carga y eficiencia de incorporación de MP y PP en las dispersiones de nanopartículas lipídicas.....	176
Figura 4–47. MP y PP en P188 2.5 % p/v.....	179
Figura 4–48. Perfiles de liberación de las dispersiones lipídicas en agua.....	181
Figura 4–49. Solubilidad estimada del MP y PP en TCC.....	182
Figura 4–50. Perfiles de liberación de las dispersiones lipídicas sustrayendo la cantidad libre de parabenos.	184
Figura 4–51. Análisis térmico diferencial a alta presión (HP–DSC) de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C durante 24 h conteniendo parabenos. .	187
Figura 4–52. Perfiles de liberación de las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo parabenos enfriadas a 4 °C durante 24 h usando como medio de liberación P188 al 2.5 % p/v.....	193
Figura 5–1. Organización estructural de las SLN y los NLC.....	199
Figura 6–1. Micrografías electrónicas de transmisión con unidad de barrido (STEM) de las SLN.....	204
Figura 6–2. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) en condiciones de baja dosis.	205
Figura C–1. Efecto de la concentración de TCC sobre el pH de las dispersiones....	228

Figura C-2. Comportamiento del pH en dispersiones de lípidos cargadas con parabenos.	230
Figura C-3. Curva de calibración para la cuantificación del P188.	231
Figura C-4. Segunda derivada de la absorbancia con respecto al punto medio de la concentración de Na_2SO_4	236
Figura C-5. Curva de calibración para la cuantificación del rosa de Bengala.	236
Figura C-6. Adsorción del rosa de Bengala en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas lipídicas.	237
Figura C-7. Gráfico de Scatchard para el rosa de Bengala.	239
Figura C-8. Curva de calibración para la cuantificación del azul de Nilo.	240
Figura C-9. Adsorción del azul de Nilo en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas lipídicas.	241
Figura C-10. Gráfico de Scatchard para el azul de Nilo.	242
Figura D-1. Compatibilidad de los parabenos con P188 y T20.	246
Figura D-2. Relación entre la concentración acuosa de parabenos y la absorbancia a 255.2 nm.	249

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1-1. Lípidos frecuentemente utilizados en la preparación de SLN y NLC.....	7
Tabla 1-2. Tensioactivos y co-surfactantes comúnmente empleados en la preparación de SLN y NLC.	9
Tabla 1-3. Sustancias activas incorporadas en las nanopartículas lipídicas.	11
Tabla 1-4. Ubicación preferente de moléculas de acuerdo con su polaridad en SLN.	36
Tabla 3-1. Composición de las dispersiones de nanopartículas lipídicas.....	51
Tabla 3-2. Determinación de la estabilidad estérica inducida por electrolitos.	59
Tabla 3-3. Determinación de la hidrofobicidad de superficie.....	60
Tabla 3-4. Determinación de la compatibilidad entre los parabenos y el P188.....	65
Tabla 4-1. Valores reportados para el patrón de difracción de espaciamiento corto de la trimiristina.	109
Tabla 4-2. Espaciamiento corto de la trimiristina en las dispersiones lipídicas en estado líquido.	111
Tabla 4-3. Proporción I_{1062}/I_{1130} para los modos de estiramiento C-C de las dispersiones de lípidos.....	121
Tabla 4-4. Proporción $\eta = I_{2846}/I_{2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de lípidos.....	122
Tabla 4-5. Proporción $\eta = I_{2846}/I_{2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de lípidos incorporadas con metilparabeno.	140
Tabla 4-6. Proporción I_{1609}/I_{1590} para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C incorporadas con metilparabeno. .	142
Tabla 4-7. Proporción $\eta = I_{2846}/I_{2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C incorporadas con propilparabeno.	144

Tabla 4-8. Proporción I_{1608}/I_{1591} para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C incorporadas con propilparabeno.	146
Tabla 4-9. Cantidad remanente y capacidad de incorporación de parabenos en las dispersiones lipídicas.	190
Tabla A-1. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al primer mes de almacenamiento.....	209
Tabla A-2. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 6 de almacenamiento.	210
Tabla A-3. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 12 de almacenamiento.	210
Tabla A-4. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 24 de almacenamiento.	211
Tabla A-5. Estimación de la viscosidad dinámica de la solución de P188 al 2.5 % p/v.	212
Tabla B-1. Onset y peak de la trimiristina y las mezclas de trimiristina/TCC.	213
Tabla B-2. Proporción relativa de trimiristina en fase sólida para las mezclas binarias MMM/TCCC.	214
Tabla B-3. Entalpías de fusión para las mezclas binarias MMM+TCC.	214
Tabla B-4. Entalpía de cristalización para las mezclas binarias MMM+TCC.	215
Tabla B-5. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento.	215
Tabla B-6. Proporción relativa de trimiristina en fase sólida para las dispersiones lipídicas.	216
Tabla B-7. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas.....	217
Tabla B-8. Entalpías de cristalización para las dispersiones lipídicas.....	217
Tabla B-9. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas.	218
Tabla B-10. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas con MP y PP.....	218
Tabla B-11. Proporción relativa de la trimiristina en fase sólida para las dispersiones lipídicas con MP y PP.	219
Tabla B-12. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas con MP y PP.....	219
Tabla B-13. Entalpías de cristalización para las dispersiones lipídicas con MP y PP.	220
Tabla B-14. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas con MP y PP.....	221

Tabla B-15. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas durante los ciclos de calentamiento.....	221
Tabla B-16. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas con MP y PP obtenidas mediante HP-DSC.	222
Tabla B-17. Densidad de las dispersiones lipídicas.....	222
Tabla B-18. Señales de difracción para el P188.....	223
Tabla B-19. Señales de difracción para la trimiristina.	223
Tabla B-20. Señales de difracción para el metilparabeno.	224
Tabla B-21. Señales de difracción para el propilparabeno.....	224
Tabla B-22. Bandas Raman características con sus asignaciones.....	225
Tabla C-1. Valores de pH de las dispersiones de lípidos durante el almacenamiento.	227
Tabla C-2. Valores de pH de las dispersiones de lípidos cargadas con parabenos...229	
Tabla C-3. Curva de calibración para la cuantificación del P188.	230
Tabla C-4. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 4 °C.	231
Tabla C-5. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 20 °C.....	232
Tabla C-6. Datos primarios cuantificación P188 total en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 4 °C y a 20 °C.	232
Tabla C-7. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 4 °C.	233
Tabla C-8. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 20 °C.....	233
Tabla C-9. Datos primarios cuantificación P188 total en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 4°C y a 20 °C.....	234
Tabla C-10. Absorbancia a 600 nm de las dispersiones de partículas lipídicas con la adición de Na ₂ SO ₄	234
Tabla C-11. Desviación estándar para las absorbancias de las dispersiones de partículas lipídicas en el ensayo de floculación.	235
Tabla C-12. Segunda derivada de la absorbancia con respecto al punto medio de la concentración de Na ₂ SO ₄	235
Tabla C-13. Rosa de Bengala libre en el medio de dispersión.	238

Tabla C-14. Datos de absorción del rosa de Bengala por mg de nanopartículas. ...	238
Tabla C-15. Constantes de unión del rosa de Bengala calculadas a partir del gráfico de Scatchard.....	239
Tabla C-16. Azul de Nilo libre en el medio de dispersión.....	241
Tabla C-17. Datos de absorción del NB por mg de nanopartículas.....	242
Tabla C-18. Constantes de unión del NB calculadas a partir del gráfico de Scatchard.	242
Tabla D-1. Linealidad y rango de la metodología analítica por UV.....	248
Tabla D-2. Análisis de varianza (ANOVA) para los parabenos.....	249
Tabla D-3. Análisis de la linealidad de la metodología UV para la cuantificación de los parabenos.....	250
Tabla D-4. Parámetros estadísticos para la linealidad de la metodología UV para la cuantificación de los parabenos.....	250
Tabla D-5. Evaluación de la precisión de la metodología analítica UV para la cuantificación de los parabenos.....	251
Tabla D-6. Capacidad de incorporación (DL) del metil y el propilparabeno en las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C y a 20 °C.....	252
Tabla D-7. Eficiencia de encapsulación (EE) del metil y el propilparabeno en las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C y a 20 °C.....	252
Tabla D-8. Cantidad liberada de metilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C.....	253
Tabla D-9. Cantidad liberada de propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C.....	253
Tabla D-10. Cantidad liberada de metil y propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 20 °C.....	253
Tabla D-11. Cantidad liberada de metil y propilparabeno a partir de las nanopartículas enfriadas a 4 °C obtenida después de sustraer la cantidad libre en la dispersión.....	254
Tabla D-12. Cantidad liberada de metil y propilparabeno a partir de las nanopartículas enfriadas a 20 °C obtenida después de sustraer la cantidad libre en la dispersión.....	254

Tabla D-13. Cantidad liberada de metil y propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C usando como medio de liberación P188 al 2.5 % p/v.	254
--	-----

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término
A_c	Área bajo la curva
C	Componente de cristalización en condiciones insaturadas
C^*	Componente de cristalización en condiciones saturadas
CI	Índice de cristalinidad
C_n	Número de átomos de carbono
C_s	Concentración de saturación
d	Diámetro de gota
J	Velocidad de nucleación (número de núcleos formados por segundo por unidad de volumen)
k_B	Constante de Boltzmann
K_b	Constante de unión
N_{Av}	Número de Avogadro
N_{imp}	Número de impurezas catalíticas por gota
r	Radio de partícula
R	Constante de los gases
T_a	Temperatura de fusión del componente a
T_m	Temperatura de fusión
U	Energía de interacción
U	Energía de interacción
v_{as}	Estiramiento asimétrico
v_s	Estiramiento simétrico
W	Agua (water)
ΔG_c	Energía libre de núcleo crítico
ΔG_v	Energía libre de volumen
ΔH_c	Entalpía de cristalización
ΔH_{fus}	Entalpía de fusión

Símbolo	Término
ΔS_m	Entropía de fusión
O	Oil (aceite)

Símbolos con letras griegas

Símbolo	Término
χ_a	Fracción molar del compuesto a
$\Delta\mu$	Diferencia en el potencial químico
γ	Tensión interfacial
ϵ_r	Constante dieléctrica
η	Viscosidad
μ	Potencial químico
ν	Viscosidad cinemática
σ	Energía libre de superficie
ω	Diferencia de energía de las interacciones entre un par de moléculas diferentes
δ_h	Espesor de la capa adsorbida (espesor hidrodinámico)
ρ	Densidad
ζ	Potencial zeta
κ	Constante de velocidad de nucleación
φ	Fracción del volumen

Abreviaturas

Abreviatura	Término
$\%C_{NP}$	Cantidad remanente
Abs	Absorbancia
AFM	Microscopía de fuerza atómica (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
$ASTM$	Sociedad americana para pruebas y materiales (<i>American Society for Testing and Materials</i>)
CP	Punto de nube (<i>Cloud Point</i>)
DLS	Dispersión de luz dinámica (<i>Dynamic Light Scattering</i>)
DPD	Dinámica de partículas disipativas (<i>Dissipative Particle Dynamics</i>)

Abreviatura	Término
<i>DSC</i>	Calorimetría diferencial de barrido (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
<i>EDL</i>	Doble capa eléctrica (<i>Electrical Double Layer</i>)
<i>EPR</i>	Resonancia paramagnética electrónica (<i>Electron Paramagnetic Resonance</i>)
<i>ESEM</i>	Microscopía electrónica de barrido ambiental (<i>Environmental Scanning Electron Microscopy</i>)
<i>ESR</i>	Resonancia de espín electrónico (<i>Electron Spin Resonance</i>)
<i>FESEM</i>	Microscopía electrónica de barrido de emisión de campo (<i>Field Emission Scanning Electron Microscopy</i>)
<i>FFF</i>	Flujo de campo fraccionado (<i>Field-Flow Fractionation</i>)
<i>GRAS</i>	Generalmente reconocido como seguro (<i>Generally Recognized as Safe</i>)
<i>HLB</i>	Balance Hidrófilo–Lipófilo (<i>Hydrophilic–Lipophilic Balance</i>)
<i>HP–DSC</i>	Calorimetría diferencial de barrido a alta presión
<i>ISO</i>	Organización Internacional de Estandarización (<i>International Organization for Standardization</i>)
<i>LD</i>	Difractometría láser (<i>Laser Diffraction</i>)
$\log D$	Logaritmo del coeficiente de partición
<i>MMM</i>	Trimiristina
<i>MP</i>	Metilparabeno
<i>NB</i>	Azul de Nilo (<i>Nile Blue</i>)
<i>NE</i>	Nanoemulsión
<i>NLC</i>	Transportadores Lipídicos Nanoestructurados (<i>Nanostructured Lipid Carriers</i>)
<i>NMR</i>	Resonancia magnética nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
<i>NP</i>	Nanopartículas
<i>Onset</i>	Comienzo de la transición por DSC
<i>P188</i>	Poloxamer® 188
<i>P20</i>	Polisorbato 20 (<i>Tween® 20</i>)
<i>Peak</i>	Velocidad máxima de la transición por DSC
<i>PEO</i>	Polioxietileno
<i>PI</i>	Índice de polidispersidad (<i>Polydispersity Index</i>)
<i>PP</i>	Propilparabeno
<i>PPO</i>	Polipropileno
<i>PS</i>	Espectroscopía paraeléctrica (<i>Parelectric Spectroscopy</i>)

Abreviatura	Término
<i>RB</i>	Rosa de Bengala (<i>Rose Bengal</i>)
<i>rcf</i>	Fuerza centrífuga relativa (<i>Relative Centrifugal Force</i>)
<i>RES</i>	Sistema retículo endotelial (<i>Reticuloendothelial System</i>)
<i>SANS</i>	Dispersión de neutrones de ángulo pequeño (<i>Small Angle Neutron Scattering</i>)
<i>SEDDS</i>	Sistemas de liberación de fármacos autoemulsionables (<i>Self-Emulsifying Drug Delivery Systems</i>)
<i>SEM</i>	Microscopía electrónica de barrido (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
<i>SLN</i>	Nanopartículas Sólidas Lipídicas (<i>Solid Lipid Nanoparticles</i>)
<i>TAGs</i>	Triglicéridos (<i>Triacylglycerol</i>)
<i>TCC</i>	Triglicérido caprílico/cáprico
<i>TEM</i>	Microscopía electrónica de transmisión (<i>Transmission Electron Microscopy</i>)
<i>UV-Vis</i>	Ultravioleta–Visible
V_{NP}	Volumen del medio de liberación
<i>WAXS</i>	XRD de ángulo amplio (<i>Wide-Angle X-Ray Scattering</i>)
<i>XRD</i>	Difracción de rayos X (<i>X-Ray Diffraction</i>)
<i>Z-Ave</i>	Tamaño medio de partícula

Introducción

Las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) han atraído la atención de científicos e ingenieros de desarrollo de productos farmacéuticos y cosméticos durante décadas, dado que se considera que ofrecen algunas de las ventajas de las emulsiones, los liposomas y las nanopartículas poliméricas, a la vez que superan problemas asociados a estos tipos de nanotransportadores tales como baja capacidad de carga, inestabilidad o uso en su preparación de sustancias tóxicas, los que han limitado su desarrollo a escala industrial (Müller et al., 2000). En particular, frente a las emulsiones O/W tradicionales (Zhong y Zhang, 2019), las que no son adecuadas para la liberación sostenida de fármacos debido a que la baja viscosidad de la fase líquida dispersa combinada con una elevada área superficial, sobre todo en las dispersiones coloidales, provoca la rápida difusión del activo fuera de las gotas (Magenheim et al., 1993).

Entre las ventajas de las SLN se destacan la capacidad de incorporación del ingrediente activo, la factibilidad de encapsular sustancias tanto hidrófilas como hidrófobas con diversas propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, la posibilidad de preparar partículas “stealth” capaces de evitar el sistema retículo endotelial (RES) y la posibilidad de modular el comportamiento de liberación de los activos incorporados (Mehnert y Mäder, 2012; zur Mühlen et al., 1998).

Sin embargo, la solidificación y posterior cristalización del lípido sólido de la matriz en las SLN conduce a la expulsión del activo, lo que constituye un serio problema de inestabilidad (Jores et al., 2004; Westesen et al., 1997) que pone en entredicho la capacidad de incorporación de las moléculas activas (Pardeike et al., 2009; Weber et al., 2014), y eventualmente, su comportamiento de liberación. Dicho problema de inestabilidad dio origen al desarrollo de los NLC preparados a partir de mezclas binarias de lípidos, en los que parte del lípido sólido se reemplaza por un lípido líquido

o una mezcla de lípidos líquidos (Jenning et al., 2000b), garantizando el estado sólido de la partícula a temperatura ambiente y corporal.

Las aparentes ventajas de los NLC sobre las SLN incluyen una mayor capacidad de incorporación del principio activo. Se considera que el activo se puede alojar en las imperfecciones cristalinas creadas en la partícula debido a la presencia del líquido en la matriz lipídica, lo que evita su expulsión temprana (Joshi y Müller, 2009). Además, se considera que los NLC ofrecen una mayor estabilidad debido a que no permiten la recristalización de los lípidos sólidos. De ese modo, el tamaño de partícula permanece prácticamente invariable durante el almacenamiento (Müller et al., 2007; Pardeike et al., 2009) y se mantiene la capacidad de incorporación del activo y el control sobre su liberación.

No obstante, aunque se han desarrollado cientos de trabajos de investigación relacionados con SLN y NLC como potenciales sistemas para la entrega de activos poco solubles en agua y cuyos resultados son prometedores, todavía son escasas las investigaciones que dan cuenta acerca de la organización estructural de estos sistemas, lo que se considera de fundamental importancia para entender su desempeño *in vivo* y para diseñar partículas que exhiban comportamientos específicos (Boreham et al., 2017; Pink et al., 2019; Radaic et al., 2016; Saeidpour et al., 2017; Shah et al., 2016).

En ese sentido, una evaluación realista de su desempeño comparado con los diferentes tipos de sistemas transportadores basados en lípidos, incluyendo las nanoemulsiones, sigue siendo difícil. A partir de los datos disponibles hasta el momento, estos sistemas no parecen ser muy diferentes de las emulsiones respecto al comportamiento de liberación del activo. Desafortunadamente, hay muy pocos estudios comparativos *in vitro* e *in vivo* que faciliten el determinar con precisión las ventajas específicas de cada tipo de sistema nanotransportador. Además, el conocimiento acerca de la interacción de los fármacos incorporados en las SLN y los NLC es aún limitado, especialmente en lo relacionado con su localización dentro de las partículas individuales, dado que las interacciones pueden ser bastante específicas para una combinación determinada de fármaco/nanotransportador (Bunjjes, 2010).

La estructura de las SLN y los NLC no solo influye en el comportamiento de liberación del fármaco, sino que también determina algunos de sus procesos biológicos tales como

la biodistribución y la captación celular. Sin embargo, aspectos como por ejemplo, la localización de las moléculas activas en la nanopartícula ya sea en el núcleo, en la capa externa o dispersas de manera homogénea, sigue sin estar del todo clara (Blaschke et al., 2007; Pan et al., 2016; Shah et al., 2016), dificultando la formulación de sistemas basados en lípidos que garanticen la entrega de los activos de forma eficiente y reproducible.

Como un aporte en este sentido, el presente estudio investiga la relación entre la estructura de las partículas lipídicas y el comportamiento de liberación de moléculas que han sido incorporadas en ellas. En el contexto de la presente investigación, se entiende como partículas lipídicas, a aquellas formadas por un núcleo lipídico rodeado de una capa externa de un agente estabilizante, donde el núcleo lipídico puede ser sólido, líquido o una mezcla de ambos (estructuras bifásicas). Cuando las partículas se encuentran dispersas en medio acuoso constituyen un sistema lipídico. En la primera parte, se aborda la caracterización de la estructura interna de las nanopartículas mediante calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X y espectrometría Raman. Posteriormente, se aborda el estudio de la capa externa de las nanopartículas mediante la estimación de la carga de superficie a través del potencial ζ , la cantidad de agente estabilizante sobre las nanopartículas, la hidrofobicidad y su comportamiento de agregación inducido por electrolitos. Finalmente, se estudia el comportamiento de liberación del metilparabeno y del propilparabeno para, a través del análisis combinado de los resultados, lograr información acerca de la estructura de la partícula, incluyendo la localización preferente del fármaco y su influencia sobre la liberación de las moléculas bajo estudio.

1. Marco conceptual y generalidades

A principios de la década de 1990 los grupos de investigación del Dr. Müller (Berlín, Alemania), la Dra. Gasco (Turín, Italia) y el Dr. Westesen (Braunschweig, Alemania) reportaron sus trabajos de investigación sobre el desarrollo de sistemas de encapsulación que permitieran reducir el uso de solventes orgánicos, los problemas de citotoxicidad y la dificultad para el escalamiento que se habían identificado para los sistemas basados en polímeros. También, intentaban solucionar las dificultades con la liberación, la inestabilidad, la reproducibilidad y el bajo índice de acumulación observado en los liposomas y en las emulsiones tradicionales. Como resultado, fueron ellos los pioneros en el diseño de SLN como un sistema transportador alternativo a las emulsiones, los liposomas y las nanopartículas poliméricas (Pardeike et al., 2009).

1.1 Nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) y transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

Las SLN se definen como partículas sólidas a base de lípidos en las que se incorpora el ingrediente activo, lo que las diferencia de las nanoemulsiones o de las micelas donde los ingredientes activos están disueltos en un medio fluido. En términos generales, las dispersiones acuosas de SLN contienen entre el 0.1 % y el 30 % p/p de lípidos sólidos, y son estabilizadas por un tensioactivo en concentraciones que varían entre el 0.5 % y el 5 % p/p (Joshi y Müller, 2009; Pardeike et al., 2009), en donde la matriz lipídica es biocompatible y biodegradable y se mantiene sólida a temperatura ambiente y corporal.

En los NLC parte del lípido sólido se reemplaza por un lípido o una mezcla de lípidos líquidos, manteniendo la matriz sólida a temperatura ambiente y corporal. Las ventajas de los NLC sobre las SLN incluyen una mayor capacidad de incorporación del principio activo debido al supuesto que una buena cantidad de este se puede alojar

en las innumerables imperfecciones de la partícula producidas por la presencia del lípido líquido. Igualmente, se supone que estos sistemas ofrecen mayor estabilidad debido a que no permiten la recristalización de los lípidos sólidos y, por consiguiente, el tamaño de las partículas permanece prácticamente invariable durante el almacenamiento (Müller et al., 2007; Pardeike et al., 2009).

El empleo de excipientes de origen natural totalmente biodegradables y biocompatibles y la fácil producción a escala industrial hace de las SLN y los NLC, sistemas de liberación muy versátiles (Gasco, 2007). En efecto, han demostrado gran potencial en el campo de las formulaciones parenterales (Bunjes, 2010; Joshi y Müller, 2009; Kim et al., 2010; Lee et al., 2007). Asimismo, cuando son empleados para la administración peroral de fármacos poco solubles en agua resultan ventajosos debido a que durante su digestión pueden formar micelas de monoglicéridos mezcladas con sales biliares que aún pueden contener el activo. Su eventual absorción a través del sistema linfático puede evitar el efecto de primer paso (Yuan et al., 2007). De otro lado, la administración dérmica es otra de las aplicaciones que más ha llamado la atención dado que este tipo de transportadores mejora la penetración, tiene efecto oclusivo y reduce los efectos adversos (Müller et al., 2007; Pardeike et al., 2009). Igualmente, las SLN y los NLC son adecuados para aplicaciones pulmonares debido a su baja toxicidad y a que por su pequeño tamaño pueden alcanzar eficientemente los sacos alveolares (Pilcer y Amighi, 2010; Weber et al., 2014). La administración por las vías nasal, ocular, cerebral también ha sido investigada (Attama et al., 2008; Gastaldi et al., 2014; Yasir et al., 2014).

1.2 Materiales de partida frecuentemente utilizados para la obtención de SLN y NLC

Los materiales para la preparación de SLN y NLC incluyen un lípido sólido, un lípido líquido (si se trata de NLC), un agente tensioactivo y agua, además de las moléculas activas a incorporar. En general, se busca que los materiales de partida utilizados sean Generally Recognized as Safe - GRAS (Pardeike et al., 2009).

1.2.1 Lípidos

En la Tabla 1-1 se presentan varios lípidos empleados en la preparación de SLN y NLC.

Tabla 1-1. Lípidos frecuentemente utilizados en la preparación de SLN y NLC.

Lípidos	Referencias
Triglicéridos	
Tricaprina (Dynasan® 110)	(Domb, 1995; Lim y Kim, 2002)
Trilaurina (Dynasan® 112)	(Akanda et al., 2015; Bunjes et al., 1996; Heiati et al., 1998; Schwarz y Mehnert, 1997)
Trimiristina (Dynasan® 114)	(Bunjes et al., 1996; Lee et al., 2007; Olbrich et al., 2002a; Rao et al., 2014; Venkateswarlu y Manjunath, 2004; Xu et al., 2009)
Tripalmitina (Dynasan® 116)	(Kuo y Chung, 2011; Olbrich et al., 2002a; Venkateswarlu y Manjunath, 2004)
Tristearina (Dynasan® 118)	(Akanda et al., 2015; Bunjes et al., 1996; Salminen et al., 2014; Venkateswarlu y Manjunath, 2004)
Ácidos Grasos	
Ácido esteárico	(Akanda et al., 2015; Salminen et al., 2016; Severino et al., 2011a; Yasir et al., 2014)
Ácido oleico	(Lombardi Borgia et al., 2005; Pardeike et al., 2011; Tan y Billa, 2014; Tiwari y Pathak, 2011)
Ácido palmítico	(Battaglia et al., 2010; Kumar et al., 2013; Paliwal et al., 2011; Yang et al., 2014; Yasir et al., 2014)
Ácido behénico	(Battaglia et al., 2010; Cavalli et al., 1997; Chirio et al., 2011)
Monoglicéridos	
Monostearato de glicerilo (Imwitor® 900, Geleol®)	(Das et al., 2012; Kumar et al., 2013; Trotta et al., 2003; Yasir et al., 2014)
Behenato de glicerilo (Compritol® 888 ATO)	(Andrade et al., 2014; Das et al., 2012; Kuo y Chung, 2011; Quintanar-Guerrero et al., 2005; Vandita et al., 2012; Vitorino et al., 2011; Yasir et al., 2014; Zambrano-Zaragoza et al., 2013)
Palmitoestearato de glicerilo (Precirol® ATO 5)	(Das et al., 2012; Quintanar-Guerrero et al., 2005; Soares et al., 2013; Torrecilla et al., 2015; Vitorino et al., 2011; Yasir et al., 2014)
Mezclas	
Witepsol® W35 (mezcla de 65–80 % de triglicéridos, 10–35 % de diglicéridos y 1–5 % de monoglicéridos)	(Westesen et al., 1993)
Witepsol® H35 (mezcla de triglicéridos con proporciones de max. 15 % de diglicéridos y max. 1% de monoglicéridos)	(Schubert, 2003; Westesen et al., 1997)
Triglicéridos cáprico/cáprilico (Miglyol® 812)	(García-Fuentes et al., 2005; Khalil et al., 2013; Kovačević et al., 2011)
Alcoholes grasos	
Alcohol estearílico	(Sanna et al., 2010; Siddiqui et al., 2012)
Alcohol cetílico	(Sanna et al., 2010; Xue y Wong, 2011)
Alcohol láurico	(Sanna et al., 2010)
Ceras	
Palmitato de cetilo	(Farboud et al., 2011; Kovačević et al., 2014)
Cera de abejas	(Kheradmandnia et al., 2010; Zhang y Smith, 2011)
Cera carnauba	(Kheradmandnia et al., 2010; Lacerda et al., 2011)

Se considera que los lípidos son el material estructural mayoritario de las nanopartículas lipídicas y por lo tanto, constituyen el componente principal de la matriz y determinan en buena parte, las propiedades observadas en estos sistemas coloidales (Martins et al., 2012; Vivek et al., 2007; Wasutrasawat et al., 2013). Usualmente se utilizan ácidos grasos libres, alcoholes grasos, ésteres de glicerol y ceras. También se incluyen fosfolípidos, glicolípidos y esfingolípidos. Además, algunos de estos lípidos tienen propiedades tensioactivas lo que favorece la formación de las partículas.

Aunque la oferta de lípidos disponibles para la preparación de nanopartículas lipídicas es amplia, la distribución porcentual aproximada que se presenta en la Figura 1–1 muestra que el ácido esteárico, el behenato de glicerilo, la tripalmitina, el cetil palmitato, el glicerol monoestearato y la tristearina en conjunto, ocupan cerca del 70 % de los lípidos sólidos más empleados. En cuanto a los lípidos líquidos, el ácido oleico y los triglicéridos de cadena media son los más comunes. La estearina de canola y el miristil miristato también han sido utilizados, aunque en menor proporción.

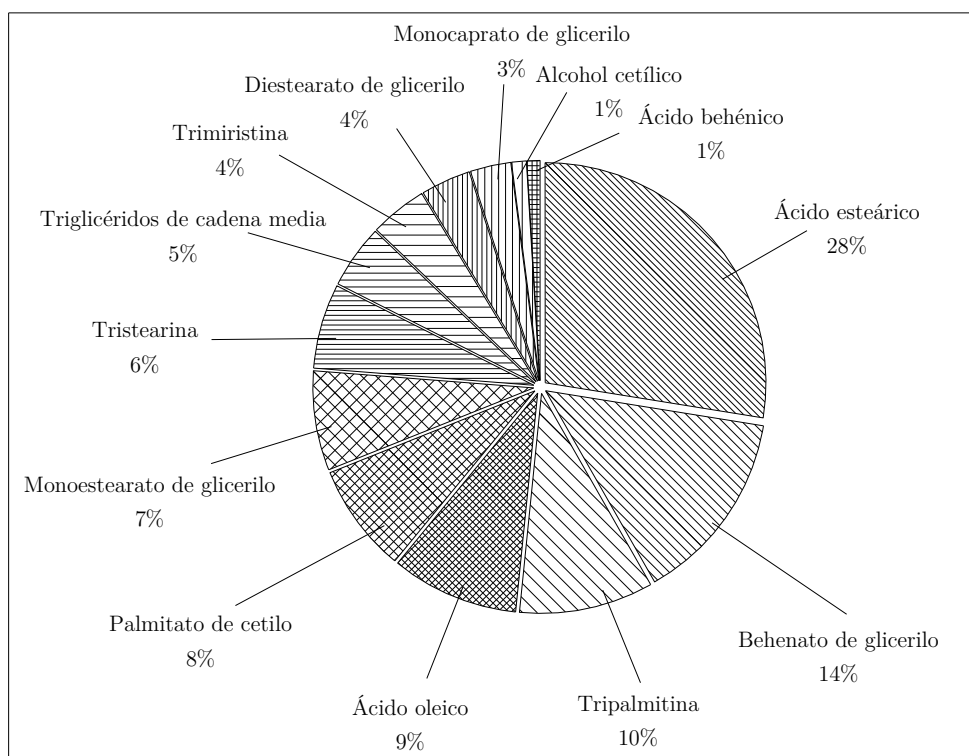


Figura 1–1. Distribución porcentual aproximada de los lípidos más empleados para la preparación de nanopartículas lipídicas.

1.2.2 Agentes estabilizantes empleados en la preparación de las dispersiones de SLN y NLC

En la preparación de SLN y NLC son utilizados agentes estabilizantes, principalmente agentes tensioactivos (Tabla 1-2), los que son capaces de reducir la energía interfacial entre la fase lipídica y la fase acuosa empleadas para la preparación de la partícula, gracias a su tendencia a acumularse en la interfase de unión formando una capa alrededor de las partículas (Kumar y Randhawa, 2013; Leonardi et al., 2014). Así, dicha capa, a la vez que garantiza la formación de la partícula, favorece la estabilidad física de la dispersión durante el almacenamiento.

Tabla 1-2. Tensioactivos y co-surfactantes comúnmente empleados en la preparación de SLN y NLC.

Tensioactivo	Referencias
No iónicos	
Polioxietilen (20) sorbitán monolaurato (Polisorbato 20, Tween® 20)	(Charoenputtakun et al., 2015; Martins et al., 2012)
Polioxietilen (20) sorbitán monoestearato (Polisorbato 60, Tween® 60)	(Howard et al., 2011; Siddiqui et al., 2012)
Polioxietilen (80) sorbitán monooleato (Polisorbato 80, Tween® 80)	(Martins et al., 2012; Nafee et al., 2014; Severino et al., 2011a; Weyenberg et al., 2007)
Poloxamer® 188	(Almeida et al., 1997; Olbrich et al., 2002a; Schöler et al., 2001)
Poloxamer® 407	(Quintanar-Guerrero et al., 2005; Zambrano-Zaragoza et al., 2013)
Poloxamer® 182	(Almeida et al., 1997)
Polímero de formaldehído p-terc-octilfenol etoxilado (Tyloxapol)	(Bunjes et al., 1996; Souto et al., 2005; Westesen y Bunjes, 1995)
Aniónicos	
Lauril sulfato de sodio	(Clares et al., 2014; Tan et al., 2010; Tiwari y Pathak, 2011)
Colato de sodio	(Almeida y Souto, 2007; Tan et al., 2010; Tan y Billa, 2014)
Glicolato de sodio	(Bunjes et al., 2007; Olbrich et al., 2002a; Schoenitz et al., 2013)
Catiónicos	
1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propane (DOTAP)	(Xue y Wong, 2011)
Bromuro de cetrimonio	(Siddiqui et al., 2014)
Anfóteros	
Lecitina de soya (Lipoid® S75, Lipoid® S 100)	(Kheradmandnia et al., 2010; Schöler et al., 2001; Shi et al., 2012; Trotta et al., 2003; Vandita et al., 2012; Varshosaz et al., 2010)
Lecitina de huevo (Lipoid® E)	
Fosfatidil colina (Epikuron® 170, Epikuron® 200)	(Mukherjee et al., 2009)
Co-surfactantes	
Alcohol polivinílico (PVA)	(Rosenblatt y Bunjes, 2009)
Butanol	(Kalaycioglu y Aydogan, 2016; Mojahedian et al., 2013)
Propilenglicol	(Fadda et al., 2013; Khurana et al., 2013)
Polietilenglicol	(D. Liu et al., 2011; Luo et al., 2015)

Algunos investigadores han reportado que el tensioactivo tiene influencia en la estructura cristalina de las partículas obtenidas y determina, entre otros, su comportamiento electrocinético (Helgason et al., 2009b; Kovačević et al., 2011; Martins et al., 2012; Salminen et al., 2014; Solans et al., 2005; Solans y Solé, 2012). Dentro de los agentes tensioactivos empleados para estabilizar las nanopartículas lipídicas, el Poloxamer® 188 (P188), el Tween® 20 (T20) y el Tyloxapol son los estabilizantes de carácter no iónico más ampliamente utilizados, mientras que la lecitina (de soya o de huevo) parece ser el agente estabilizante de carácter anfótero de primera elección en la mayoría de los estudios (Figura 1–2). Además, el alcohol polivinílico (PVA) es frecuentemente seleccionado como un estabilizante alternativo (Hu et al., 2004; Quintanar-Guerrero et al., 2005; Rosenblatt y Bunjes, 2009).

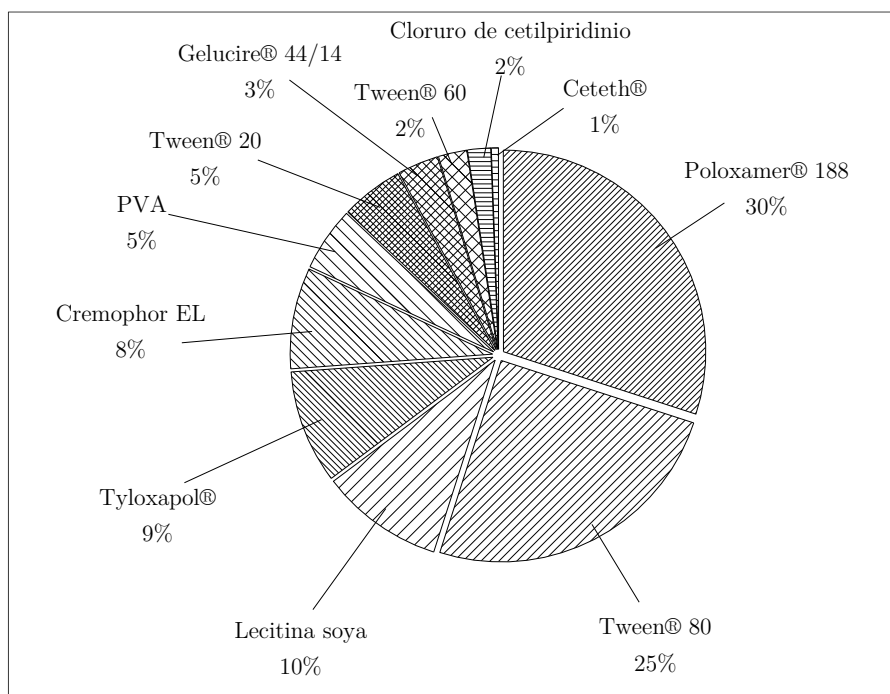


Figura 1–2. Distribución porcentual aproximada de los estabilizantes más empleados para la preparación de nanopartículas lipídicas.

1.2.3 Otros componentes

Aparte de los componentes lipídicos y los agentes estabilizantes usados para preparar SLN y NLC, otros aditivos tales como la glucosa, la fructosa y el sorbitol se emplean como crioprotectores en formulaciones liofilizadas (Soares et al., 2013; Varshosaz

et al., 2012) y el quitosan se ha utilizado como material de recubrimiento (Luo et al., 2015). Igualmente, se reporta el empleo de parabenos (Vaghasiya et al., 2013) o tiomersal (Bunjes et al., 2007; Kupetz y Bunjes, 2014) como agentes antimicrobianos de las dispersiones de partículas o incluso, se han probado algunos agentes preservantes de uso comercial formulados a partir de pentilenglicol, caprililglicol, fenoxietanol, alcohol bencílico, tocoferol y sorbato de potasio, entre otros (Obeidat et al., 2010).

1.3 Moléculas activas incorporadas en SLN y NLC

Como se observa en la Tabla 1-3, la gama de moléculas activas incorporadas en los sistemas lipídicos es tan amplia y variada como las posibles vías de administración. Puesto que la mayoría de los fármacos presentan baja solubilidad en agua y poseen características lipofílicas, una gran cantidad de ellos son candidatos para ser incorporados en nanopartículas lipídicas.

A la fecha, se ha reportado la incorporación de moléculas de diversa actividad farmacológica incluyendo anestésicos, analgésicos y antipiréticos, ansiolíticos sedativos, antipsicóticos, antibióticos, antiparasitarios, retrovirales, agentes anticancerígenos y antihipertensivos, entre otros, además de ácidos nucleicos y péptidos.

Tabla 1-3. Sustancias activas incorporadas en las nanopartículas lipídicas.

Sistema	Categoría	Sustancia activa	Referencia
SLN	Anestésico	Tetracaína	(zur Mühlen et al., 1998)
SLN	Anestésico	Etomidato	(zur Mühlen et al., 1998)
SLN	Anestésico	Prednisolona	(zur Mühlen et al., 1998)
SLN	Analgésico-antipirético	Ibuprofeno	(Casadei et al., 2006; Chantaburaran et al., 2017)
SLN	Analgésico-antipirético	Diclofenaco de sodio	(D. Liu et al., 2011)
SLN	Sedativo ansiolítico	Diazepam	(Abdelbary y Fahmy, 2009; Rosenblatt y Bunjes, 2009; Sznitowska et al., 2001; Westesen et al., 1997)
SLN	Sedativo ansiolítico	Oxazepam	(Westesen et al., 1997)
SLN	Inhibidor de acetil colinesterasa	Rivastigmina	(Shah et al., 2015)
SLN	Suplemento dietario, tratamiento de la insuficiencia cardíaca	Ubidecarenona (Q10)	(Bunjes et al., 2001; Farboud et al., 2011; Rosenblatt y Bunjes, 2009; Siekmann y Westesen, 1994; Westesen et al., 1997; Wissing et al., 2004)
SLN	Cardiovascular	Verapamilo	(Baek y Cho, 2015a)
SLN	Metabolismo de los carbohidratos	Insulina	(Liu et al., 2008; Soares et al., 2013)
SLN, NLC	Antihiperlipidémico	Simvastatina	(Tiwari y Pathak, 2011)
SLN, NLC	Suplemento dietario	β -caroteno	(Helgason et al., 2009a; Nik et al., 2012; Qian et al., 2013; Salminen et al., 2016; Yi et al., 2014; L. Zhang et al., 2013)

Tabla 1-3 (Continuación). Sustancias activas incorporadas en las nanopartículas lipídicas.

Sistema	Categoría	Sustancia activa	Referencia
SLN, NLC	Nutracéutico, anticolesterémico	Hesperetina	(Fathi et al., 2013)
NLC	Nutracéutico, agente anticancerígeno	Genisteína	(Aditya et al., 2013)
NLC	Nutracéutico, agente anticancerígeno	Curcumina	(Aditya et al., 2013; Vandita et al., 2012)
SLN	Immunosupresor	Rapamicina	(Mazuryk et al., 2016)
SLN	Immunosupresor	Inmunoglobulina G1	(Büyükköroğlu et al., 2016b)
SLN	Immunosupresor	Ciclosporina	(Müller et al., 2008; Urbán-Morlán et al., 2010)
SLN, NLC	Antineoplásico	Doxorubicina	(Miao et al., 2013; Miglietta et al., 2000; Oliveira et al., 2016; Siddiqui et al., 2012; Wang et al., 2015)
SLN, NLC	Antineoplásico	Paclitaxel	(Baek et al., 2016, 2012; Baek y Cho, 2015a; Büyükköroğlu et al., 2016a, 2016b; Chirio et al., 2014; Dong et al., 2009; Fang et al., 2015; Kim et al., 2015; Lee et al., 2007; Li et al., 2011; Miao et al., 2015, 2013; Miglietta et al., 2000; Olerile et al., 2017; Tosta et al., 2014; Videira et al., 2012, 2013; Wang et al., 2015; Xu y Lee, 2015; Yang et al., 2013; Yu et al., 2012; Yuan et al., 2008)
SLN, NLC	Antineoplásico	Docetaxel	(Baek y Cho, 2015b; Fang et al., 2015; Mosallaei et al., 2013)
SLN	Antipsicótico	Clozapina	(Venkateswarlu y Manjunath, 2004)
SLN	Antipsicótico	Olanzapina	(Vivek et al., 2007)
SLN	Psicotrópico	Haloperidol	(Yasir et al., 2014; Yasir y Sara, 2013)
SLN	Filtro UV	Octilmetoxicinamato	(Montenegro et al., 2011)
SLN	Filtro UV	Butilmetoxidibenzoilmetano	(Montenegro et al., 2011)
SLN	Antihelmíntico	Praziquantel	(De Souza et al., 2012)
SLN, NLC	Antifúngico	Itraconazol	(Kim et al., 2010; Kumar et al., 2014; Pardeike et al., 2011)
SLN	Antifúngico	Clorhidrato de terbinafina	(Vaghasiya et al., 2013)
SLN, NLC	Antifúngico	Clotrimazol	(Souto et al., 2004)
SLN	Antibiótico	Levofloxacina	(Islan et al., 2016)
SLN	Antituberculoso	Rifampicina	(Fazly Bazzaz et al., 2016)
SLN	Antiretroviral	Lopinavir	(Negi et al., 2014)
SLN	Antiretroviral	Estavudina	(Shegokar et al., 2011)
NLC	Agente anticancerígeno	Ácido ursólico	(Nahak et al., 2016)
SLN	Nutracéutico	Resveratrol	(Jose et al., 2014; Pandita et al., 2014)
SLN, NLC	Fotoquimioterapéutico	Psoraleno	(Fang et al., 2008)
SLN	Otros fármacos	Plásmido pEGFP-	(Vighi et al., 2007)
SLN	Otros fármacos	Puntos cuánticos (CdTe/CdS/ZnS)	(Olerile et al., 2017)
SLN	Tratamiento del acné	Adapaleno	(Jain et al., 2014)
SLN, NLC	Otros fármacos	siRNA	(Lobovkina et al., 2011; Torrecilla et al., 2015; Xue y Wong, 2011)
SLN	Otros fármacos	DNA	(Carrillo et al., 2013)
SLN	Immunosupresor	Ciclosporina A	(Müller et al., 2008; Urbán-Morlán et al., 2010)

1.4 Métodos de preparación

Los métodos de preparación de SLN y NLC pueden clasificarse en tres grupos. Métodos basados en alta energía, métodos basados en baja energía y métodos basados en solventes orgánicos (Figura 1–3). Los métodos basados en alta energía son aquellos que, por lo general, requieren el uso de equipos capaces de generar elevadas fuerzas de corte, distorsiones de presión o cualquier otro mecanismo para lograr la reducción del

tamaño de partícula. Dentro de los más comunes se encuentran la homogeneización a alta presión y el ultrasonido.

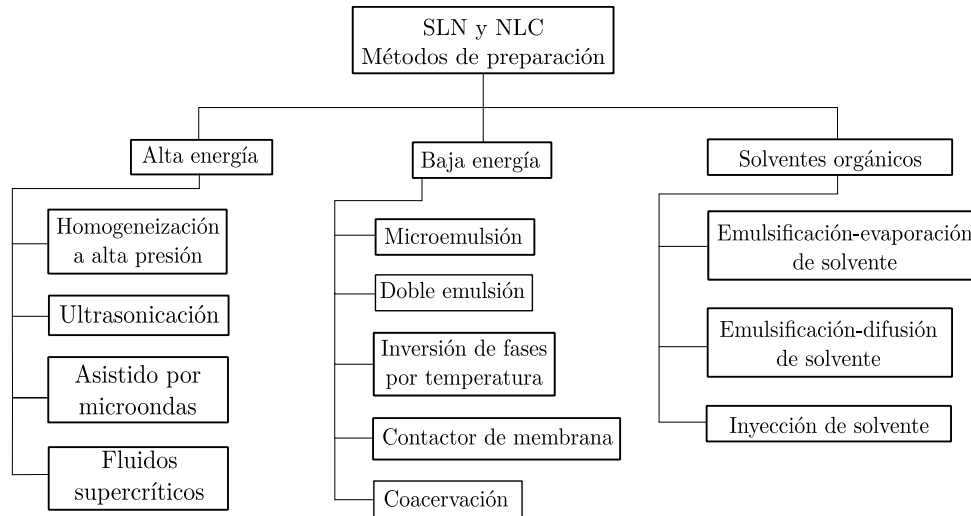


Figura 1-3. Clasificación general de los métodos de preparación de SLN y NLC.

Como se muestra en la Figura 1-4, la homogeneización a alta presión es quizás el método más conocido y el que se ha empleado en cerca del 50 % de las investigaciones reportadas. Puede llevarse a cabo en frío para activos termolábiles o en caliente para activos más estables, siendo este último el caso más común.

Para la preparación de las partículas por el método de homogeneización a alta presión, los lípidos sólidos de la matriz son mantenidos a una temperatura por encima de su punto de fusión, en donde posteriormente y de requerirse, se adicionan el activo y el lípido líquido. Si el método se lleva a cabo en caliente, la mezcla fundida de la matriz conteniendo el activo se adiciona sobre una solución acuosa del tensioactivo a la misma temperatura. Posteriormente, con la ayuda de un mezclador de alto cizallamiento se obtiene una microemulsión que luego es homogeneizada a alta presión (400 – 800 bar) durante varios ciclos, obteniéndose partículas con tamaños medios entre 50 nm y 400 nm (Kumar y Randhawa, 2013; Shegokar et al., 2011; Shidhaye et al., 2008; Silva et al., 2011).

Por otro lado, si el proceso de homogeneización a alta presión se lleva a cabo en frío, la mezcla de la matriz fundida se deja enfriar de modo que pueda ser pulverizada en partículas de 50 nm a 100 μ m, por ejemplo, mediante un molino de bolas. Este polvo

posteriormente se dispersa en una solución acuosa del tensioactivo para obtener una pre-suspensión que luego debe ser homogeneizada a alta presión como en el caso anterior, para lo que normalmente se requieren más ciclos y presiones mayores que en la homogeneización en caliente produciendo tamaños medios de partícula e índices de polidispersidad (PI) usualmente mayores (Friedrich y Müller-Goymann, 2003; Noack et al., 2012; Shidhaye et al., 2008)

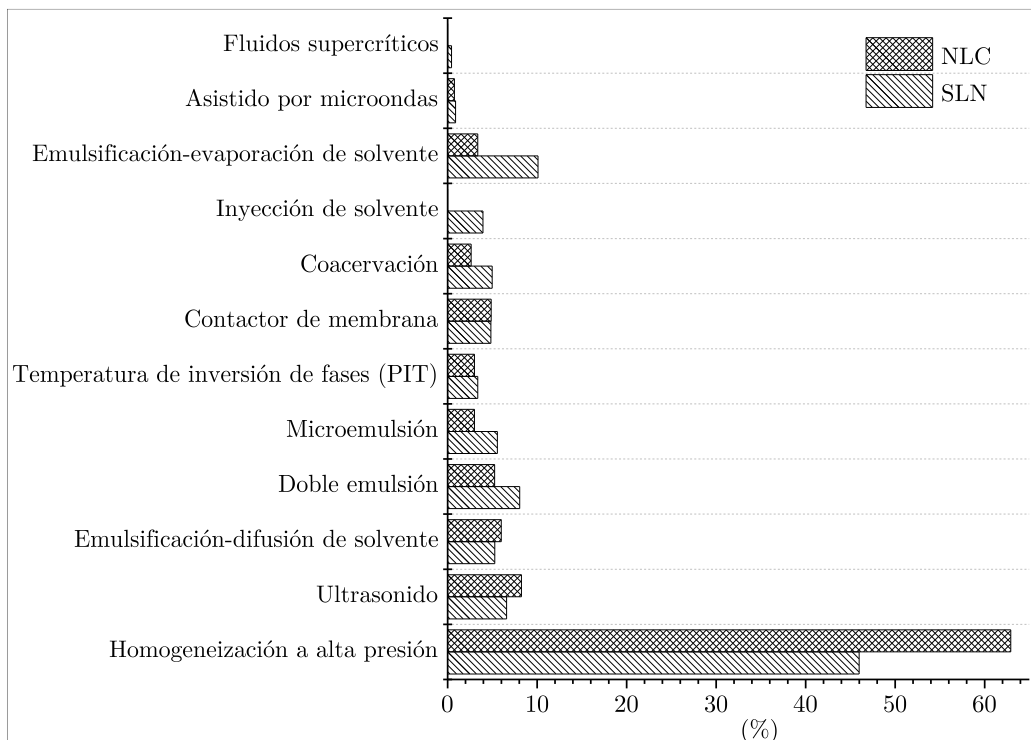


Figura 1-4. Distribución porcentual de los métodos más conocidos para la preparación de nanopartículas lipídicas.

Para la preparación de nanopartículas lipídicas mediante ultrasonido, la mezcla fundida de los lípidos de la matriz, conteniendo el activo, se dispersa inicialmente en una solución acuosa del agente tensioactivo a la misma temperatura de la mezcla lipídica para obtener una microemulsión, entonces se aplica ultrasonido con un sonótrodo en contacto directo con la dispersión (Silva et al., 2011). La reducción del tamaño de gota en la emulsión se debe predominantemente al proceso de cavitación acústica (Leong et al., 2009). El principal inconveniente de esta técnica es el riesgo de contaminación por metales.

Otros métodos que se pueden considerar de alta energía son los que emplean microondas o fluidos supercríticos. No obstante, como puede verse en la Figura 1–4, estos son poco extendidos.

Los métodos de baja energía son aquellos que no consumen cantidades significativas de energía para lograr la reducción en el tamaño de partícula y algunos incluso, proceden espontáneamente. Técnicas basadas en microemulsiones, formación de doble emulsión, inversión de fases inducida por temperatura, contactor de membrana y coacervación, son algunas de las más estudiadas.

La formación de SLN a partir de microemulsiones fue introducida en la década del 90 y es uno de los métodos más difundidos. Se fundamenta en la formación espontánea de la nanoemulsión debido a la elevada proporción tensioactivo respecto a los lípidos. Inicialmente, la matriz de lípidos fundida conteniendo el activo se mezcla con una solución acuosa del tensioactivo a la misma temperatura, bajo moderada agitación, hasta que se forma una microemulsión. La microemulsión caliente es posteriormente diluida en un exceso de agua fría lo que causa la fragmentación de las microgotas generando una nanoemulsión, que al alcanzar la temperatura ambiente, forma SLN o NLC (Gasco, 1993). Además de la elevada concentración de agentes tensioactivos requerida, la desventaja de esta metodología es que se obtienen dispersiones de partículas muy diluidas (entre 1:25 hasta 1:100 con respecto a la emulsión caliente) por lo que se requiere un proceso adicional para concentrarlas.

En el método de doble emulsión, una solución acuosa del activo se emulsiona en la mezcla fundida de lípidos para formar una primera emulsión W/O que posteriormente es emulsionada en una solución acuosa de un tensioactivo hidrófilo para formar una doble emulsión W/O/W. Las SLN se obtienen dispersando la doble emulsión W/O/W caliente en agua fría. Esta técnica se emplea para la producción de SLN conteniendo péptidos y activos hidrófilos (Li et al., 2010).

Por su parte, la técnica de inversión de fases inducida por temperatura consiste en producir, mediante ciclos de calentamiento y enfriamiento, la inversión sucesiva de fases desde una emulsión O/W a una emulsión W/O hasta conseguir finalmente una emulsión O/W, donde en cada inversión se produce una disminución en el tamaño de

la gota permitiendo obtener así las nanopartículas con un último paso de dilución en agua fría (Izquierdo et al., 2002).

En la preparación de nanopartículas lipídicas por el método de contactor de membrana, la mezcla fundida de lípidos conteniendo el activo es presurizada para pasar a través de una membrana hidrófoba porosa (típicamente de 0.05 μm de diámetro de poro) hacia la fase acuosa que contiene el agente tensioactivo. Al pasar por la membrana, el lípido forma gotas que posteriormente solidifican en forma de SLN o NLC, una vez la fase acuosa se enfría a temperatura ambiente (Charcosset et al., 2005). La principal ventaja de este método es que puede ser optimizado para la producción continua de las nanopartículas.

El método de coacervación se basa en la precipitación de ácidos grasos libres a partir de sus micelas en presencia de tensioactivos (Battaglia et al., 2010).

Los métodos basados en solventes pueden ser considerados de baja energía o de alta energía, según corresponda. Sin embargo, se los agrupa en una clase diferente debido a que la adición de solventes orgánicos al sistema es el fundamento mecanístico para la reducción del tamaño de partícula. Los más comunes son la emulsificación-evaporación de solvente, la emulsificación-difusión de solvente y la inyección de solvente.

Para la preparación de nanopartículas lipídicas mediante el método de emulsificación-evaporación de solvente, la mezcla de lípidos se disuelve primero en un solvente orgánico inmiscible con agua y en esta solución, se adiciona el componente activo permitiendo su completa disolución. Después, esta fase orgánica se emulsiona sobre una solución acuosa del tensioactivo utilizando agitación mecánica o ultrasonido. Finalmente, la evaporación del solvente genera la precipitación de las nanopartículas en la fase acuosa (Varshosaz et al., 2010). Este método es uno de los más empleados en la preparación de SLN junto con la homogeneización a altas presiones.

El método de emulsificación-difusión de solvente se fundamenta en la emulsificación en una solución acuosa de tensioactivo, de un solvente orgánico parcialmente miscible con agua en el que se han disuelto los lípidos y las moléculas activas. Esto requiere la previa saturación mutua entre ambos, el solvente orgánico y la fase acuosa, y el empleo

de elevadas fuerzas de corte. La emulsión obtenida se diluye en un medio acuoso causando la migración del solvente orgánico, desde la fase dispersa hacia la fase dispersante (Moinard-Chécot et al., 2008; Mora-Huertas et al., 2011). Como resultado, la solubilidad de los lípidos disminuye hasta que precipitan (Quintanar-Guerrero et al., 2005; Trotta et al., 2003). El solvente orgánico es eliminado por ultrafiltración o por destilación y una vez removido, se obtiene la dispersión de nanopartículas con tamaños alrededor de 200 nm y con índices de polidispersidad reducidos (Kumar et al., 2013; Urbán-Morlán et al., 2010).

En el método de inyección de solvente se emplea un solvente orgánico completamente miscible con agua en el que se disuelven la mezcla de lípidos y el activo. Dicha solución orgánica es inyectada bajo agitación en la solución acuosa de surfactante. Esto causa una rápida migración del solvente orgánico hacia el agua provocando la precipitación instantánea de los lípidos (Schubert, 2003).

El método de emulsificación-difusión de solvente y el uso de ultrasonido parecen ser más empleados para la preparación de NLC que la metodología de emulsificación- evaporación de solvente. Además, las ligeras diferencias relacionadas con los métodos de preparación de SLN y NLC se corresponden con la mayor proporción de investigaciones relacionadas con las SLN, lo que naturalmente da lugar a encontrar mayor número de investigaciones en las que se prueban métodos alternativos a la homogeneización a altas presiones tales como el uso de fluidos supercríticos o el método de inyección de solventes.

1.5 Características generales de las partículas lipídicas

La caracterización de las nanopartículas lipídicas es un desafío no solo debido a su tamaño sino a la complejidad del sistema, en donde la cinética de formación y crecimiento de las partículas provoca que ligeros cambios en la dispersión causen modificaciones significativas del sistema (Mehnert y Mäder, 2012). Dentro de las características normalmente determinadas para SLN y NLC, las más comunes son el tamaño y la morfología de las partículas, el comportamiento electrocinético, el grado de cristalinidad de la matriz lipídica y el comportamiento de liberación.

1.5.1 Tamaño, morfología y comportamiento electrocinético de las nanopartículas lipídicas

Para la determinación del tamaño de las partículas lipídicas, los métodos más ampliamente usados son la difracción láser (Laser Diffraction, LD) y la espectroscopía de correlación fotónica (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), también llamada dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS). Esta última es la más empleada debido a que es adecuada para medir partículas en rangos nanométricos. La distribución de tamaños puede calcularse con ambas técnicas y normalmente se representa por el índice de polidispersidad, PI. Dispersiones monodispersas tienen PI igual o muy cercano a cero, mientras que en muestras muy polidispersas el PI toma valores cercanos a uno (Mehnert y Mäder, 2012; Mukherjee et al., 2009; Tamjidi et al., 2013). El tamaño medio de partícula tanto en las SLN y los NLC se encuentra entre 100 nm y 400 nm siendo más comunes los valores entre 150 nm y 250 nm con índices de polidispersidad menores a 0.3 (Figura 1–5).

No parece existir una clara relación entre el tamaño medio de las partículas y el PI, con los componentes y el método de obtención seleccionados para su preparación. Las diferencias observadas podrían estar asociadas a las particularidades propias de cada estudio, relacionadas con la composición de las partículas lipídicas y con las condiciones de operación del método de preparación seleccionado.

Por ejemplo, se ha podido apreciar que al aumentar la cantidad de lípidos totales en la dispersión, por lo general se obtienen tamaños de partícula mayores (Montenegro et al., 2011; Seetapan et al., 2010; Silva et al., 2011; Trotta et al., 2003). En el caso de los NLC, algunos autores reportan aumentos del tamaño de partícula al incrementar la proporción de lípidos líquidos (Lin et al., 2007; Miao et al., 2015), mientras que otros evidencian lo contrario (Anantachaisilp et al., 2010; Jores et al., 2003). También se encuentran casos en los que no hay ningún efecto sobre el tamaño medio de partícula (Kovačević et al., 2011) o no es posible la correlación de los resultados del tamaño de partícula respecto a la proporción de aceite (Jores et al., 2004).

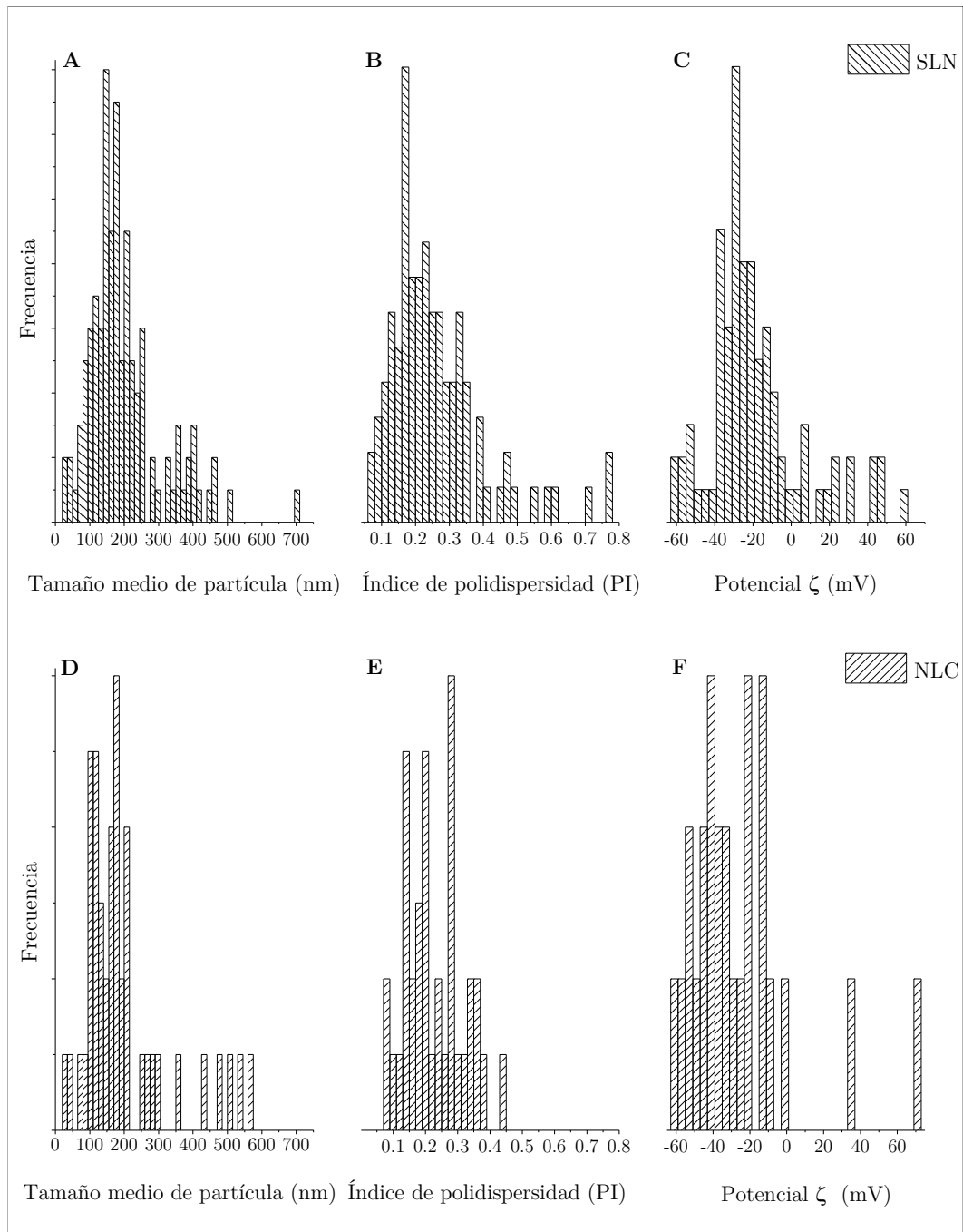


Figura 1–5. Distribución de tamaño, índice de polidispersidad (PI) y potencial ζ . Aproximación realizada a partir de los datos reportados en diferentes estudios. En las SLN (A, B y C) y los NLC (D, E y F) los valores más comunes de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial ζ se encuentran entre 150 a 200 nm; 0.15 a 0.25 y -20 a -40 mV, respectivamente.

De otro lado, el potencial ζ brinda información acerca de la magnitud de la carga sobre la superficie de las partículas en dispersión acuosa y permite predecir la estabilidad física de las dispersiones a largo plazo. Generalmente, el potencial ζ de las nanopartículas lipídicas es estimado a partir de la determinación de la movilidad electroforética/electroacústica y los equipos DLS y LD están equipados para realizar dichas determinaciones (Tamjidi et al., 2013). Usualmente se considera que para que una nanodispersión sea estabilizada electrostáticamente, se requieren valores de potencial ζ mayores de ± 30 mV, pero si la estabilización es una combinación estérica y electrostática, un mínimo de ± 20 mV es suficiente (Kovačević et al., 2014). Los valores de potencial ζ comúnmente reportados para las partículas lipídicas oscilan entre -20 mV hasta -40 mV, siendo más comunes los valores negativos debido al menor número de estudios con nanopartículas lipídicas de carácter catiónico (Figura 1-5C y F). Sin embargo, debe tenerse presente que el potencial ζ está definido por la naturaleza de la superficie de las partículas y por su carga y es función del ambiente en el que residen las nanopartículas y la concentración de la muestra. Así, la naturaleza del solvente, el pH, la fuerza iónica y la naturaleza de los electrolitos en solución (por ejemplo, la presencia de iones polivalentes), influyen directamente la magnitud leída y en muchos casos, el signo de la carga adquirida por las partículas (ASTM, 2015a; Delgado et al., 2005). Sin embargo, no parece existir una relación del valor de potencial ζ con el tipo de sistema (SLN o NLC) o con el tamaño de partícula. El amplio rango de valores es probablemente una consecuencia de los componentes de la dispersión, especialmente del agente tensioactivo y del fármaco empleados, así como de las particularidades del procedimiento empleado para su estimación.

De otro lado, para que los datos de tamaño de partícula obtenidos por DLS y LD puedan ser comparables con otros estudios, deben ser confirmados por otras técnicas que permitan la observación directa de las SLN y los NLC (Bhattacharjee, 2016; Fischer y Schmidt, 2016; Gaumet et al., 2008). La microscopía óptica puede dar información acerca de la presencia de partículas algo menores a $1 \mu\text{m}$ (Ban et al., 2014; Chirio et al., 2011; Gao y McClements, 2016; Islan et al., 2016). No obstante, es necesario complementar estas observaciones con el uso de técnicas avanzadas de microscopía, tales como Microscopía Electrónica de Barrido (Scanning Electron

Microscopy, SEM), Microscopía Electrónica de Transmisión (Transmission Electron Microscopy TEM) y Microscopía de Fuerza Atómica (Atomic Force Microscopy, AFM), con sus diferentes variantes criogénicas (Klang et al., 2012; Kuntsche et al., 2011; Tamjidi et al., 2013).

Es importante tener en cuenta que como los componentes de los sistemas coloidales basados en lípidos están casi exclusivamente compuestos de elementos químicos con bajo número atómico, para que las partículas individuales puedan ser visualizadas mediante técnicas de microscopía electrónica primero deben ser tratadas para aumentar su contraste. Como se observa en la Figura 1–6, TEM convencional es la técnica más reportada en la mayoría de los estudios y las muestras generalmente son negativamente teñidas con ácido fosfotúngstico o acetato de uranilo para dar contraste a las partículas. SEM es otra de las técnicas empleadas para la observación de las SLN (Figura 1–6A) y requiere secar la muestra y recubrirla con una delgada capa metálica, generalmente de oro u oro/paladio, para permitir la conducción de los electrones.

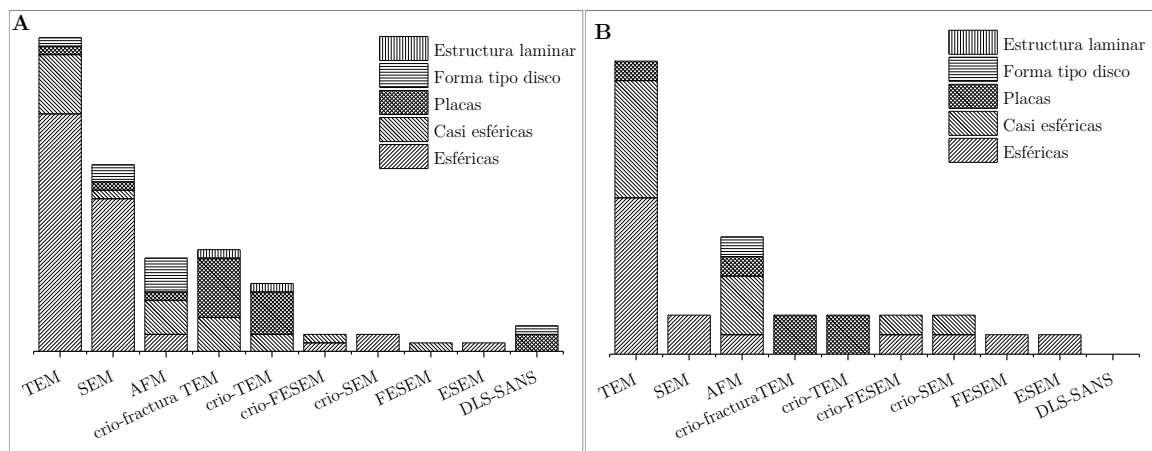


Figura 1–6. Técnicas utilizadas para la caracterización de la morfología de las nanopartículas.

A: SLN y B: NLC. TEM: Microscopía Electrónica de Transmisión; SEM: Microscopía Electrónica de Barrido; AFM: Microscopía de Fuerza Atómica; FESEM: Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo; ESEM: Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental; DLS-SANS: Dispersión Dinámica de Luz (DLS) - Dispersión de Neutrones de Ángulo Pequeño (SANS).

Por su parte, AFM se ha empleado en mayor proporción para la observación de los NLC (Figura 1–6B) respecto a las SLN. AFM suele ser una mejor opción que otras técnicas de microscopía electrónica puesto que permite la observación de muestras

hidratadas y no es necesario ningún proceso de teñido o de recubrimiento especial que pueda alterar las características de las partículas.

Cuando se usa TEM, SEM, AFM, Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (FESEM) y Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM) para la observación de las nanopartículas, la mayoría de los trabajos de investigación reportados dan cuenta de formas esféricas o casi esféricas para las SLN y los NLC (Figura 1–6) a partir de tamaños desde los 50 nm. En contraste, mediante el uso de Microscopía Electrónica de Transmisión criogénica (crio-TEM) y Microscopía Electrónica de criofractura (crio-fractura TEM) se reportan formas de placas que se asocian con el estado polimórfico estable β para el lípido de la matriz o en algunos casos, formas esféricas o tipo disco para las partículas en el estado polimórfico α (Bunjes et al., 2007, 2003, 2000; Gehrler et al., 2014; Nik et al., 2012; Noack et al., 2012). Para los NLC usando crio-TEM, las partículas lipídicas han sido descritas como estructuras bifásicas con el lípido líquido sobre la superficie de las partículas en forma de placas formando una especie de “nanocuchara” (Bunjes et al., 2001; Jores et al., 2004; zur Mühlen et al., 1996). Sin embargo, mediante el uso de crio-SEM (Lee et al., 2007) y crio-FESEM (Das et al., 2012; Saupe et al., 2006) no fue posible confirmar este tipo de estructuras y los NLC presentaron forma casi esférica sin la separación de fases previamente descrita. De hecho, en nanopartículas de colesterol acetato estabilizadas con lecitina de soya (Epikuron 200) y sales biliares al observarlas con crio-TEM, se encontraron formas tipo placa de 10 nm a 20 nm de espesor y 80 nm de diámetro, mientras que, cuando fueron estabilizadas usando polisorbato 80, se encontraron formas esféricas densas de 100 nm observados con crio-TEM (Sjöström et al., 1995), lo que sugiere que la naturaleza de los agentes estabilizantes influye en la forma final de las nanopartículas lipídicas. En adición, bajo tratamiento térmico o durante el almacenamiento pueden ocurrir transformaciones polimórficas en donde las partículas pasan de tener formas esféricas a formas de placa (Heurtault et al., 2003) probablemente organizadas en una estructura de red laminar (Lukowski et al., 2000).

Estos resultados generan controversia en torno a la forma de las nanopartículas lipídicas y justifican el desarrollo futuro de estudios sistemáticos que permitan comparar diferentes técnicas de observación capaces de conservar las características

nativas de las nanopartículas en dispersión, particularmente crio-TEM, crio-fractura TEM, crio-FESEM o incluso AFM, con las cuales se puedan estudiar detalladamente los efectos de los componentes de la matriz y de las condiciones de preparación, sobre el tamaño y la morfología de las partículas, así como el efecto del tamaño medio de las partículas sobre la redistribución de los lípidos de la matriz en formas termodinámicamente más estables (Illing y Unruh, 2004; Kuntsche et al., 2011; Mazuryk et al., 2016). Además, debe tenerse presente que durante la observación de las nanopartículas mediante TEM o SEM convencionales, es muy probable que el haz de electrones modifique la forma o incluso funda las partículas si la observación no se lleva a cabo bajo condiciones de baja dosis produciendo de este modo diversos artefactos que podrían ser mal interpretados. Además, no debe olvidarse que mediante TEM se obtienen imágenes bidimensionales por lo que una partícula con forma de disco podría ser interpretada de forma errónea como si se tratara de una esfera.

1.6 Estructura de las partículas lipídicas

Los sistemas coloidales basados en lípidos tipo SLN y NLC están compuestos de una matriz lipídica que se supone, está rodeada de agentes estabilizantes y uno o más principios activos incorporados de algún modo a esas partículas. Así, la estructura de la partícula está constituida por una capa externa que define las características de su superficie y por una capa interna o material del núcleo que determina otras características como el tamaño, la forma y la localización del principio activo (Bunjes, 2011; Garcia-Fuentes et al., 2004; Heiati et al., 1996). La manera como los lípidos de la matriz, los agentes estabilizantes y los activos que componen los sistemas coloidales basados en lípidos se organizan y relacionan entre sí, define su comportamiento como sistema transportador de activos y está fuertemente influenciada por el método de preparación empleado y por el comportamiento cristalino de los lípidos utilizados.

1.6.1 Comportamiento cristalino de los lípidos de la matriz

Los lípidos que constituyen la capa interna de los sistemas lipídicos coloidales exhiben un complejo comportamiento cristalino. La cristalización de estos materiales tiene lugar durante el proceso de enfriamiento y puede continuar en la etapa de

almacenamiento. Debido a que la cristalización de los lípidos de la estructura interna de SLN y NLC regula la forma, la incorporación del fármaco y la estabilidad de este tipo de coloides, el entendimiento de sus propiedades de solidificación y cristalización es fundamental para optimizar las formulaciones y obtener dispersiones estables. Consecuentemente, se debe prestar atención especial a las transiciones polimórficas y al grado de cristalización de los materiales lipídicos empleados.

En general, la mayoría de los estudios realizados coinciden en que durante el almacenamiento, los lípidos de la matriz tienden a cristalizar expulsando el activo produciendo cambios de forma que dan lugar al crecimiento y a la aglomeración no deseada de las partículas (Andrade et al., 2014; Okuda et al., 2005; Qian et al., 2013; Wang et al., 2009). El control de las transiciones polimórficas permite obtener formas cristalinas metaestables capaces de encapsular mayores cantidades de activo (Westesen et al., 1997) o asegura que las nanopartículas lipídicas sean obtenidas directamente en formas polimórficas estables, es decir, mejor empaquetadas, en las que no habrían cambios significativos durante el tiempo de almacenamiento de las dispersiones (Schoenitz et al., 2013).

El comportamiento cristalino del lípido sólido en las partículas depende de la composición y del tamaño de las gotas del lípido fundido; el proceso de nucleación puede iniciar desde la capa interior o desde la capa exterior que conforma la superficie de las nanopartículas, lo que depende de la velocidad de enfriamiento y del componente que solidifique primero en la mezcla (Sonoda et al., 2006; Westesen y Bunjes, 1995).

Por lo tanto, dependiendo de la composición y del proceso de preparación, los lípidos de la estructura interna de las partículas pueden tener diversas conformaciones tales como cristales líquidos, geles o fases lamelares cristalinas. Durante el calentamiento o el enfriamiento, los lípidos pueden sufrir cambios estructurales dependiendo de su estructura química. Así, por ejemplo, para los triglicéridos, las diferencias en el empaquetamiento y las variaciones en el ángulo de inclinación de la cadena de hidrocarburos diferencian las formas polimórficas (Metin y Hartel, 2005). Además, el comportamiento físico de los lípidos depende de las características de la cadena

alquílica, la presencia de insaturaciones, la configuración *cis* o *trans* y la longitud de la cadena (Ribeiro et al., 2015; Sato y Ueno, 2005).

Las dos técnicas más empleadas para determinar el estado físico y la estructura cristalina, tanto de SNL como de NLC, son calorimetría diferencial de barrido (Differential Scanning Calorimetry, DSC) y difracción de rayos X (X-Ray Diffraction, XRD). El análisis de los eventos térmicos obtenidos por DSC proporciona información acerca de la estructura y el estado físico de las partículas, así como de las posibles interacciones entre componentes. Igualmente, se pueden determinar las diferentes transiciones de fase que tienen lugar en la muestra (Schubert et al., 2005). Normalmente, DSC se combina con medidas de XRD para analizar a profundidad la estructura cristalina a través del cálculo del espaciado interatómico (Bunjes et al., 1996; Bunjes y Unruh, 2007; Severino et al., 2011a). No obstante, la principal desventaja de XRD es la necesidad de secar las suspensiones para tenerlas en polvo, lo que puede originar modificaciones polimórficas durante el proceso. Esta dificultad puede superarse mediante el uso de dispersión de rayos X (X-ray scattering), una técnica capaz de analizar muestras en suspensión (Dong y Boyd, 2011; Jennings et al., 2000b; Westesen et al., 1993).

Para el caso particular de los triglicéridos (triacilgliceroles, TAGs), las formas polimórficas más comunes son α , β' , y β (Hagemann y Rothfus, 1983; Marangoni et al., 2012; Sato, 2001). La forma α tiende a transformarse rápidamente a las formas con mejor empaquetamiento de las cadenas alquílicas (Bunjes y Unruh, 2007; Ribeiro et al., 2015). Generalmente, la transición del líquido (lípido fundido) desde la forma α a la β transcurre vía el poliformo β' . Por consiguiente, durante el almacenamiento, la forma β' puede convertirse gradualmente en el polimorfo más estable mientras se modifica la forma inicial de las partículas y se produce el crecimiento de agregados cristalinos (Heurtault et al., 2003; Marangoni et al., 2012).

La adición de bajos porcentajes de tensioactivo a los triglicéridos o a mezclas de triglicéridos puede cambiar los rangos de fusión y el número y tipo de polimorfos dependiendo de la compatibilidad con el sistema, o por el contrario, puede afectar la velocidad de transformación sin alterar sensiblemente la red cristalina debido posiblemente a que los tensioactivos podrían estabilizar los polimorfos metaestables,

retrasando así la transformación a la forma más estable (Lawler y Dimick, 2008; Schubert et al., 2005). Ese mismo efecto ha sido descrito en varias ocasiones en emulsiones en donde la temperatura de cristalización depende de la similitud entre la estructura química del agente estabilizante con la fase cristalina del lípido (Palanuwech y Coupland, 2003). Se cree que las moléculas de tensioactivo sobre la superficie de las gotas de lípido actúan como molde permitiendo que el alineamiento de las moléculas del lípido cercanas a la interface inicien la nucleación a altas temperaturas y cuyos efectos parecen ser más marcados en emulsiones en el rango nanométrico que en emulsiones en el rango micrométrico, debido al empaquetamiento apretado de la región hidrófoba de la capa emulsificadora interfacial de las emulsiones en el rango nanométrico (Douaire et al., 2014; Sonoda et al., 2006).

1.6.2 Modelos de estructura propuestos para las partículas lipídicas

Para las SLN se han propuesto, de manera general, dos modelos de estructura en los que se supone que las partículas están rodeadas por el agente tensioactivo que conforma la capa externa. En el primer modelo (Figura 1-7A), se asume que durante el enfriamiento las gotas fundidas de la matriz lipídica solidifican manteniendo su forma esférica (Cavalli et al., 1993; Sjöström et al., 1995). En el segundo modelo (Figura 1-7B), el enfriamiento de la matriz lipídica fundida produce una estructura laminar plana con superficies estructuradas por dobleces, bordes y escalones que se producen durante el proceso de recristalización y donde la estructura del lípido pasa de la forma α a la forma polimórfica más estable β (Bunjes et al., 2007, 2000; Sjöström et al., 1995; Westesen y Siekmann, 1997).

Con respecto a la estructura de NLC se han propuesto por lo menos cinco modelos. En los dos primeros, se asume que la adición de un lípido líquido a la matriz formada por el lípido sólido puede generar la disrupción de la estructura cristalina en mayor grado que lo que se logra con mezclas de lípidos sólidos (Bunjes et al., 1996). De este modo, la adición de un lípido líquido (aceite) puede conducir a un estado altamente desordenado del lípido sólido de la capa interna, lo que depende de la cantidad de lípido líquido adicionado. A bajas proporciones de aceite tiene lugar la formación de

una estructura en la que las moléculas de ambos lípidos se integran homogéneamente en una matriz sólida, por lo general, de baja cristalinidad (Figura 1–8A).

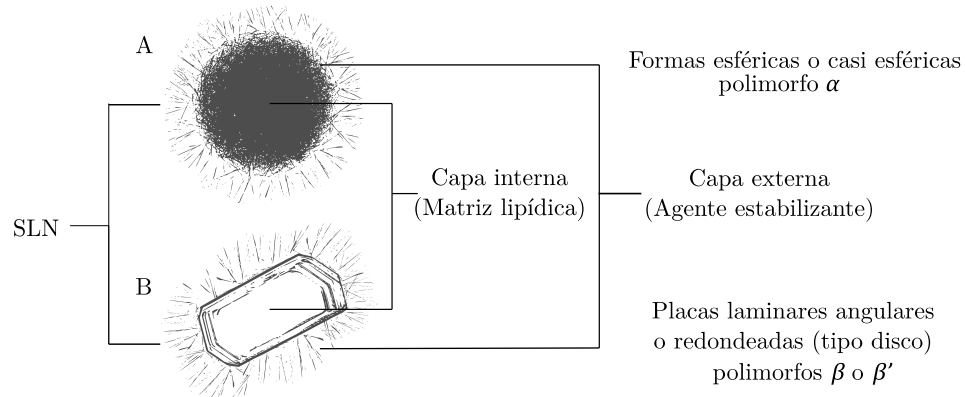


Figura 1–7. Representación esquemática de los modelos propuestos para SLN.

(A) El modelo SLN esférico contiene un núcleo lipídico sólido y una capa externa que comprende un agente estabilizante. (B) El modelo SLN de placas contiene una capa interna que comprende cristales de lípidos coloidales en forma de placas laminares recubiertos por un agente estabilizante en la capa externa.

Si se usan elevadas proporciones de aceite, se forman nanocompartimentos líquidos (Figura 1–8B) en una matriz de baja cristalinidad constituida por el lípido sólido (Jenning et al., 2000b; Müller et al., 1999). En ambos modelos, las nanopartículas preparadas a partir de una amplia gama de lípidos sólidos presentan formas esferoidales bajo observación mediante crio-FESEM (Das et al., 2012; Dong et al., 2012; Saupe et al., 2006) y crio-TEM (Yang et al., 2014) que podrían contribuir con el aumento en la estabilidad de las dispersiones de NLC con respecto a las dispersiones de SLN (Jenning et al., 2000b; Saupe et al., 2005).

Estos dos modelos para NLC son ampliamente difundidos (Beloqui et al., 2016; Ganesan y Narayanasamy, 2017; Li et al., 2017; Montenegro et al., 2015; Weber et al., 2014) y fueron propuestos a partir del estudio de la movilidad, el arreglo y el ambiente químico de los lípidos de la matriz utilizando $^1\text{H-NMR}$ y DSC en nanopartículas lipídicas preparadas a partir de mezclas binarias entre behenato de glicerilo (lípido sólido) y triglicéridos de cadena media (lípido líquido), conteniendo retinol como fármaco modelo. Los resultados de DSC de dichos estudios indican que existe una dependencia entre la entalpía de fusión y la proporción de aceite utilizado para

preparar las nanopartículas, evidenciando una reducción en la energía de fusión a medida que se incrementa la cantidad de lípido líquido.

De modo similar, el análisis de la movilidad de los componentes de las nanopartículas a partir de $^1\text{H-NMR}$ muestra cierta dependencia en función de la proporción de aceite utilizado. Para proporciones entre el 8 % y el 16 %, las moléculas de los triglicéridos de cadena media están rodeadas por una matriz de behenato de glicerilo debido a los reducidos corrimientos químicos observados y que se asocian con su movilidad molecular, dando como resultado una estructura como la de la Figura 1–8A. Para proporciones entre el 28 % y el 38 %, las moléculas de los triglicéridos de cadena media exhiben mayores corrimientos químicos y por lo tanto, mayor movilidad que se asocia a la formación de nanocompartimentos o nanodominios líquidos a través de una matriz sólida de baja cristalinidad de behenato de glicerilo, como se ilustra en la Figura 1–8B (Jenning et al., 2000a).

La formación de estos nanocompartimentos de aceite dentro de la estructura de una nanopartícula sólida también fue confirmada mediante espectroscopía de NMR en orden a difusión (DOSY-NMR), realizada a NLC preparados a partir de tripalmitina y triglicéridos de cadena media, empleando el método de doble emulsión. En este caso, la difusión de las moléculas de aceite fue restringida en su dinámica traslacional por límites estrechos, indicando la presencia de reservorios de aceite separados en el interior de las partículas sin que se interfiera con la cristalización del lípido sólido (García-Fuentes et al., 2005).

La observación de dominios líquidos rodeados por dominios sólidos fue recientemente corroborada en los NLC preparados a partir de triestearina y triglicéridos de cadena media, empleando microscopía de super resolución y seguimiento individual de partículas. Dichos nanodominios dentro de las nanopartículas pueden llegar a ocupar hasta el 50 % del volumen de la partícula. La proporción entre el tamaño del dominio y el tamaño de la partícula podría determinar el comportamiento de liberación y la estabilidad de los activos incorporados en estas partículas (Boreham et al., 2017; Dan, 2016, 2014; Nelson et al., 2017).

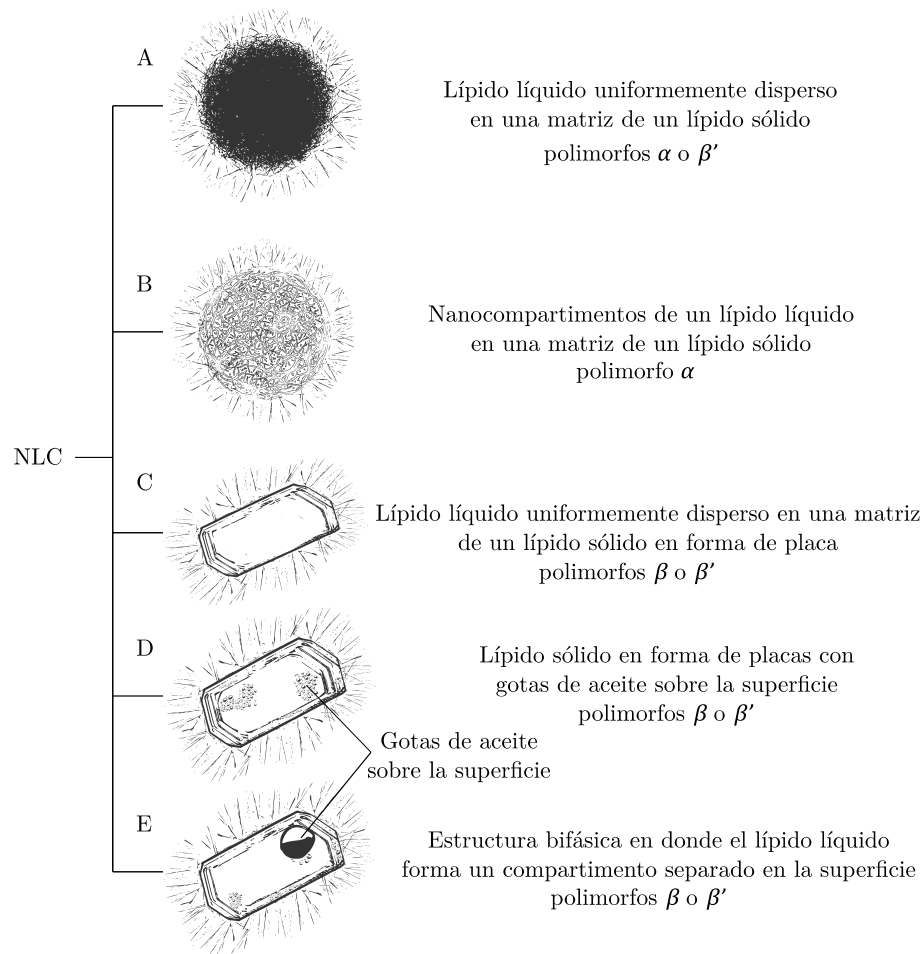


Figura 1–8. Representación esquemática de los modelos propuestos para NLC.

(A) Modelo de matriz esférica uniformemente dispersa, (B) nanocompartimentos de aceite dentro de una matriz sólida de forma esférica, (C) estructura homogénea debido a la adición de una pequeña cantidad de aceite en una matriz cristalina en forma de placa del lípido sólido, (D) múltiples gotas de aceite en la superficie de un cristal en forma de placa del lípido sólido debido a la separación de fases, (E) múltiples gotas de aceite fusionadas en una única gota de aceite sobre el borde de un cristal en forma de placa del lípido sólido.

Además, en un estudio similar utilizando $^1\text{H-NMR}$ se encontró que la adición de triglicéridos complejos sólidos de bajo punto de fusión (Softisan® 378) en una matriz de cetil palmitato, no solo genera una disminución en el grado de cristalinidad del cetil palmitato, sino que también permite la formación de pequeños nanocompartimentos líquidos compuestos probablemente por la formación de un fluido subenfriado de Softisan® 378 (Chantaburanan et al., 2017).

Otros tres modelos para NLC preparados a partir de gliceril behenato y triglicéridos de cadena media fueron propuestos a partir de observaciones por crio-TEM y mediciones de flujo de campo fraccionado (Field-flow fractionation, FFF) en donde las partículas están formadas por estructuras bifásicas entre nanoemulsiones y las SLN de estructura laminar plana. Estructuras en las cuales el lípido líquido puede estar homogéneamente distribuido al interior de las partículas solo pueden ser esperadas a muy bajas proporciones de aceite y probablemente, se alojarían en las imperfecciones de la red cristalina formada por las fases polimórficas β o β' (Figura 1-8C). A medida que la proporción de aceite aumenta hasta el 10 % de la fase lipídica, éste se localiza sobre la superficie de la partícula sólida (D) y a proporciones de hasta el 30 %, se forman “gotas” (“spots sticking”) del lípido líquido sobre la superficie de las partículas, localizadas preferencialmente hacia las esquinas (Figura 1-8E), formando una especie de nanocuchara (“nanospoon”) (Jores et al., 2004).

De modo similar, en NLC preparados a partir de cetil palmitato y triglicéridos de cadena media empleando rojo Nilo como marcador, los que fueron caracterizados a partir de DSC, difracción de rayos X y $^1\text{H-NMR}$, se evidencia la disrupción de la estructura cristalina del lípido sólido debido a la adición del lípido líquido mediante la detección de un incremento en la movilidad de los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$ pertenecientes a ambos lípidos. Además, se demuestra que existe una relación entre la proporción de lípido líquido y la creación de impurezas, o la formación de estructuras cristalinas menos ordenadas durante el enfriamiento de la matriz, de manera que una parte del lípido líquido es incluido en el interior de la matriz sólida y el remanente se acumula, o bien en la capa exterior de agente estabilizante o sobre la superficie de las partículas, lo que ocurre especialmente en los casos en los que se trabaja con un alto contenido de triglicéridos de cadena media (Teeranachaideekul et al., 2008).

1.6.3 Localización del activo en SLN y NLC

La localización más probable de una molécula encapsulada en sistemas de entrega basados en lípidos coloidales brinda información acerca de la cantidad de fármaco que está realmente asociada con las nanopartículas y sobre el tipo de interacción que se

presenta entre ambos. Esta información es útil para entender la estabilidad y el comportamiento de liberación de las moléculas activas (Bunjes, 2010, 2004), así como el desempeño *in vivo* de las dispersiones. Sin embargo, el estudio de estas nanoestructuras representa un verdadero desafío y hasta ahora, la determinación detallada de la distribución del fármaco tanto en SLN como en NLC no ha sido del todo posible (Boreham et al., 2017). Una razón puede ser que el tipo de interacción para cada combinación de fármaco/partícula sea demasiado específico y dependa además de la composición general de la dispersión y del método de preparación (Bunjes, 2004).

Los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la localización del principio activo depende de la organización estructural de los sistemas lipídicos coloidales. Así, a partir del modelo de la Figura 1–7, correspondiente a los modelos básicos para las SLN, se desprenden tres posibilidades: (I) que la molécula activa se distribuya de manera homogénea en toda la estructura de la partícula según como se esquematiza en la Figura 1–9A, (II) que se concentre en el interior de la partícula rodeada por la matriz lipídica en una estructura tipo núcleo recubierto o core-shell (Figura 1–9B), o (III) que se concentre sobre la partícula formando una especie de coraza tipo outer-shell (Figura 1–9C) (Cavalli et al., 1997; Müller et al., 2000; Pardeike et al., 2009; Souto et al., 2004; zur Mühlen et al., 1998).

En este sentido, mediante simulaciones llevadas a cabo usando la técnica de dinámica de partículas disipativas (Dissipative Particle Dynamics, DPD) se encontró que la localización del ibuprofeno en micropartículas sólidas lipídicas depende del tipo de lípido sólido de la matriz. Cuando se emplean triestearina y gliceril behenato, las moléculas de ibuprofeno se adsorben sobre la superficie de la micropartícula en estructuras del tipo outer-shell, mientras que con alcohol cetílico como lípido, parte del fármaco se localiza en la superficie de la partícula y el resto se distribuye en el área interna de la matriz formando una estructura del tipo core-shell (Long et al., 2006). Del mismo modo, en cuanto a la localización del fármaco en las SLN, estudios llevados a cabo mediante $^1\text{H-NMR}$ y espectroscopía Raman realizados a SLN preparadas a partir de cetil palmitato, evidenciaron la formación de una estructura bifásica en la que el γ -oryzanol usado como fármaco modelo, se ubicaba

preferencialmente sobre los bordes de las nanopartículas en un arreglo estructural tipo outer-shell (Anantachaisilp et al., 2010).

Para explicar los modelos de incorporación de la Figura 1–9 se debe considerar el efecto de la temperatura y del solvente, cuando estos últimos hacen parte del método de preparación. Estas variables tienen que ver con la modificación de la solubilidad en el medio acuoso. Puesto que la solubilidad es directamente proporcional a la temperatura, la solubilidad del fármaco es tanto mayor cuanto más temperatura se requiera para fundir los lípidos de la matriz, de hecho, en la mayoría de los estudios la temperatura suele ser por lo menos 10 °C por encima del punto de fusión del lípido sólido, por lo tanto, la cantidad de fármaco en la fase acuosa se incrementa. Posteriormente, durante el proceso de enfriamiento, la solubilidad del fármaco disminuye, se sobresatura la fase acuosa y las moléculas del activo migran a la matriz lipídica debido a sus características lipofílicas.

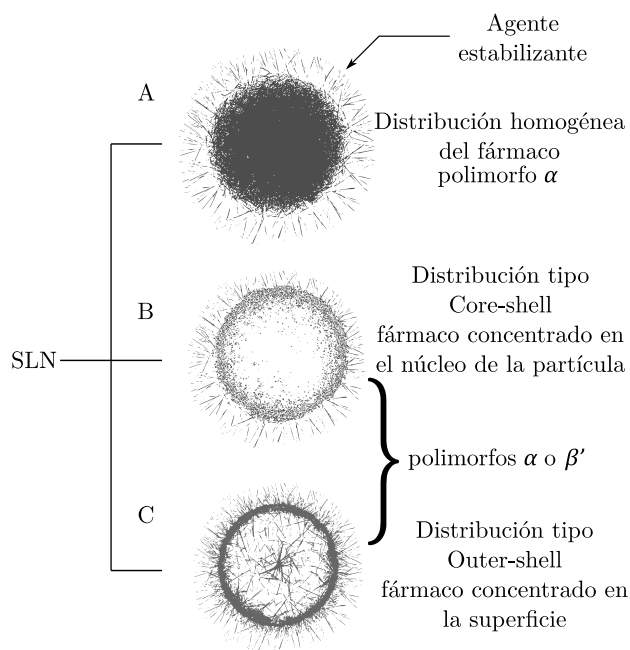


Figura 1–9. Representación de los modelos de incorporación de activos en SLN. (A) Fármaco uniformemente distribuido, (B) core-shell y (C) outer-shell.

No obstante, si los lípidos de la matriz tienen alto punto de fusión y alta temperatura de cristalización, lo que los lleva a cristalizar antes que la molécula activa, este último se deberá alojar en la superficie de la partícula (outer-shell). Si, por el contrario, los

lípidos de la matriz tienen bajos puntos de fusión o bajos puntos de cristalización, es posible que a temperaturas elevadas permanezcan en un estado subenfriado o en formas cristalinas metaestables en donde podría alojarse una mayor cantidad de fármaco, el que además, dirigirá el proceso de nucleación quedando incluido al interior de la partícula (core-shell) u homogéneamente disperso en toda la estructura, especialmente cuando se usan métodos de homogeneización a altas presiones en frío (zur Mühlen et al., 1998).

Efectos similares se pueden esperar cuando se usan solventes orgánicos en la preparación de las nanopartículas lipídicas. Dependiendo del mecanismo predominante de formación, las moléculas del activo se distribuirán de forma preferencial en las diferentes fases presentes en el medio por lo que eventualmente se podrían presentar cualquiera de los modelos propuestos.

De otro lado, en SLN preparadas con el lípido sólido Inwitor® 900 (gliceril monoestearato 40 % - 50 %) y ciclosporina A, se analizó el comportamiento cristalino de los componentes de formulación utilizando DSC y XRD de ángulo amplio (Wide-Angle X-Ray Scattering, WAXS). Estos resultados evidencian que el fármaco puede ser molecularmente incorporado en las nanopartículas lipídicas hasta un 20 % de carga, manteniendo una distribución homogénea de la molécula activa en el interior de las nanopartículas (Müller et al., 2008). Resultados similares fueron descritos para SLN preparadas con glicerol behenato, dodecil sulfato de sodio y risperidona como molécula modelo, analizadas mediante NIR-CI (Near Infrared Spectroscopy and Chemical Imaging, NIR-CI), un método no destructivo de análisis cualitativo y cuantitativo que provee la distribución espacial de una entidad química en una sustancia, además de proveer la información espectral (Rahman et al., 2010).

En NLC con 5 % de triglicéridos caprílico/cáprico se observa que el lípido líquido forma una fase separada enriquecida con la molécula activa sobre el borde de la matriz de las nanopartículas de cetil palmitato de modo similar al modelo de la Figura 1-8E. Sin embargo, a proporciones de aceite mayores al 10 %, la mezcla entre el lípido líquido y el γ -oryzanol se distribuye de manera más uniforme en las nanopartículas en función de la disminución del grado de cristalinidad de la partícula con el incremento

de la proporción de aceite, probablemente como en el modelo de la Figura 1–8 (Anantachaisilp et al., 2010).

La distribución homogénea del fármaco en SLN se presenta si el compuesto activo es altamente hidrófobo y posee elevada temperatura de cristalización. Por ejemplo, el β -caroteno puede integrarse homogéneamente en una matriz de triestearina. Además, si el agente tensioactivo usado (saponinas de Quillaja) puede prevenir la transición polimórfica del lípido de la matriz desde la fase α a la fase β , entonces se obtienen nanopartículas estables en el tiempo. Si se combina un tensioactivo capaz de estabilizar la fase α con un tensioactivo de alto punto de fusión que pueda formar una capa cristalina sobre la superficie, el resultado es una estructura que mantiene la fase α permitiendo que el principio activo se acomode en una red cristalina menos ordenada rodeada de una capa sólida alrededor de la partícula (Salminen et al., 2016, 2014).

Por otra parte, imágenes de NLC obtenidas por fluorescencia, revelaron que el colorante BODIPY 665/676 (4,4-difluoro-3,5-bis(4-fenil-1,3-butadienil)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) se distribuye preferencialmente en regiones líquidas a medida que se incrementa la concentración de aceite en el nanotransportador mejorando también su estabilidad (Davis et al., 2015). Estos resultados son comparables con los obtenidos para SLN y NLC en donde la expulsión del β -caroteno desde la matriz lipídica disminuye a medida que aumenta la proporción de lípido líquido, posiblemente debido a la retención del β -caroteno en compartimentos líquidos rodeados por una barrera protectora formada por una red del lípido sólido (Pan et al., 2016).

Por el contrario, otros estudios indican que la molécula activa no está situada en el interior de la matriz lipídica u homogéneamente distribuida en ella, sino más bien en alguna parte de la interfase de la nanopartícula y el agente estabilizante o en el medio acuoso circundante. En este modelo de estructura para SLN y NLC, la molécula activa tiende a incorporarse principalmente sobre la superficie de las partículas, las que están arregladas en una estructura laminar como la que se describe para la Figura 1–7B o eventualmente, entre las capas de dicha estructura (Lukowski et al., 2000; Mazuryk et al., 2016).

La evidencia que soporta este tipo de arreglo estructural proviene de diferentes estudios, varios de ellos utilizando resonancia paramagnética electrónica (Electron Paramagnetic Resonance, EPR) también conocida como resonancia de espín electrónico (Electron Spin Resonance, ESR). Por ejemplo, en SLN compuestas por gliceril behenato y P188, se encontró que la molécula activa (tempolbenzoato, 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin 1-oxil benzoato) puede ubicarse en tres ambientes químicos de diferente lipofilicidad en las nanopartículas lipídicas. En el ambiente I, el fármaco se localiza en compartimentos de características lipofílicas con considerable movilidad que se atribuye a tempolbenzoato molecularmente disuelto en las cadenas alquílicas del lípido sólido. El ambiente II se caracteriza por una naturaleza polar, es decir, moléculas de tempolbenzoato solubilizadas en la fase acuosa. Finalmente, el ambiente III representa moléculas del fármaco localizadas sobre la superficie de las nanopartículas, lo que sugiere que la cristalización de las nanogotas del lípido fundido conduce a la expulsión de la mayoría del fármaco (cerca del 70 %) hacia la superficie de la partícula y a la fase acuosa. Respecto a la localización del tempolbenzoato en los NLC, también se encuentran presentes las tres especies identificadas para las SLN. Sin embargo, se evidencia una relación entre la proporción de aceite utilizada en la preparación de las nanopartículas y la localización preferente de la molécula activa. A proporciones de aceite mayores al 10 % el fármaco se localiza en el ambiente I de características lipofílicas, es decir, en las gotas del lípido líquido formadas en la superficie de las partículas de acuerdo con lo descrito en la Figura 1-8E, mientras que a proporciones entre el 2 % y el 4 % de aceite, el tempolbenzoato se incorpora en el ambiente III caracterizado por compartimentos de moderada hidrofiliicidad, es decir, el activo se localiza sobre la superficie de la partícula según la Figura 1-8D (Jores et al., 2003).

Estos resultados fueron confirmados para SLN preparadas a partir de triesterina y estabilizadas con Polisorbato® 20, solo que se describen cinco ambientes en lugar de tres. El ambiente I esta dado por una pequeña población de fármaco separada en la fase continua de elevada polaridad, el ambiente III, describe la localización predominante del tempolbenzoato en un ambiente desestructurado con polaridad media y movilidad molecular restringida y que fue asignado a la superficie rica en agente tensioactivo de las nanopartículas, mientras que el ambiente II describe la

localización del tempolbenzoato en estructuras micelares formadas posiblemente en la fase dispersante. Finalmente, los ambientes IV y V están caracterizados por la presencia de diferentes estados cristalinos en la matriz de triestearina, de modo que el ambiente IV, caracterizado por una restricción molecular media, está asociado a una combinación de los polimorfos α y β' , mientras que el ambiente V presenta elevada restricción molecular y está asociado con la estructura polimórfica β más densamente empaquetada (Milsmann et al., 2017). De modo similar, en NLC preparados a partir de trimiristina y triglicéridos de cadena media estabilizados con Plantacare® 818 (C8–16 glucósidos de alcohol graso), el tempol se localiza en la capa del agente estabilizante y solo una pequeña fracción se encuentra asociada en los nanocorpartimentos del lípido líquido de la matriz (Haag et al., 2011).

EPR también se empleó para estudiar la localización del activo en SLN preparadas a partir de palmitato de glicerilo (Dynasan® 116), lecitina de soya y P188 incorporando como moléculas modelo de polaridad creciente, espín etiquetadas con grupos nitróxido: Tempomiristato (C14-Tempo, 1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-tetradecanoiloxipiperidina) > metil éster del ácido 50-doxil palmítico (MeFASL) > fosfatidilcolina (PC) > 1-palmitoil-2-palmitoil(50-doxil)-sn-glicero-3-fosfocolina > Tempol (1-oxil-2,2,6,6-tetrametil-4-hidroxipiperidina). Los resultados revelan que las moléculas más hidrófilas se ubican preferentemente en un ambiente polar mientras que las moléculas lipófilas se localizan en un ambiente no polar, es decir, las moléculas del activo se ubican diferencialmente desde el interior de las partículas sólidas hasta la fase acuosa dependiendo de su lipofilidad (Tabla 1-4).

Tabla 1-4. Ubicación preferente de moléculas de acuerdo con su polaridad en SLN.

Molécula	Incorporación preferencial del fármaco (%)		
	Matriz	Fosfolípidos	Fase acuosa
Tempol	0	0	100
C14-Tempo	46	54	0
MeFASL	34	65	1
PC	10	89	1

*Los datos fueron adaptados de Ahlin et al. (2003).

La importancia de estos hallazgos radica en que permiten explicar el comportamiento bifásico de liberación observado en algunos de estos sistemas. La liberación rápida puede ser atribuible a la distribución preferencial del activo en la superficie de la capa

de fosfolípidos o en la fase acuosa y la liberación sostenida puede ser lograda por el activo atrapado en la matriz lipídica (Ahlin et al., 2003, 2000).

Resultados similares respecto a la ubicación preferente del activo fueron obtenidos en un estudio en el que se investigan tres moléculas de diferente polaridad; el tempol de naturaleza hidrófila, el ácido 16-oxil esteárico (16-DS) de naturaleza anfifílica y el 4-fenil-2,2,5,5-tetrametil-3-imidazolina-1-oxilnitróxido (PTMIO) de naturaleza lipófila, incorporadas en SLN preparadas a partir de eicosano como lípido sólido. Los resultados muestran que en función de la estructura y la polaridad de las moléculas modelo, éstas se ubican en diferentes zonas de la partícula. El tempol se ubica preferentemente en la fase acuosa debido a su elevada polaridad. Por su parte, el 16-DS se acomoda de modo que sus grupos polares quedan más expuestos a la fase acuosa y su parte menos polar se ubica en el interior de la fase lipídica (Berton-Carabin et al., 2013) y PTMIO es expulsado a la superficie, debido posiblemente a la dificultad de acomodarse en la estructura cristalina del lípido sólido de la matriz de eicosano (Berton-Carabin et al., 2013; Yucel et al., 2013).

De otro lado, los ácidos grasos 5-doxil esteárico (5-DSA) y 16-doxil esteárico (16-DSA) espín etiquetados, se emplearon para estudiar el comportamiento dinámico de los lípidos de la matriz respecto a la fluidez de las partículas en SLN y NLC. Para ello, las sondas fueron incubadas con dispersiones de SLN y NLC y posteriormente analizadas mediante EPR. Los resultados muestran que las sondas de ácidos grasos se localizan principalmente sobre la superficie de las partículas en ambos sistemas dispersos a pesar de que la fluidez superficial de las partículas en SLN es menor que en NLC, debido probablemente a la adición los triglicéridos de cadena media que podrían estar acomodados principalmente en esta región. Sin embargo, la sonda 16-DSA se inserta a mayor profundidad en la partícula que la sonda 5-DSA, si bien la dinámica molecular de la matriz lipídica para SLN y NLC es prácticamente la misma. Además, la adición del activo aumenta la rigidez de la matriz lipídica, fenómeno que ocurre en mayor proporción en SLN que en NLC, sugiriendo la localización preferente del activo en una fase enriquecida con el lípido líquido y que la rigidez de la nanopartícula está relacionada con la organización de la matriz lipídica. Por lo tanto, obtener sistemas más fluidos capaces de retener mejor el fármaco en el interior de la

partícula es deseable desde el punto de vista de la estabilidad del nanotransportador en el tiempo (Andrade et al., 2014; Tosta et al., 2014). Esto fue verificado a través del estudio de la velocidad de oxidación del linolenato de metilo en dispersiones preparadas a partir de octadecano, donde la degradación del activo fue significativamente mayor en las microsuspensiones que en las respectivas microemulsiones de octadecano en estado de líquido subenfriado. Esto sugiere que en las SLN, formadas por partículas menos fluidas, el linolenato de metilo líquido puede estar concentrado en dominios físicos más cercanos a la superficie donde es más susceptible a la oxidación por la fase acuosa (Okuda et al., 2005).

Estudios complementarios por espectroscopía paraeléctrica (Parelectric Spectroscopy, PS) también han demostrado que en SLN y en NLC, el activo se localiza en mayor proporción sobre la superficie de las nanopartículas (Blaschke et al., 2007). En este caso, los investigadores encontraron la localización preferente de dos hidrocorticoides (betametasona 17-valerato y prednicarbato) en la superficie de SLN, indicando que la lipofilidad parece no ser el parámetro más importante en la interacción del activo con el lípido de la matriz. La eficiencia de atrapamiento podría estar relacionada con la unión del activo a las cadenas lipofílicas laterales, lo que explicaría la localización superficial preferencial del activo y el comportamiento de liberación observado para estos sistemas coloidales (Sivaramakrishnan et al., 2005, 2004). Igualmente, empleando PS y EPR para elucidar la estructura de la partícula, se encontró que en las SLN el lípido sólido (glicerol behenato) cristaliza produciendo estructuras tipo disco donde el agente activo (colestano) se localiza preferencialmente sobre la superficie de las partículas, siendo la estructura de los NLC dependiente de la proporción de lípido líquido empleado (Braem et al., 2007).

Otros estudios han encontrado que la localización del activo sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas puede ser evidenciada a través de la relación entre la capacidad de carga y el área superficial de las nanopartículas. Dicha relación se obtiene a partir de la determinación del contenido total de activo, la forma de las nanopartículas, la intensidad de la fluorescencia y el efecto protector otorgado por las nanopartículas para diferentes moléculas utilizadas como modelo. Por ejemplo, se pudo verificar que en SLN preparadas a partir de trimiristina y P188, utilizando

diferentes moléculas modelo (curcumina, dibucaína, fenofibrato y ácido mefenámico), la reducción del tamaño de partícula permitió el doble de la capacidad de carga, lo que significa que la capacidad individual de carga depende del área superficial y no de la masa de las partículas. En consecuencia, el fármaco deberá estar localizado preferentemente sobre la superficie (Kupetz y Bunjes, 2014).

Además, mediante el uso de EPR multifrecuencia se encontró que en NLC a base de Gelucire® y Witepsol® como lípidos sólidos y Capryol™ como lípido líquido, el activo dexametasona se encuentra principalmente en la superficie de las partículas por lo que puede ser fácilmente liberado. Este comportamiento fue observado en nanopartículas con tamaños de 424 nm y 134 nm, en donde las partículas más pequeñas muestran cerca de dos veces mayor capacidad de carga por volumen debido al incremento del área superficial (Saeidpour et al., 2017). De igual modo, fue posible demostrar que la sonda fluorescente cumarina-6 se localiza preferentemente sobre la superficie de SLN. En este caso, el espectro de fluorescencia observado presentó corrimiento hipsocrómico hacia menores longitudes de onda, lo que es característico de una molécula cuando se encuentra en ambientes polares, por ejemplo, en la superficie de las partículas (Finke et al., 2014).

Resultados similares en cuanto a la localización preferente del fármaco en la superficie de las SLN se obtuvieron a partir de la degradación del colorante sensible al oxígeno, complejo de tris(4,7-difenil-1,10-fenantrolina) rutenio bis(hexafluorofosfato) y del colorante BODIPY 665/676, sensible a radicales peróxido. En ambos casos se observa una disminución de la fluorescencia de las dispersiones con respecto al tiempo de exposición evidenciando el fenómeno de expulsión del fármaco durante el proceso de solidificación del eicosano. También, se encontró que el activo encapsulado en los NLC es menos susceptible a ser degradado en comparación con las SLN a medida que se incrementa la proporción del lípido líquido en la matriz (Tikekar y Nitin, 2012).

La localización del activo en la superficie de las SLN puede ser explicada a partir de una serie de pasos que suceden a medida que avanza el proceso de formación de las partículas lipídicas y que dependen de si el proceso se lleva a cabo por encima de la temperatura ambiente o mediante el empleo de cosolventes: (I) el activo se disuelve en la fase lipídica fundida; (II) el activo precipita en las gotas de lípido fundido durante

el enfriamiento o al extraer el solvente; (III) si los agentes estabilizantes empleados producen una interfase fluida que no pueda prevenir la transición polimórfica del lípido desde la fase α a la fase β , el lípido recristaliza y el activo es expulsado; (IVa) el activo se acumula sobre la superficie de las partículas totalmente cristalizadas o (IVb) se localiza en un estado solubilizado en la interfase entre la partícula y el medio dispersante. De otro lado, a temperaturas superiores de la temperatura ambiente, la solubilidad del activo aumenta favoreciendo su presencia en la fase acuosa. Sin embargo, durante el enfriamiento la solubilidad del fármaco disminuye provocando que el exceso disuelto en la fase acuosa precipite en el seno de la dispersión o se acumule sobre la superficie de la partícula debido a la afinidad estructural (Noack et al., 2012; Salminen et al., 2016, 2014).

Si se usa un lípido líquido para formar la matriz lipídica o si el principio activo es un líquido a temperatura ambiente y además altamente hidrófobo (por ejemplo, el aceite de pescado rico en ω -3), se formará un NLC en donde la localización del principio activo será dependiente del comportamiento cristalino del lípido sólido, el que a su vez está influenciado por las características de los agentes estabilizantes empleados (Salminen et al., 2016). Por lo tanto, el aceite podrá estar distribuido homogéneamente en la matriz, formando nanocompartimentos líquidos, ubicado sobre la superficie de la partícula o incluso, rodeado por el lípido sólido en una estructura tipo core-shell (Keck et al., 2014a).

Sin embargo, a pesar de los diversos estudios que evidencian la localización del fármaco en alguno de los modelos previamente descritos, todavía no existe consenso sobre cuál describe mejor el arreglo estructural de los sistemas coloidales basados en lípidos y, por el contrario, algunos estudios presentan resultados un poco contradictorios. Tal es el caso de los estudios que emplean como molécula modelo el marcador fluorescente hidrófobo rojo Nilo o la coenzima Q10.

Así, con respecto al rojo Nilo, a partir de mediciones realizadas empleando espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía paeléctrica (Parelectric Spectroscopy, PS) se pudo evidenciar la casi completa incorporación en matrices tanto de gliceril behenato (Compritol® 888 ATO) como de gliceril palmito estearato (Precirol® ATO 5) estabilizadas con P188. Por su parte, en los NLC el rojo Nilo se

distribuye entre nanocompartimentos líquidos y sólidos de la matriz lipídica de acuerdo con la solubilidad que presente en cada una de estas fases (Lombardi Borgia et al., 2005).

Por el contrario, en las SLN preparadas a partir de gliceril behenato y P188 como agente estabilizante y estudiadas mediante espectroscopía de fluorescencia y espectroscopía Raman, el rojo Nilo se localiza sobre la superficie de las partículas evidenciando la expulsión de esta molécula durante el proceso de solidificación y cristalización del lípido formando una estructura de placas. Para los NLC, el lípido líquido crea siempre un segundo compartimento polar de modo que el rojo Nilo se localiza o bien sobre la superficie sólida de la partícula o es acomodado en el compartimento formado por el lípido líquido. Además, a medida que la proporción de aceite aumenta a más del 20 %, la mayoría del marcador se localiza en este compartimento. La localización preferente del rojo Nilo en las SLN y en los NLC explica la baja capacidad de carga en estos sistemas y además el bajo nivel de protección del activo especialmente en las SLN (Jores et al., 2005).

De otro lado, utilizando microscopía de fluorescencia de campo amplio con microscopía confocal, se encontró que el rojo Nilo se distribuye preferentemente sobre la superficie de micropartículas sólidas lipídicas (Solid Lipid Microparticles, SLM) preparadas a partir de eicosano y sales biliares. Cuando se trata de los NLC, el lípido líquido (triglicéridos de cadena media) conteniendo el rojo Nilo, forma dominios rodeados por el lípido sólido, los que se distribuyen en el interior de las partículas, es decir, la adición de un lípido líquido reduce la exclusión del activo encapsulado si se compara con lo observado para las SLN (Tikekar y Nitin, 2012).

Respecto al uso de la coenzima Q10 como molécula modelo para estudiar la localización preferente de fármacos en nanopartículas lipídicas, los resultados obtenidos a través de diferentes investigaciones también parecen ser controversiales. Por ejemplo, para las SLN preparadas a partir de cetil palmitato y Tego Care® 450 (Poliglicerol-metilglucosadiestearato) analizadas mediante RMN en estado sólido, la Coenzima Q10 se distribuyó en dos fracciones diferentes, una proporción mayoritaria del 60 % se encuentra homogéneamente mezclada con el lípido sólido y el 40 % restante forma un dominio separado asociado a la fase sólida de las partículas. La fracción

separada de Q10 puede formar una o múltiples inclusiones en la mezcla cetil palmitato/Q10 o aparecer como una capa alrededor de una esfera homogénea de cetil palmitato/Q10 en un arreglo concéntrico tipo outer-shell como el de la Figura 1-9C (Wissing et al., 2004). Estos resultados contrastan con la localización preferente de la coenzima Q10 en las SLN de tripalmitina estudiadas mediante crio-TEM, XRD y DSC en los que, a bajas concentraciones de Q10 (por debajo del 10 % del total de la fase lipídica), la molécula del activo se localiza en el interior de la estructura cristalina de la matriz lipídica como en el modelo de la Figura 1-8C, mientras que a concentraciones mayores, se encuentra sobre la superficie de la partícula formando una fase líquida subenfriada (Bunjes et al., 2001), confirmando los resultados obtenidos mediante experimentos de $^1\text{H-NMR}$ para la incorporación de la coenzima Q10 en la superficie de las SLN (Westesen et al., 1997).

De acuerdo con lo anterior, la estructura de las partículas de las SNL, los NLC y del sistema coloidal como un todo, sigue siendo motivo de debate. Al menos puede establecerse que la organización estructural de estos nanotransportadores depende de las características de los componentes de la formulación incluyendo la molécula activa, tales como temperaturas de fusión, solubilidad/miscibilidad, carácter lipófilo/hidrófilo, y energía y tipo de red cristalina. Además, también deben considerarse la proporción de los componentes y las condiciones de producción incluyendo cualquier tratamiento térmico o el uso de solventes.

1.6.4 Las SLN y los NLC como sistemas de liberación de moléculas activas

Los factores que afectan la liberación de moléculas activas desde sistemas coloidales basados en lípidos incluyen la temperatura del medio de liberación, la cantidad y localización del fármaco incorporado en las partículas, el tamaño y la forma de las partículas, el arreglo cristalino del fármaco y de los lípidos de la matriz, los agentes estabilizantes, el método de producción de las nanopartículas y el método empleado para evaluar la liberación (Deshpande et al., 2017; Müller et al., 2000). En general, teniendo en cuenta las diferentes estructuras propuestas para las nanopartículas lipídicas, el comportamiento de liberación podría ser descrito de acuerdo con la Figura

1–10. Así, las estructuras en donde el fármaco se incorpora en la superficie de las nanopartículas podrían caracterizarse por comportamientos de liberación inmediata o con un notable efecto de carga (efecto burst). De otro lado, comportamientos sostenidos de liberación solo podrían ser esperados en estructuras en las que el fármaco esté homogéneamente distribuido en la matriz lipídica.

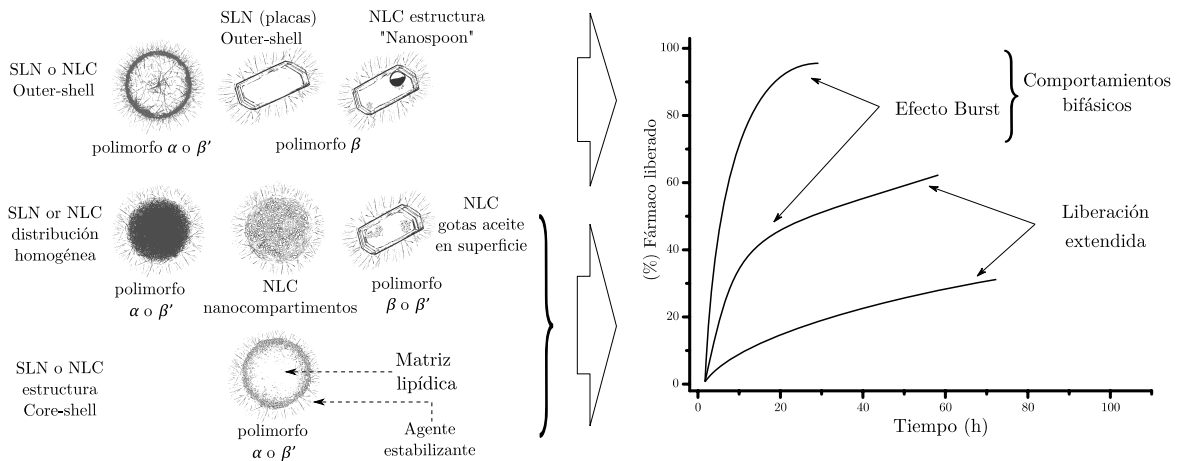


Figura 1–10. Comportamiento de liberación esperado de acuerdo con la estructura de las partículas.

No obstante, resulta interesante encontrar reportes aparentemente contradictorios respecto al desempeño de las SLN y los NLC en ensayos *in vitro* de liberación de activos (Dan, 2014; Zoubari et al., 2017). Por ejemplo, se ha encontrado que la velocidad de liberación de moléculas en las SLN es menor que en los NLC (Guo et al., 2015) y que además, se incrementa con la proporción de lípidos líquidos en la matriz (Das et al., 2012; Guo et al., 2015; Hu et al., 2006, 2005; Miao et al., 2015; Shen et al., 2010; Souto et al., 2004; Tiwari y Pathak, 2011). Sin embargo, otras investigaciones concluyen lo opuesto, es decir, las SLN liberan rápidamente el activo mientras que la liberación desde los NLC disminuye a medida que el contenido de aceite en la matriz lipídica disminuye (Andrade et al., 2014; Islan et al., 2016; Wang et al., 2009; Xu y Lee, 2015; Zheng et al., 2013). De otro lado, en algunas investigaciones se han reportado comportamientos bifásicos con una liberación de carga inicial cuando se investigan SLN (Garg y Singh, 2011; Shah et al., 2014), mientras que en otros trabajos se ha evidenciado un comportamiento de liberación controlada tanto para las SLN (Shah y Pathak, 2010) como para los NLC (Das et al., 2012). Incluso, contrario a las

afirmaciones de algunos autores (Bhatt et al., 2018; Zhong y Zhang, 2019), se han observado velocidades de liberación más lentas en nanoemulsiones comparadas con los otros dos sistemas (Aditya et al., 2014; Liu et al., 2014).

Como lo han evidenciado algunos investigadores, el perfil de liberación de activos a partir de sistemas lipídicos coloidales es influenciado por su composición. Por ejemplo, el ácido ursólico incorporado en NLC fue liberado más lentamente desde matrices lipídicas formadas por lípidos saturados que desde matrices lipídicas formadas por lípidos insaturados (Nahak et al., 2016). También se encontró que la liberación desde NLC del 4-dimetilamino sanciclina modificado (CMT-8, un análogo de la tetraciclina) depende del tipo y la proporción del agente estabilizante empleado, sugiriendo que la interfase de la nanopartícula puede ser usada para controlar las propiedades de transporte (Zhao et al., 2014).

Adicionalmente, los métodos comúnmente empleados para llevar a cabo los estudios de liberación están basados principalmente en el uso de bolsas de diálisis (Aditya et al., 2014; Shah et al., 2014) y celdas de difusión verticales o de Franz (Garg y Singh, 2011; Venkateswarlu y Manjunath, 2004), aunque también se han realizado algunos estudios utilizando el método de paletas descrito por la USP (Güney et al., 2014; Zoubari et al., 2017; zur Mühlen et al., 1998). Esto indica que probablemente las aparentes contradicciones en cuanto al comportamiento de liberación reportado por diferentes estudios también podría ser una consecuencia del método empleado.

De hecho, el empleo de bolsas de diálisis o celdas de difusión de Franz a pesar de ser convenientes para llevar a cabo estudios de liberación, también pueden conducir a perfiles de liberación distorsionados (sostenidos artificialmente) debido a que no proporcionan una dilución adecuada de las nanopartículas. Por el contrario, los experimentos realizados en condiciones más similares a la condición sink, que emplean, por ejemplo, técnicas de filtración, centrifugación o electroquímica *in situ*, indican que la liberación del activo sería muy rápida, y por tanto, el comportamiento de liberación podría ser controlado por procesos de partición y no por la difusión del fármaco a través de la matriz del lípido sólido (Bunjjes, 2010). Por lo tanto, el comportamiento de liberación parece ser más el producto de las diferentes interacciones que puedan establecer las moléculas del activo con las capas interna y externa de la partícula en

función de su estructura y propiedades fisicoquímicas, incluyendo el carácter hidrófobo, el punto de fusión, el tipo de estructura cristalina y la solubilidad en la fase dispersante.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Contribuir al entendimiento del efecto de las propiedades estructurales de la partícula sobre la liberación de moléculas encapsuladas en sistemas lipídicos coloidales tipo nanoemulsión, nanopartícula sólida lipídica y transportador lipídico nanoestructurado.

2.1.1 Objetivos específicos

1. Desarrollar sistemas coloidales tipo emulsión y tipo particulado (SLN, NLC y NE) garantizando la misma composición del sistema y empleando la técnica de emulsificación-difusión como método de preparación.
2. Realizar la caracterización física y estructural de los sistemas lipídicos coloidales obtenidos (SLN, NLC y NE).
3. Investigar el comportamiento de liberación de al menos dos moléculas modelo a partir de los diferentes sistemas lipídicos coloidales desarrollados.

3. Métodos y materiales

Las propiedades de los lípidos dispersos coloidalmente difieren de las observadas en el material a granel debido a su pequeño tamaño. Esto aplica especialmente al comportamiento de fusión, cristalización y a la cinética de las transiciones polimórficas. En estudios previos se demostró que nanopartículas sólidas lipídicas preparadas a partir de trimiristina (Dynasan® 114) y estabilizadas con mezclas de fosfolípidos de soya (Lipoid® S 100) y glicolato de sodio o Tyloxapol®, pueden ser obtenidas en estado sólido o mantenerse en estado líquido subenfriado (Bunjes et al., 1996). Resultados similares fueron descritos para nanopartículas preparadas empleando P188 como agente estabilizante (Noack et al., 2012). Este comportamiento de los triglicéridos dispersos coloidalmente, de formar líquidos fundidos subenfriados con considerable estabilidad cinética, puede ser utilizado para estudiar simultáneamente las diferencias estructurales entre nanoemulsiones, nanopartículas sólidas lipídicas (Bunjes et al., 1996) y transportadores lipídicos nanoestructurados, logrando la misma composición en función de la historia térmica dada a la dispersión.

Así, la presente investigación aprovechó este comportamiento de los triglicéridos para aportar en el entendimiento de la liberación de activos a partir de sistemas coloidales tipo nanoemulsión y tipo nanosuspensión. Para tal fin, la estrategia metodológica buscó en su primera etapa, la obtención de SLN, NLC y NE con la misma composición en el rango submicrométrico. Luego, se estudió la estructura interna de las nanopartículas usando calorimetría diferencial de barrido (DSC), difracción de rayos X (XRD) y espectrometría Raman. Además, también se estudiaron la densidad y la estabilidad frente a la fuerza centrífuga de las dispersiones de lípidos. Igualmente, se investigaron algunas propiedades de superficie de los sistemas lipídicos, entre ellas el comportamiento electrocinético, la concentración del agente estabilizante en la superficie de las nanopartículas, la hidrofobicidad de superficie y la estabilidad frente

a electrolitos. Finalmente, se evaluó el comportamiento de liberación de metil y propilparabeno, seleccionados como moléculas modelo.

A partir del análisis conjunto de los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de estos sistemas lipídicos, se buscó una aproximación a la organización estructural de las nanopartículas lipídicas incluyendo la organización del lípido líquido en los NLC, la localización preferencial de las moléculas atrapadas en SLN, NLC y NE y su relación con el comportamiento de liberación de las moléculas incorporadas en su estructura.

— Preparación de las dispersiones de lípidos

Las dispersiones coloidales con 5 % p/p de fase lipídica fueron preparadas usando el método de emulsificación-difusión de solvente (Quintanar-Guerrero et al., 2005; Trotta et al., 2003) con algunas modificaciones (Figura 3-1). Acetato de etilo (J.T. Baker, USA) y agua ultrapura (Milli pore-Q® Gradient A10™ ultra-pure water system, Millipore, Francia) fueron mutuamente saturados por 30 min a temperatura ambiente bajo agitación vigorosa.

Posteriormente, 2.5 g de lípidos constituidos por trimiristina (MMM, Cremer Oleo GmbH & Co. KG, Alemania), triglicérido caprílico/cáprico (TCC, Labrafac™ Lipophile WL1349, Gattefossé, Cedex, Francia) o una mezcla de ambos según como se especifica en la Tabla 3-1 y 0.125 g de metilparabeno, MP, o propilparabeno, PP (Sigma-Aldrich Chemical Co., Louis, MO) en las dispersiones con parabenos (Tabla 3-1), fueron disueltos en 5 mL de acetato de etilo saturado con agua ($\text{EtAc}_{\text{H}_2\text{O}}$) a 65 °C, en un tubo cónico de 50 mL (BD Falcon™) y después atemperados por 30 min a dicha temperatura para borrar la memoria cristalina de la MMM. Esta fase orgánica fue emulsionada con 10 mL de una solución acuosa de P188 (Pluronic® F68, BASF Corporation, NJ) al 2.5 % p/v con respecto al volumen final de la dispersión, saturada con acetato de etilo ($\text{H}_2\text{O}_{\text{EtAc}}$) y precalentada a la misma temperatura. Para tal fin se empleó un agitador de alta velocidad (UltraTurrax T25 Ika-Werke, Staufen, Alemania) equipado con un rotor-estator S25N-25F de acero inoxidable, trabajando a 12000 rpm durante 5 min.

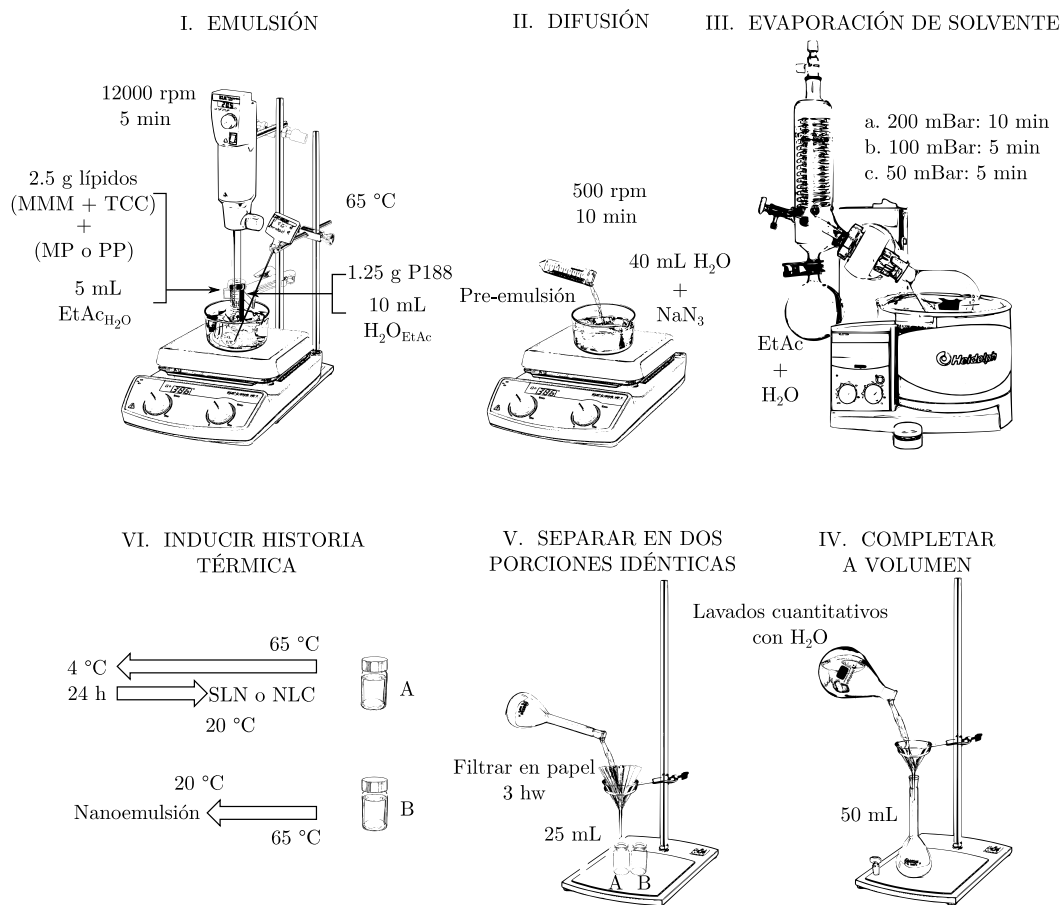


Figura 3–1. Esquema general usado en la preparación de las dispersiones de lípidos.

Las nanopartículas lipídicas fueron formadas mediante la rápida adición de esta pre-emulsión sobre 40 mL de agua conteniendo 20 ppm de azida de sodio (NaN_3) como agente preservante (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) bajo agitación vigorosa (500 rpm) por 10 min (IKA® C-Mag HS 7, Staufen, Alemania) para permitir la difusión del solvente hacia la fase continua.

Posteriormente, el acetato de etilo y parte del agua fueron removidos mediante evaporador rotatorio (Heidolph Hei-VAP, Schwabach, Alemania) trabajando a 65 °C y 200 mBar durante 10 min, 100 mBar durante 5 min y finalmente a 50 mBar durante otros 5 min. La dispersión final se concentró hasta obtener un volumen final de 50.0 mL y se dividió en dos partes iguales pasando la dispersión a través de un filtro de papel 3 hw (Boeco, Hamburgo, Alemania). La primera porción (A: 25 mL) se refrigeró a 4 °C durante al menos 24 h para inducir la solidificación de la mezcla de lípidos y obtener así una nanosuspensión. La segunda porción (B: 25 mL) se dejó

enfriar lentamente hasta alcanzar la temperatura ambiente (20 °C) para mantener la trimiristina en estado de líquido subenfriado y así obtener emulsiones. Transcurrido ese tiempo la dispersión se retiró del refrigerador y se mantuvo a temperatura ambiente para ser analizada en las mismas condiciones que las emulsiones.

Tabla 3-1. Composición de las dispersiones de lípidos.

Composición*	Lípidos (g)		Porcentaje de lípidos (p/p)	
	MMM	TCC	MMM	TCC
1	2.50	0.00	100	0
2	2.25	0.25	90	10
3	2.00	0.50	70	20
4	1.75	0.75	80	30
5	1.50	1.00	60	40
6	1.25	1.25	50	50
7	1.00	1.50	40	60
8	0.75	1.75	30	70
9	0.50	2.00	20	80
10	0.25	2.25	10	90
11	0.00	2.50	0	100

*El volumen final de cada composición fue de 50.0 mL y el porcentaje de P188 se mantuvo en 2.5 % p/v mientras que el porcentaje final de lípidos en la dispersión fue del 5.0 %. En las composiciones con parabenos, el porcentaje de MP o PP fue del 5.0 % respecto a la fase lipídica.

— Caracterización de la distribución del tamaño de partícula

Un estimado del tamaño medio de partícula fue obtenido mediante DLS siguiendo las recomendaciones de la ASTM E2490-09 y la ISO 13321 (ASTM, 2015b; ISO, 1996). Las mediciones fueron realizadas a 25 °C y a un ángulo de dispersión de 173°, usando un láser de helio-neón, $\lambda = 633$ nm (Zetasizer Nano-ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad fueron estimados diluyendo cada dispersión hasta $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ en una solución de NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ o en una solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Los datos se analizaron mediante el método de los cumulantes asumiendo partículas esféricas y los resultados se presentan como el diámetro efectivo (diámetro medio ponderado de la intensidad, Z-Ave) y el índice de polidispersidad (PI) como una medida del ancho relativo de la distribución del tamaño de partícula. Cada valor reportado corresponde al promedio de 5 mediciones sucesivas expresadas

en la intensidad, de 10 series de 10 s cada una después de un tiempo de equilibrio de 180 s entre cada medida.

La densidad (ρ) de la solución de P188 al 2.5 % p/v fue determinada usando un densímetro digital (DMA 45 Anton Paar, Austria) conectado a un baño termostático de recirculación (Nes-lab RTE 10 Digital One Thermo Electron Company, USA) a 25 °C. La viscosidad cinemática (ν) fue determinada a 25 °C conforme a la ASTM D445-17a (ASTM, 2017) utilizando un viscosímetro cinemático capilar de vidrio previamente calibrado (Size No. 100, T219, Cannon Instrument Company, State College, PA) en un baño termostático de agua con sistema de calentamiento (Koehler Instrument Company, Inc., Bohemia, NY).

El índice de refracción de la solución de P188 al 2.5 % p/v a 25 °C se determinó mediante un refractómetro digital portátil (Refracto 30PX, Mettler-Toledo GmbH., Suiza). La constante dieléctrica (ϵ_r) se asumió igual a la del agua en ambos medios de dilución. Todas las medidas fueron hechas al menos por triplicado.

3.1.1 Características de la estructura interna de las nanopartículas

— Comportamiento térmico de mezclas binarias entre MMM y TCC

Para estimar la solubilidad mutua entre MMM y TCC, cantidades entre 0.45 g a 0.05 g de MMM fueron mezcladas con 0.05 g a 0.45 g de TCC con el objeto de variar la proporción de componentes cada 10 %. Las mezclas fueron fundidas a 65 °C durante 2 h para borrar la memoria cristalina del lípido sólido. Al cabo de 24 h se verificó visualmente la separación de fases.

— Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Los análisis térmicos fueron realizados bajo atmósfera de nitrógeno a un flujo constante de $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ en un equipo previamente calibrado con indio y zinc (HP-DSC 2, Mettler-Toledo Intl. Inc. Columbus, OH) y empleando un crisol vacío como referencia. En crisoles de aluminio (Mettler-Toledo Intl. Inc. Columbus, OH) se pesaron exactamente entre 15 mg y 30 mg de las mezclas del apartado anterior y

se sellaron herméticamente. Las muestras fueron calentadas desde 20 °C hasta 70 °C a una velocidad de 5 °C · min⁻¹ e inmediatamente después se enfriaron desde 70 °C hasta -25 °C a 5 °C · min⁻¹.

Para investigar las dispersiones de lípidos, se pesaron exactamente 37 µL de cada dispersión en crisoles de aluminio de 40 µL de capacidad y se sellaron herméticamente. Las muestras fueron calentadas desde 20 °C hasta 70 °C a una velocidad de 5 °C · min⁻¹ e inmediatamente después se enfriaron desde 70 °C hasta -20 °C a 5 °C · min⁻¹.

Para el análisis térmico a alta presión (HP-DSC), se pesaron exactamente 37 µL de las dispersiones de lípidos en crisoles de aluminio de 40 µL de capacidad y una vez sellados se les abrió un pequeño agujero en la parte superior de la tapa para evitar pérdidas significativas de agua y permitir que el contenido interno del crisol fuese presurizado. Las muestras fueron calentadas desde 25 °C hasta 140 °C a 5 °C · min⁻¹ e inmediatamente después se enfriaron desde 140 °C hasta 20 °C a 5 °C · min⁻¹, manteniendo la presión de la cámara a 3.45 MPa (500 psi) con nitrógeno para evitar la ebullición de la fase acuosa en la dispersión. El equipo fue previamente calibrado con indio y zinc (DSC 1, Mettler-Toledo Intl. Inc. Columbus, OH) y se usó un crisol vacío como referencia. Una vez terminado el análisis, la masa del crisol fue nuevamente determinada para calcular la pérdida de agua por evaporación. Para el análisis de los termogramas se usó el software de evaluación STARe v.16 (Mettler Toledo GmbH, Giessen, Alemania).

— Difracción de Rayos X (XRD)

La estructura cristalina de las dispersiones de lípidos y de los materiales de partida fue analizada por difracción de rayos X en un difractómetro PANalytical Empyrean (Panalytical B.V., Almelo, Países Bajos) en geometría de transmisión.

Para analizar las dispersiones de lípidos en medio acuoso, entre 40 µL y 50 µL de las muestras fueron cargados en tubos capilares circulares de vidrio boro silicato (1 mm de diámetro y espesor de pared de 0.01 mm Hilgenberg, Malsfeld, Alemania). Para analizar las dispersiones de lípidos en estado sólido, en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf® Safe-Lock, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se colocaron 1500 µL

de la dispersión de nanopartículas y el tubo se sumergió en nitrógeno líquido durante 5 min. Posteriormente, las dispersiones congeladas fueron liofilizadas durante 24 h a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 10 Pa (FreezeMobile 25 EL, VirTis., Pensilvania, SP), el polvo resultante se colocó entre dos películas de 6 μm de espesor de tereftalato de polietileno (Mylar®, Goodfellow, Reino Unido). La trimiristina, el metilparabeno, el propilparabeno y el P188 fueron analizados de la misma forma.

Para obtener los patrones de difracción se empleó radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1.540598\text{ \AA}$) operando a 45 kV y 40 mA con un detector de estado sólido PIXcel^{3D} (Panalitycal B.V., Almelo, Países Bajos) en el rango 2θ desde 3° hasta 78° con una distancia de paso de 0.0131303 [$^{\circ}2\theta$] y 23.97 s por paso en modo de barrido continuo. Las dispersiones de fondo tanto del capilar como de la película de Mylar® se restaron del patrón de cada muestra antes de llevar a cabo el análisis de los datos. Los patrones de difracción fueron analizados con la ayuda del software HighScore Plus, versión 3.0e.

— Espectroscopía Raman

Los espectros Raman fueron obtenidos en un espectrómetro Raman modular iHR-320 equipado con un detector CCD Synapse® TE (Horiba Jobin-Yvon, Japón) para registrar la radiación dispersada y un microscopio invertido (Nikon Eclipse TiU, Japón). Se usó un láser de diodo de onda continua (Innovative Photonics Solutions, Monmouth Junction, NJ) con una longitud de onda de 785 nm como fuente para iluminar la muestra de nanopartículas previamente liofilizada y esparcida sobre una placa de vidrio de borosilicato. La muestra se montó en la platina del microscopio y se utilizó un objetivo de $10\times$ con lente convergente para enfocar el rayo láser y registrar los espectros Raman. El rango de barrido espectral fue de 200 cm^{-1} hasta 3500 cm^{-1} con una resolución de 0.838 cm^{-1} , un tiempo de adquisición de 10 s y una acumulación ajustada en 10. Los espectros Raman fueron analizados con la ayuda del software LabSpec 6 (Horiba Scientific, Japón).

— Microscopía electrónica

Para la observación de la morfología de las partículas, las dispersiones lipídicas se diluyeron 10 veces en agua desionizada y posteriormente 5 μL de la dispersión diluida

se depositaron sobre una rejilla de cobre tipo Formvar/Carbon de malla—200 para la observación por STEM o sobre una rejilla de cobre tipo Lacey Formvar/Carbon malla—200 para la observación por TEM y se permitió que las nanopartículas se adsorbieran durante dos minutos en el soporte de carbón. Inmediatamente después, se eliminó el exceso de la dispersión mediante el uso de un papel de filtro, luego se añadió una gota de ácido fosfotúngstico al 2 % para teñir las partículas negativamente durante dos minutos y se eliminó el exceso de ácido con la ayuda de un papel de filtro. Finalmente, las rejillas se secaron a temperatura ambiente en desecador durante toda la noche. Para las observaciones por TEM las muestras fueron transferidas a un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución JEOL 2010F TEM (Peabody, MA, USA) operando a un voltaje de aceleración de 200 keV en condiciones de baja dosis (manteniendo la densidad de corriente en 0.3 pA cm^{-2}). Para las observaciones por STEM las muestras fueron transferidas a un microscopio Hitachi S-5500 SEM operando a 10 keV en campo brillante (Hitachi High Technologies Corporation, Japón).

3.1.2 Características de superficie

— Determinación del comportamiento electrocinético de las dispersiones

El potencial ζ fue estimado diluyendo cada dispersión hasta $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y ajustando la conductividad en $50 \text{ mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ en una solución de NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ o en una solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Las medidas fueron hechas a 25 °C en un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, U.K.), usando celdas capilares plegadas DTS 1070 y trabajando en modo automático conforme a la ISO 13099-2 y ASTM E2865-12 (ASTM, 2018; ISO, 2012). El número de medidas se ajustó en 5 para cada dilución con 10 corridas y un tiempo de retraso establecido en 180 s entre cada medida para evitar el calentamiento de Joule y la posible degradación de la muestra. El pH para cada dilución fue medido inmediatamente después, usando un potenciómetro Orion Star A211 (Thermo Scientific, Beverly, MA).

La configuración del instrumento y de la celda DTS 1070 fue verificada utilizando un material de referencia certificado secundario de ~ 300 nm de látex de poliestireno en un tampón de pH 9.2 con un potencial ζ de -42 ± 4.2 mV (DTS1235, lote 411209, Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK).

— Densidad y estabilidad de las dispersiones de lípidos frente a la fuerza centrífuga

La densidad (ρ) de las dispersiones de lípidos sin la adición de activo fue determinada por triplicado a 25 °C, usando un densímetro digital (DMA 45 Anton Paar, Austria) conectado a un baño termostático de recirculación (Nes-lab RTE 10 Digital One Thermo Electron Company, USA). El comportamiento de las dispersiones bajo fuerza centrífuga se investigó sobre 1.0 mL de cada dispersión sin activo a 25000 rcf durante 120 min, manteniendo la temperatura a 20 °C (Centrífuga Heraeus Megafuge, Thermo Scientific, Massachusetts, USA).

— Determinación de la concentración de P188 en la fase acuosa y en la superficie de las partículas

La cantidad de P188 presente en la fase acuosa y en la superficie de las nanosuspensiones y de las nanoemulsiones se determinó investigando por colorimetría la formación de un complejo entre el P188 y el tiocianato de cobalto (Ghebeh et al., 1998). Para separar la fase acuosa de las nanopartículas lipídicas se utilizó la técnica de ultrafiltración/centrifugación usando filtros de membrana de celulosa regenerada con un corte de peso molecular nominal de 50 KDa (Amicon® Ultra, Ultra cell-50k, Millipore, USA). Sobre el filtro de ultrafiltración (Figura 3-2) se dispuso un volumen de 400 μ L de la dispersión conteniendo parabenos y se centrifugó a 20000 rcf (Hermle Z216, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen) durante 30 min. El filtrado se empleó para cuantificar la cantidad de P188 en la fase acuosa, mientras que el material retenido fue recuperado mediante la inversión del filtro y posterior centrifugación a 20000 rcf durante 30 min para cuantificar la cantidad de P188 adsorbido por las nanopartículas (nanosuspensiones y nanoemulsiones).

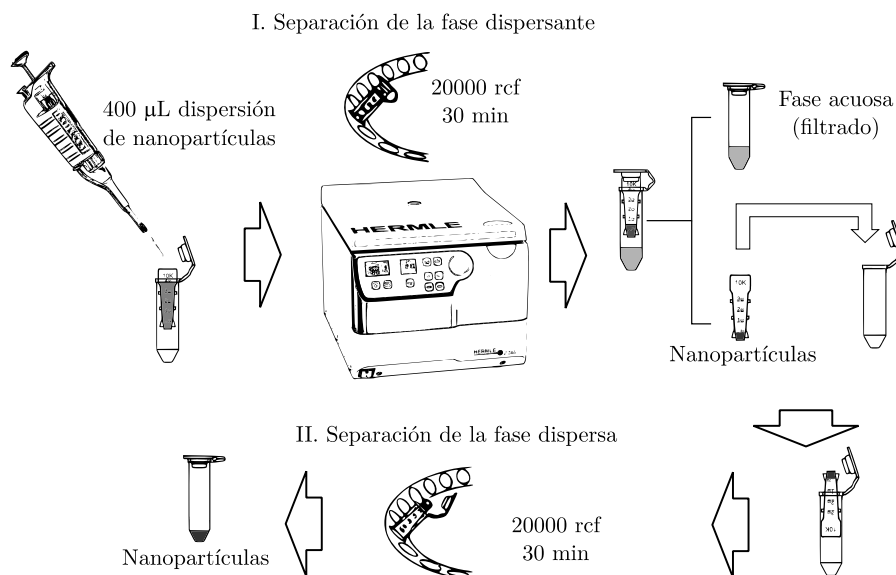


Figura 3-2. Esquema general para separación de las fases en dispersiones de lípidos mediante ultrafiltración.

Posteriormente, en un tubo de microcentrifuga de 1500 μL (Eppendorf® Safe-Lock, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se adicionaron 100 μL del filtrado de la fase acuosa, 200 μL de acetato de etilo y 100 μL del reactivo cobaltotiocianato de amonio, (ACTC) preparado a partir de 0.3 g de nitrato de cobalto hexahidrato ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y 2 g de tiocianato de amonio (JT Baker, New Jersey, PA) en 10 mL de agua purificada. La mezcla fue agitada por 1 min en un mezclador de vórtice (LB PRO MX-S, Lab Brands, Tenjo, Colombia) y se centrifugó a 14000 rcf (Hermle Z216, Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen) durante 10 min para separar totalmente el complejo $\text{Co}(\text{SCN})_2\text{-P188}$. Las dos fases líquidas superiores (una acuosa casi incolora y otra orgánica de color azul) fueron removidas con la ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio (Figura 3-3).

El complejo en forma de una gota de apariencia aceitosa de color azul oscuro fue lavado con 400 μL de acetato de etilo varias veces hasta que el solvente se volvió incoloro teniendo cuidado de no perturbar el complejo. Posteriormente, el complejo fue disuelto en 1000 μL de acetonitrilo (LiChrosolv®, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) y se midió la absorbancia a 624.8 nm usando acetonitrilo como blanco, en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La cantidad de P188 fue calculada usando una curva estándar de P188 desde 0.083 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta 0.83 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, preparada con volúmenes desde 5 μL hasta 50 μL de una solución de

P188 al 2.5 % p/v y se siguió el mismo procedimiento previamente descrito, salvo que el complejo formado fue diluido en 1500 μL de acetonitrilo antes de hacer la lectura.

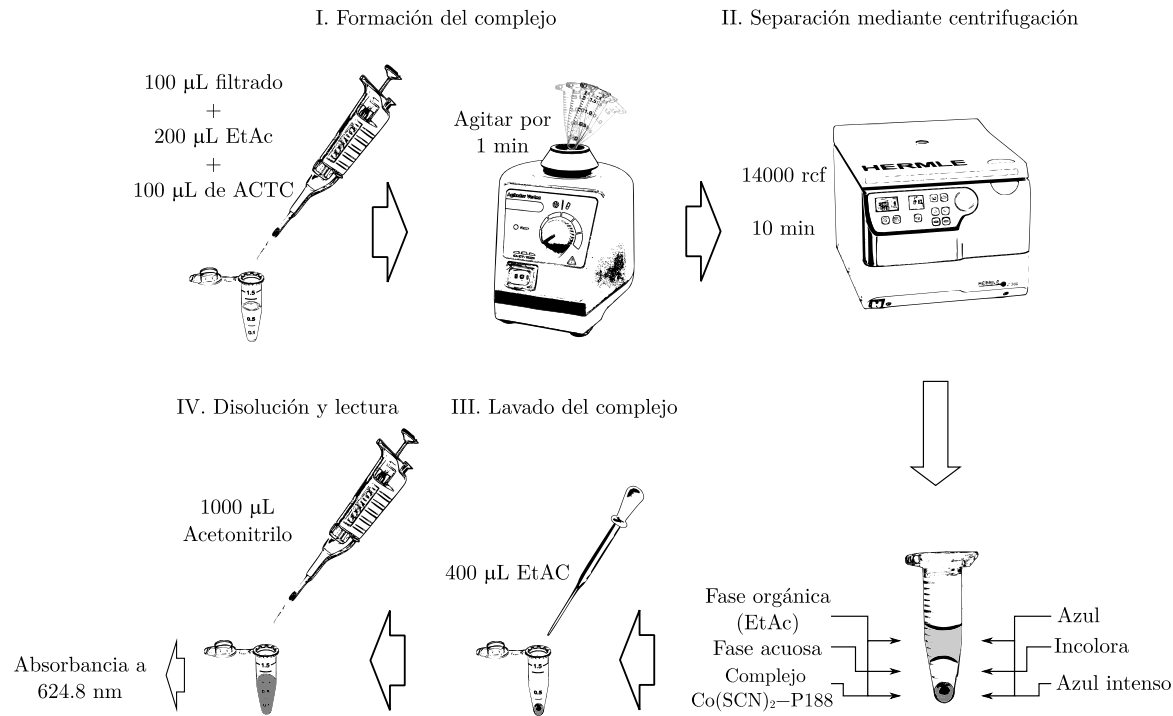


Figura 3-3. Cuantificación por espectrofotometría en el visible del P188.

Para determinar la cantidad de P188 en la fase orgánica, sobre el sedimento recuperado luego de la ultrafiltración/centrifugación de las dispersiones de lípidos se adicionaron 200 μL de EtAc y esta mezcla se calentó en baño María a 40 $^{\circ}\text{C}$ hasta disolver los lípidos. Posteriormente, se adicionaron 200 μL de agua y 100 μL del reactivo ACTC y se continuó con el procedimiento mencionado anteriormente para la cuantificación del complejo $\text{Co}(\text{SCN})_2\text{-P188}$ (Figura 3-3) hasta la etapa de lavado (etapa III). El complejo formado se disolvió en 1500 μL de acetonitrilo y después se hizo una dilución de 1:10 en acetonitrilo antes de la lectura a 624.8 nm.

Finalmente, para determinar la cantidad total de P188, a 25 μL de cada dispersión se les adicionaron 100 μL de EtAc y 25 μL del reactivo ACTC y se siguió el procedimiento descrito para la cuantificación del complejo $\text{Co}(\text{SCN})_2\text{-P188}$ hasta la etapa III. El complejo formado se disolvió en 1500 μL de acetonitrilo y se registró la absorbancia a 624.8 nm.

A diferencia del método original planteado por Ghebeh et al., 1998, en esta investigación no se empleó etanol porque el complejo entre el P188 y el tiocianato de cobalto es soluble en este solvente y podría reducir los porcentajes de recuperación. Tampoco se utilizó acetona para disolver el complejo para evitar las interferencias que se podrían presentar durante la medición debido a la elevada volatilidad del solvente. Adicionalmente, se incrementó el tiempo de centrifugación para que todo el complejo formado pudiese ser recuperado. Cada determinación fue hecha al menos por duplicado.

— Agregación inducida por electrolitos

Para determinar el comportamiento de agregación inducido por electrolitos de las dispersiones sin incorporación de parabenos se usó la prueba de floculación inducida por electrolitos (Lin et al., 1994; Subramanian y Murthy, 2004). Así, en viales de vidrio de 5 mL se prepararon soluciones de sulfato de sodio (Na_2SO_4 ACS Reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) entre $0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y $1.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ en sacarosa al 16.7 % (p/v) ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ BioXtra, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a las que se les adicionaron 20 μL de cada dispersión de nanopartículas para obtener una concentración de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabla 3-2).

Tabla 3-2. Determinación de la estabilidad estérica inducida por electrolitos.

Na_2SO_4 (mL)*	Agua desionizada (mL)	Concentración Na_2SO_4 (M)
0	2.5	0
0.25	2.25	0.15
0.50	2.0	0.30
0.75	1.75	0.45
1.0	1.50	0.60
1.25	1.25	0.75
1.50	1.0	0.90
1.75	0.75	1.05

*La concentración de la solución madre de Na_2SO_4 fue de 1.5 M. La concentración de nanopartículas se mantuvo constante en $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. El blanco para cada punto de lectura correspondió a la dilución de sulfato de sodio sin la adición de muestra.

Las dispersiones resultantes se agitaron manualmente y la turbidez óptica fue inmediatamente medida a 600 nm en un espectrofotómetro UV–Vis (Evolution 220,

Waltham, MA USA) contra el respectivo blanco. Cada punto del ensayo se determinó por triplicado para cada dispersión.

— Determinación de la hidrofobicidad de superficie

La adsorción diferencial de moléculas hidrófobas o hidrófilas, empleando colorantes como azul de Nilo (NB) y rosa de Bengala (RB), pueden ser usados para la determinación de la hidrofobicidad de superficie. Asumiendo que la absorbancia (Abs) es aditiva, es posible determinar la cantidad adsorbida de una molécula de colorante en una dispersión de nanopartículas si se considera que la Abs_{max} es la suma de la absorbancia de las nanopartículas lipídicas, Abs_{NL} y la absorbancia del colorante en solución, $Abs_{RB/NB}$ (Doktorovova et al., 2012). Para el ensayo de adsorción de colorantes, cantidades crecientes de las dispersiones de lípidos entre $1.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $13.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ fueron mezcladas con una solución acuosa de rosa de Bengala o de azul de Nilo (Acros Organics, Geel, Bélgica) a una concentración constante de $20 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en frascos de vidrio de 5 mL para el rosa de Bengala o en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL para el azul de Nilo (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Determinación de la hidrofobicidad de superficie.

Blancos			Muestras*				
NP (μL)	Agua (μL)	Cantidad de NP (mg)	NP (μL)	RB/NB (μL)	Agua (μL)	Cantidad de NPs (mg)	Concentración RB/NB ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	1500	0	0	500	1000	0	20
5	1495	0.25	5	500	995	0.25	20
10	1490	0.50	10	500	990	0.50	20
15	1485	0.75	15	500	985	0.75	20
20	1480	1.0	20	500	980	1.00	20
25	1475	1.25	25	500	975	1.25	20
30	1470	1.50	30	500	970	1.50	20

*Al espectro de cada muestra a la derecha de la tabla se le debe restar el espectro de su blanco respectivo a la izquierda de la tabla.

Todas las muestras fueron incubadas a $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ durante 3 h y se registró la absorbancia entre 700 nm y 400 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La absorbancia registrada se corrigió restando la absorbancia de las dispersiones de

lípidos con la misma cantidad que la utilizada en el experimento sin la adición del colorante (blanco).

La cantidad de colorantes adsorbida sobre la superficie de las nanopartículas fue calculada usando una curva estándar desde $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ hasta $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, la que fue preparada a partir de la dilución de una solución estándar de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada colorante. En frascos de vidrio de 5 mL para el rosa de Bengala y en tubos para microcentrífuga de 1500 μL para el azul de Nilo, se mezclaron volúmenes desde 100 μL hasta 1000 μL de la solución estándar de colorante con agua desionizada para completar 1500 μL y para cada dilución se registró la absorbancia entre 700 nm a 400 nm.

3.1.3 Comportamiento de las nanopartículas lipídicas como sistemas de entrega de moléculas

— Determinación de la capacidad de carga y de la eficiencia de encapsulación

Antes de llevar a cabo la cuantificación del porcentaje incorporado de parabenos en las nanopartículas, se llevó a cabo un ensayo colorimétrico basado en la formación de un complejo de color violeta entre el FeCl_3 y las moléculas de parabenos. Para llevar a cabo el ensayo 2 mL de las dispersiones lipídicas se colocaron en tubos de ensayo de 5 mL y se les adicionaron 50 μL de una solución acuosa de FeCl_3 al 1 %, se agitó levemente la mezcla para homogeneizar el contenido y permitir que se desarrolle la reacción. Como control, el ensayo se realizó sobre soluciones acuosas de metilparabeno y propilparabeno y sobre dispersiones sin la incorporación de parabenos.

Para cuantificar la cantidad de parabenos incorporado en las nanopartículas (nanoemulsiones y nanosuspensiones) así como la cantidad libre en el medio dispersante, se empleó el método de ultrafiltración/centrifugación (Lv et al., 2018). Para separar la fase acuosa de las nanopartículas lipídicas se usaron filtros de membrana de celulosa regenerada con un corte de peso molecular nominal de 50 KDa (Amicon® Ultra, Ultra cell-50k, Millipore, USA). Sobre el filtro de ultrafiltración (Figura 3-2) se dispuso un volumen de 400 μL de la cada dispersión lipídica y se centrifugó a 20000 rcf (Hermle Z216, Hermle Labor Technik GmbH, Wehingen) durante

30 min. Para la cuantificación de la cantidad de parabenos en la fase acuosa, se tomaron 10 μL del filtrado resultante, se adicionaron 990 μL de agua desionizada y se registró la absorbancia a 255.2 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón) contra un blanco preparado del mismo modo a partir de nanopartículas sin parabenos para corregir los efectos de la matriz.

Para cuantificar la cantidad total de parabenos en las dispersiones, en un tubo para microcentrífuga (Eppendorf® Safe-Lock, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) se colocaron 100 μL de la dispersión lipídica y lentamente se adicionaron 200 μL de una mezcla cosolvente 1:1 de metanol (MetOH): Diclorometano (DCM); todo el contenido se agitó durante 5 min en un mezclador de vórtice a 500 rpm aproximadamente (LB PRO MX-S, Lab Brands, Tenjo, Colombia) para disolver completamente las nanopartículas permitiendo liberar los parabenos atrapados por los lípidos de la matriz. Durante este paso, se apreció la transferencia de las nanopartículas desde la fase acuosa (capa inferior) a la fase orgánica (capa superior) hasta que se presentó la completa inversión las fases debido a la mayor densidad del diclorometano. Además, ambas fases se vieron completamente traslúcidas (Figura 3-4).

Posteriormente, se adicionaron 700 μL de acetonitrilo para precipitar abruptamente la trimiristina mientras que los parabenos permanecieron en solución. La muestra se centrifugó a 10000 rcf durante 5 min para separar completamente los sólidos del líquido. Finalmente, se tomaron 50 μL del sobrenadante, se adicionaron 950 μL de agua desionizada y se registró la absorbancia a 255.2 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón) contra un blanco preparado del mismo modo a partir de nanopartículas sin parabenos, para corregir el efecto de la matriz.

La cuantificación de los parabenos se llevó a cabo contra una curva de calibración desde $0.00016 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta $0.012 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ previamente estandarizada (Anexo D.2). Cada ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada dispersión considerada en el estudio.

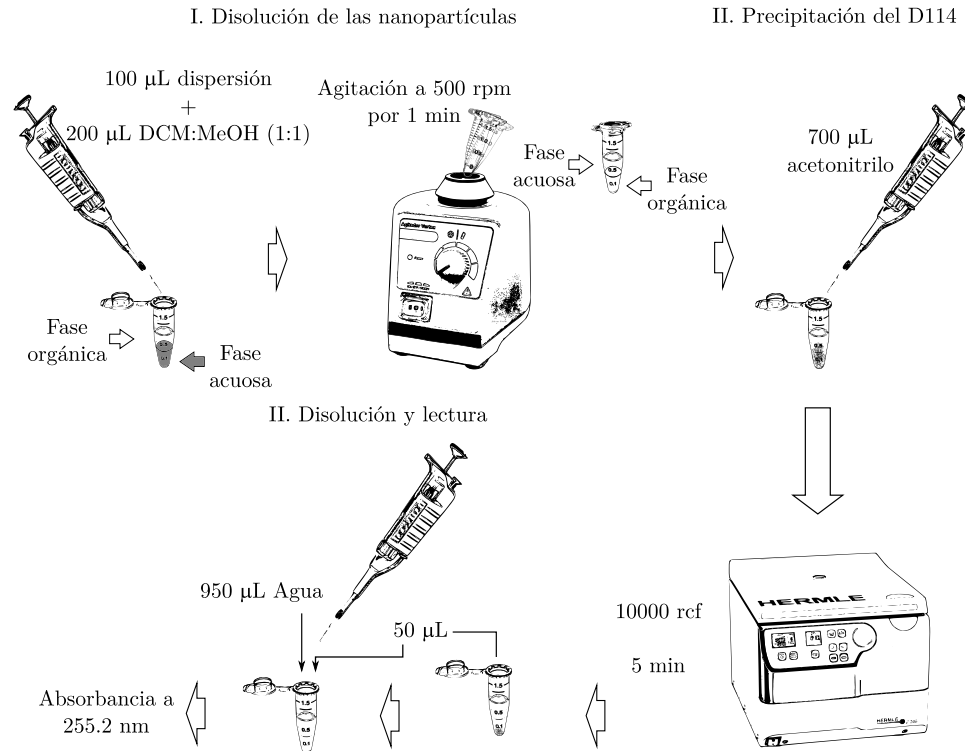


Figura 3–4. Esquema general para la cuantificación del contenido total de parabenos en las dispersiones de los sistemas lipídicos.

— Evaluación del comportamiento de liberación de los parabenos incorporados en las dispersiones de lípidos

Para determinar el comportamiento de liberación de las dispersiones de lípidos se empleó el método de ultrafiltración/centrifugación (Figura 3–5). En un vial de vidrio se adicionaron 9.9 mL de agua desionizada y se llevó a un baño María mantenido a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, bajo agitación constante de 100 rpm (IKA® C-Mag HS 7, Staufen, Alemania). Una vez alcanzado el equilibrio térmico, se adicionaron 100 μL de la dispersión de nanopartículas al vial y se inició la toma de alícuotas de 500 μL reemplazando el volumen muestreado con un volumen equivalente del medio de liberación mantenido a la misma temperatura. La alícuota de muestra se puso sobre un filtro de membrana de celulosa regenerada con un corte de peso molecular nominal de 50 KDa (Amicon® Ultra, Ultra cell-50k, Millipore, USA) y se centrifugó a 14000 rcf durante 10 min. A 200 μL del filtrado resultante se le adicionaron 500 μL de agua destilada y se cuantificó la cantidad de parabenos liberado por cada uno de los

sistemas lipídicos investigados. La toma de muestras se llevó a cabo en cinco ocasiones durante 24 h (1 h, 3 h, 6 h, 12 h y 24 h) y se registró la absorbancia a 255.2 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón). La cuantificación de la cantidad liberada en cada uno de los tiempos de muestreo se realizó siguiendo la metodología analítica previamente estandarizada y empleada para cuantificar los parabenos en los ensayos de determinación de la capacidad de carga y eficiencia de incorporación. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado para cada dispersión considerada en el estudio.

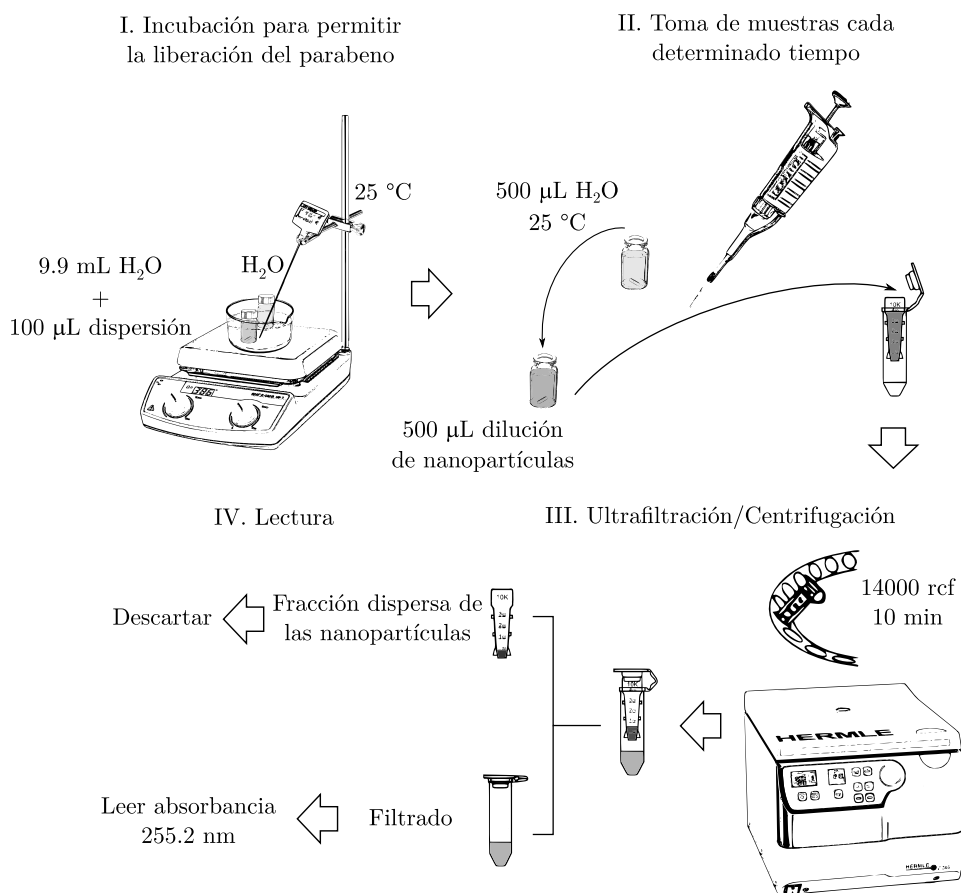


Figura 3–5. Esquema general para la determinación del comportamiento de liberación de parabenos a partir de los sistemas lipídicos investigados.

— Ensayo de compatibilidad entre el P188 y los parabenos

La evaluación de la compatibilidad de los parabenos con el P188 se llevó a cabo mediante un ensayo espectrofotométrico. En un primer ensayo, la concentración de parabenos se incrementó progresivamente mientras la concentración de P188 se

mantuvo constante. Para ello, en balones aforados de 10.0 mL se adicionaron volúmenes entre 0.5 mL y 3.0 mL de una solución $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de metil o propilparaneno y 5.0 mL de una solución de P188 al 5 % p/v. En un segundo ensayo, la cantidad de parabenos se mantuvo constante (0.5 mL de una solución de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de metil o propilparabenos) mientras se incrementaba la concentración de P188 (volúmenes variables entre 0.5 mL y 3.0 mL de una solución de P188 al 2.5 % p/v). Posteriormente se registró la absorbancia a 255.2 nm de cada solución contra el blanco apropiado (Tabla 3-4). El mismo ensayo se repitió usando Polisorbato 20 (Tween® 20, T20, Panreac Química SLU, España) como control positivo en las mismas condiciones y se registró la absorbancia de una curva de parabenos preparada en agua desde $2 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta $12 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Tabla 3-4. Determinación de la compatibilidad entre los parabenos y el P188.

*Concentración de tensioactivo constante				*Concentración de parabenos constante				Curva de MP/PP	
MP/PP mL	MP/PP $\mu\text{g}/\text{mL}$	P188/T20 mL	P188/T20 % p/v	MP/PP mL	MP/PP $\mu\text{g}/\text{mL}$	P188/T20 mL	P188/T20 % p/v	MP/PP mL	MP/PP $\mu\text{g}/\text{mL}$
0	0	5	2.5	0	0	0	0	0	0
0.5	2	5	2.5	0.5	2	1.0	0.5	0.5	2
1.0	4	5	2.5	0.5	2	2.0	1.0	1.0	4
1.5	6	5	2.5	0.5	2	3.0	1.5	1.5	6
2.0	8	5	2.5	0.5	2	4.0	2.0	2.0	8
2.5	10	5	2.5	0.5	2	5.0	2.5	2.5	10
3.0	12	5	2.5	0.5	2	6.0	3.0	3.0	12

*El volumen se completó a 10.0 mL para cada muestra estudiada.

— Solubilidad de los parabenos en TCC

Para estimar la solubilidad de los parabenos (metil y propilparabenos) en TCC, en viales de vidrio de 5 mL, se pesaron desde 25 mg hasta 800 mg de cada parabenos y se adicionaron 2 mL de TCC. Los viales se llevaron a 40 °C durante 20 min para disolver los parabenos en el aceite. Posteriormente, las muestras se mantuvieron a 20 °C durante 5 días para permitir el equilibrio de solubilidad de los parabenos en el aceite. Finalmente, 5 μL del TCC saturado con el parabenos se llevó a volumen de 10 mL con acetonitrilo y se registró la absorbancia a 255.2 nm en un espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Kyoto, Japón) contra un blanco preparado usando la misma cantidad de TCC que la alícuota de lectura.

4. Resultados y discusión

4.1 Preparación de sistemas coloidales basados en lípidos

El desarrollo de cualquier sistema de entrega de fármacos enfrenta varios desafíos, entre ellos, ser biocompatible, alcanzar el sitio de acción, que a menudo está lejos del sitio de administración, y permanecer en el sitio de acción hasta liberar el fármaco preferiblemente de manera controlada para reducir los efectos adversos y asegurar la biocompatibilidad. Igualmente, es sabido que el aumento del área de contacto del sistema de entrega con el medio biológico permite, por ejemplo, modular la cinética de liberación (Gaumet et al., 2008). En este sentido, el uso de partículas en el rango submicrométrico tales como las partículas lipídicas resultan de gran interés.

Por lo tanto, su tamaño y distribución de tamaños (polidispersidad) son quizá los parámetros más importantes para considerar en su caracterización inicial, puesto que permiten conocer el rango de tamaños las partículas y de ese modo clasificarlas bien sea como micropartículas o como nanopartículas. Además, estos parámetros son un punto de partida para relacionar el efecto de variables asociadas a los componentes de la formulación y al método de preparación seleccionado, con la formación de las partículas. De otro lado, la forma de las partículas y otros factores tales como la química de superficie y la carga de activo, pueden afectar su biodistribución, su cinética de liberación, su habilidad para permear a través de un tejido y su mecanismo y velocidad de captación celular (Lu et al., 2009; Salatin et al., 2015).

De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo investigó el impacto de la proporción de lípido líquido y de las condiciones de preparación de los sistemas lipídicos, en especial el enfriamiento, sobre el tamaño de partícula en sistemas coloidales basados en lípidos. El valor estimado del tamaño medio partícula ($Z-Ave$) y del índice de

polidispersidad (PI) obtenido a través de DLS para las dispersiones de la Tabla 3-1, almacenadas durante dos años, se muestra en la Figura 4-1 para las dispersiones enfriadas a 20 °C como se mencionó en la metodología, y en la Figura 4-2 para las dispersiones enfriadas a 4 °C durante 24 h.

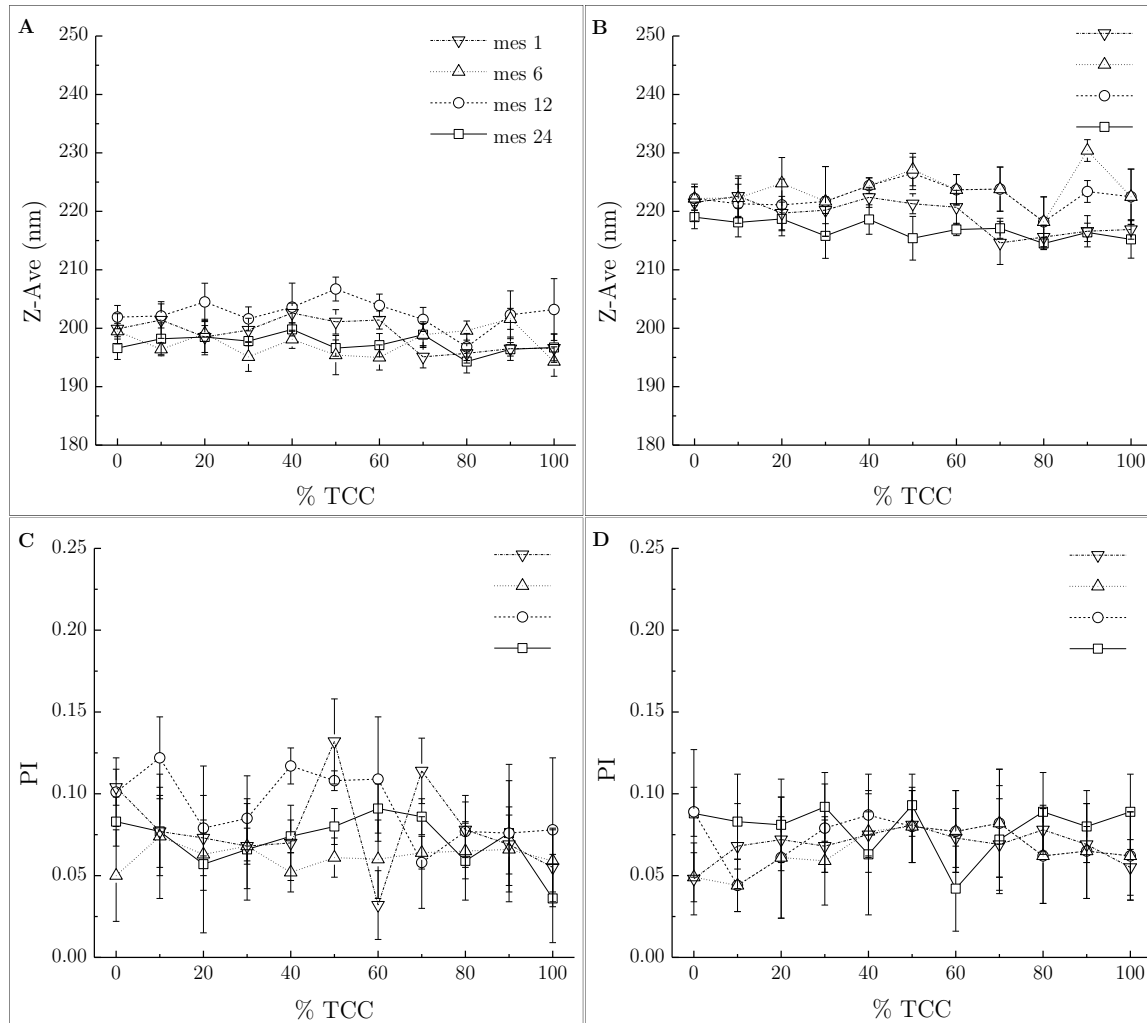


Figura 4-1. Comportamiento del tamaño partícula y del PI para las dispersiones enfriadas a 20 °C. El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad fueron estimados mediante la dilución de $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de la dispersión en una solución de $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (A y C) o en una solución de P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (B y D), (promedio \pm S.D., $n = 5$).

Para llevar a cabo las determinaciones del tamaño de partícula, la viscosidad y el índice de refracción se asumieron iguales a los del agua para la solución de $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (0.8872 $\text{mPa} \cdot \text{s}$ y 1.330, respectivamente). La viscosidad para la solución de P188 al 2.5 % p/v (1.2796 $\text{mPa} \cdot \text{s}$) fue calculada multiplicando la

viscosidad cinemática, ν , y la densidad, ρ , por medio de la ecuación $\eta = \nu \times \rho \times 10^{-3}$, tanto la densidad como la viscosidad están de acuerdo con los valores reportados en la literatura (Q. Liu et al., 2011), ver Anexo A. Como se observa en las Figuras 4-1 y 4-2, en todas las dispersiones preparadas el tamaño medio de partícula ($Z\text{-Ave}$) se mantuvo en el rango submicrométrico, con bajos índices de polidispersidad y sin cambios significativos durante el almacenamiento.

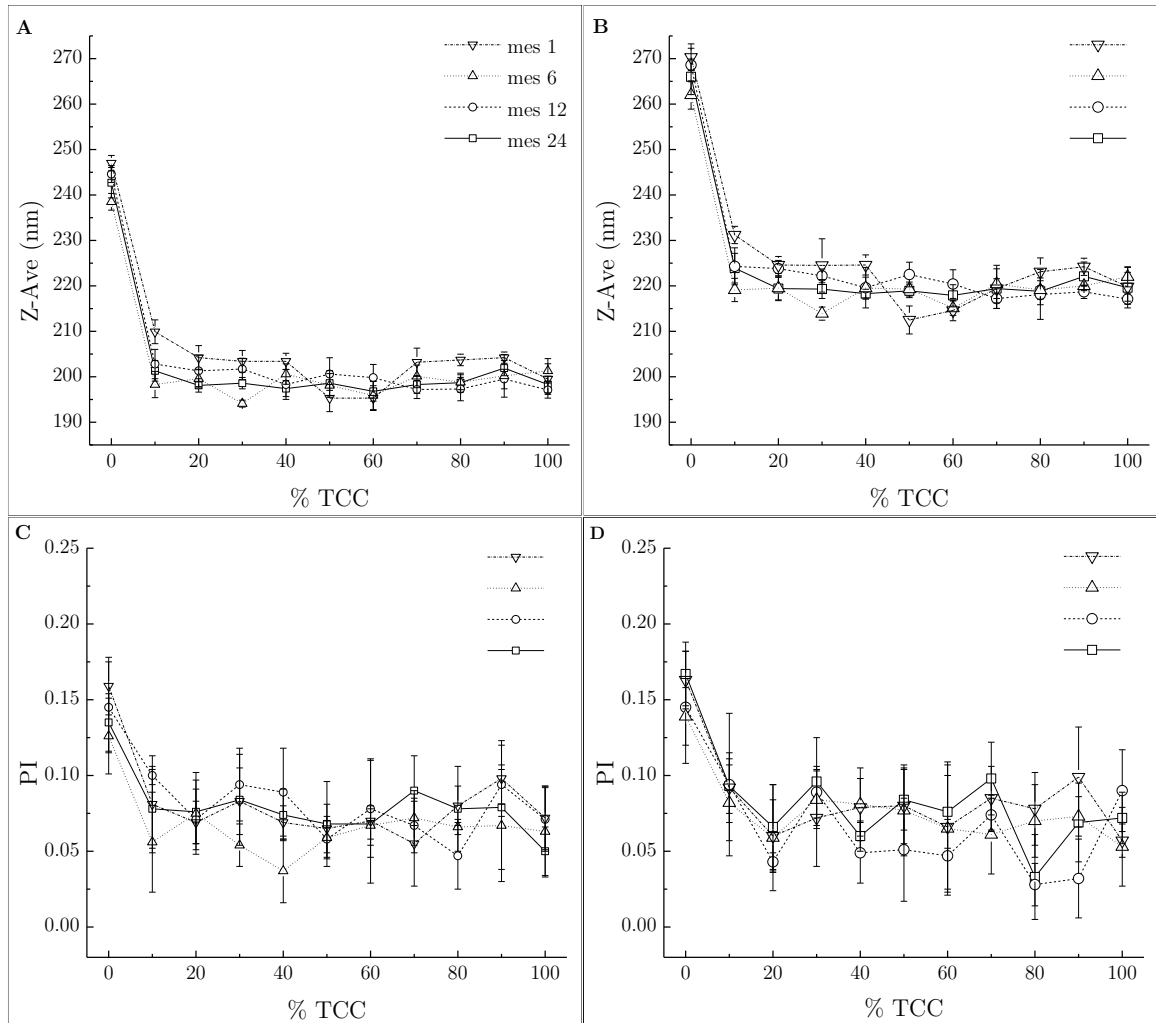


Figura 4-2. Comportamiento del tamaño partícula y del PI para las dispersiones enfriadas a 4 °C. El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad fueron estimados mediante la dilución de $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de la dispersión en una solución de $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (A y C) o en una solución de P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (B y D), (promedio \pm S.D., $n = 5$). Se asumió que la viscosidad y el índice de refracción eran iguales al agua para el $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Los valores de índice de refracción y de viscosidad para una solución de P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ se muestran en la Tabla A-5.

No obstante, la naturaleza del medio diluyente es un factor crítico en la estimación del tamaño de partícula, por lo que la medición debe hacerse siempre que sea posible en el medio dispersante original para minimizar cualquier cambio en el entorno de las partículas durante la dilución y para preservar su estabilidad coloidal durante las mediciones. Se recomienda utilizar como una primera opción el medio dispersante de las partículas como diluyente para lograr una concentración de partículas apropiada. Esto se puede lograr a partir de la centrifugación de la dispersión original con el fin de separar el medio dispersante, y con este, posteriormente diluir la muestra de modo que el medio diluyente considere los efectos de la disminución de la concentración del agente estabilizante en el agua debido a su adsorción sobre la superficie de las partículas. Como una segunda opción, se puede preparar un medio dispersante de la misma naturaleza que el medio dispersante original (ASTM, 2015b; ISO, 1996). En este trabajo de investigación esta última estrategia fue seleccionada y los resultados obtenidos fueron comparados con aquellos logrados a partir de mediciones de tamaño de partícula empleando como medio de dispersión $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ con el objeto de obtener un valor estimado de la capa de P188 adsorbido sobre las partículas lipídicas.

Los resultados evidencian que el tamaño de partícula estimado en solución de NaCl (Figuras 4-1A y 4-2A) es menor que el estimado en P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Figuras 4-1B y 4-2B) lo que sugiere que el espesor de la capa de agente estabilizante sobre las partículas diluidas en solución NaCl es menor que el espesor de la capa de agente estabilizante sobre las partículas diluidas en solución de P188.

Es posible que cuando la dispersión se diluye en una solución de $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, parte de las moléculas del polímero adsorbidas en la superficie de las partículas difundan hacia el medio diluyente en respuesta al gradiente de concentración dejándolas casi “desnudas” en la dilución; en consecuencia, se reduciría el espesor de la capa de polímero alrededor de la partícula. Por el contrario, cuando la dispersión se diluye en una solución de P188 al 2.5 %, la capa de polímero que cubre la superficie de la partícula permanecería casi inalterada, es decir, las partículas quedarían “vestidas” durante la dilución porque las moléculas del polímero adsorbidas sobre la superficie de las partículas no encontrarían un gradiente de concentración

entre el medio dispersante original y el medio dispersante diluyente. La configuración del agente estabilizante polimérico sobre la superficie de las partículas podría ser descrita en términos de “trenes”, “bucles” y “colas” (Figura 4-3). Los trenes son segmentos del polímero que están adsorbidos sobre la superficie, los bucles son segmentos desorbidos separados por dos trenes, mientras que las colas representan los segmentos terminales de la cadena polimérica desorbidos de la superficie (Welch et al., 2015).

La distribución de las cadenas del polímero entre estos estados depende de las interacciones entre el polímero con la superficie de las partículas y el polímero con el agua. Debido al carácter anfifílico del P188, las interacciones del polímero con el agua juegan un rol más importante en el espesor de la capa adsorbida que las interacciones entre el polímero y la superficie de las partículas. Esta capa de polímero se caracteriza por una fracción de volumen promedio de polímero y con un espesor de capa promedio (Figura 4-3). El denominado radio de Flory $R_F = \alpha R_g$, donde el R_g es el radio de giro de las cadenas del polímero y α corresponde al factor de expansión intramolecular, puede ser usado para dar una explicación al respecto. α es 1 en soluciones ideales, > 1 en buenos solventes y < 1 en malos solventes. Por lo tanto, a bajo cubrimiento de superficie, es decir, a bajas concentraciones de P188 o cuando la determinación de la medida del tamaño de partícula se lleva a cabo con muestras diluidas en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, las cadenas de P188 están injertadas sobre la superficie de la partícula. Por el contrario, la adsorción a alto cubrimiento de superficie, es decir, cuando la concentración de P188 aumenta o cuando la dilución de la dispersión para la determinación del tamaño de partícula se lleva a cabo con muestras diluidas en P188 al 2.5 %, las cadenas del polímero toman una configuración de “cepillo” y la extensión espacial de la capa (espesor hidrodinámico, δ_h) aumenta. Como resultado, el tamaño de partícula también aumenta (Hiemenz y Rajagopalan, 1997; Tadros, 2009) y como se muestra en las Figuras 4-1A y 4-2A, la diferencia del tamaño de partícula estimado en solución de NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ con respecto al tamaño estimado en solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ es de aproximadamente 20 nm.

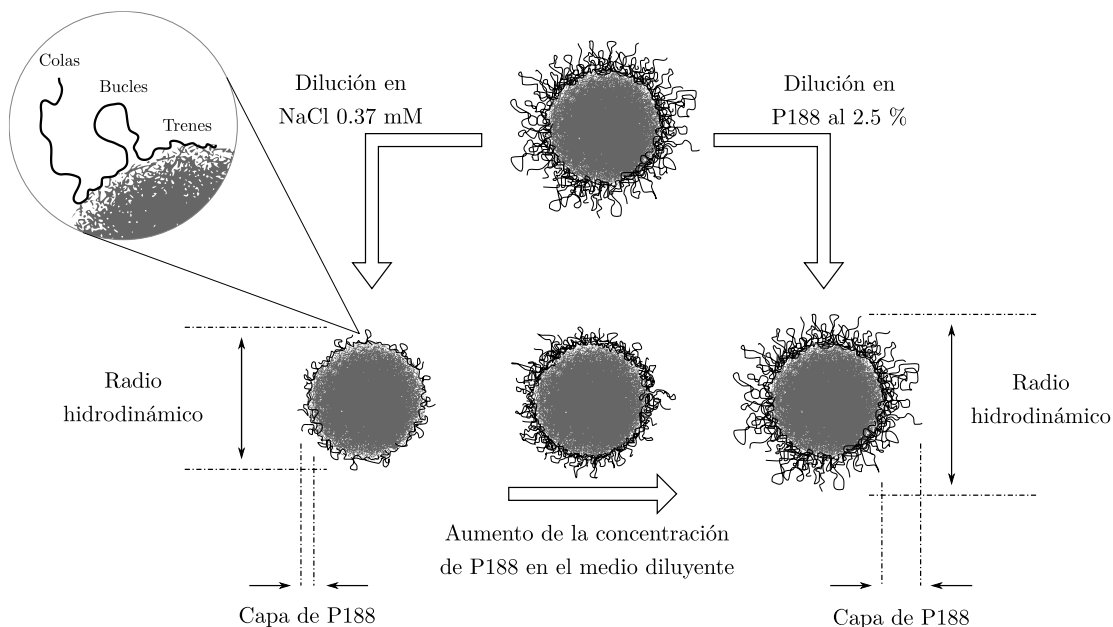


Figura 4-3. Representación esquemática de la adsorción del P188 sobre las nanopartículas.

La configuración de las cadenas poliméricas del agente estabilizante está influenciada por la concentración de éste en el medio dispersante (Figura 4-3), es decir, cuando se utilizan altas concentraciones de P188 se forma una capa más extensa debido al cambio en la configuración desde una capa dominada predominantemente por trenes a bajas concentraciones de polímero, hacia una capa más extensa que consiste en trenes, bucles y colas al aumentar la concentración de polímero (Cattoz et al., 2012), lo que causa el aumento del tamaño de las nanopartículas como resultado de una mayor adsorción del agente estabilizante (Priel y Silberberg, 1978).

En casi todos los estudios consultados durante el desarrollo de esta investigación, la estimación del tamaño de partícula se realiza únicamente diluyendo la dispersión en agua sin la presencia del agente estabilizante, a pesar de las recomendaciones dadas por los organismos de estandarización de hacer la dilución de la muestra, siempre que sea posible, en el mismo medio dispersante para evitar cualquier alteración de la superficie de las partículas (ASTM, 2015b; ISO, 1996). Además, estimar el tamaño de partícula mediante DLS diluyendo la dispersión en agua y en el medio dispersante original permite conocer un valor aproximado del espesor hidrodinámico de las nanopartículas lipídicas, es decir, el espesor de la capa de estabilizante adsorbida

(Baker et al., 1989; Carstensen et al., 1991; Nelson y Cosgrove, 2004; Tadros, 2009), lo que hasta ahora ha sido poco explorado.

Por ejemplo, el espesor hidrodinámico aproximado de las dispersiones de las Figuras 4-1A y 4-2A es de aproximadamente 20 nm, es decir; si se asume que el diámetro de las partículas completamente desnudas es de aproximadamente 200 nm (Figura 4-1), la relación entre el espesor de la capa adsorbida y el radio de las partículas ($\delta_h/r=0.1$) es significativa. Por lo tanto, las dispersiones serían estabilizadas principalmente por un mecanismo estérico, lo que explicaría la elevada estabilidad de estos sistemas coloidales a lo largo del tiempo de almacenamiento (Izquierdo et al., 2002; Napper, 1977; Stenkamp y Berg, 1997), a pesar de la evidente separación de fases observada en algunas de las dispersiones estudiadas (Figura 4-4). En particular, todas las dispersiones enfriadas a 20 °C presentan separación de fases después de dos años de almacenamiento, mientras que en las dispersiones enfriadas a 4 °C la separación de fases se presenta visiblemente en las dispersiones cuya concentración varía entre el 60 % y el 100 % de TCC. No obstante, todas las dispersiones fueron fácilmente redispersables mediante agitación manual y el tamaño medio de las partículas permaneció sin cambios durante los dos años de almacenamiento.

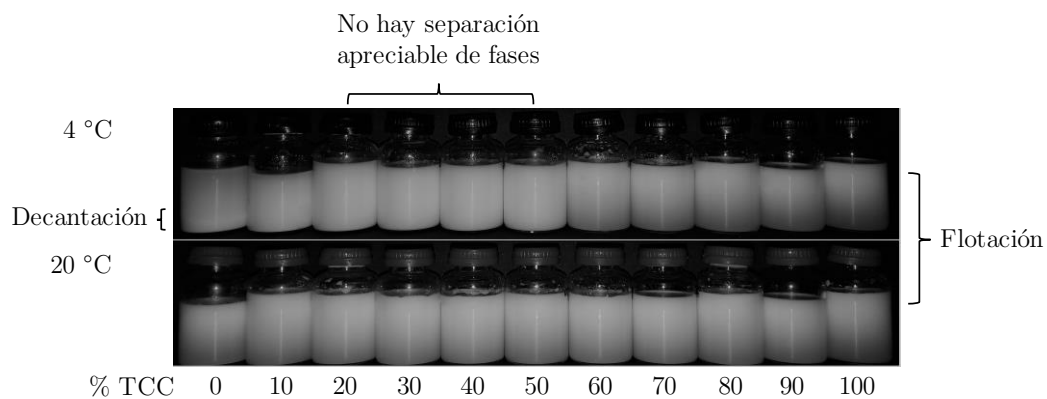


Figura 4-4. Aspecto de los sistemas lipídicos investigados durante el almacenamiento. Se destaca la separación de fases después de dos años de almacenamiento.

Por otro lado, se hace notable el comportamiento del tamaño medio de partícula estimado para la dispersión preparada con 100 % de MMM enfriada a 4 °C durante 24 h. El tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad estimados para esta

dispersión durante los dos años de seguimiento se mantuvieron en $242.7 \text{ nm} \pm 3.4 \text{ nm}$ y en 0.135 ± 0.019 para la determinación realizada en $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en $266.0 \text{ nm} \pm 3.9 \text{ nm}$ y 0.118 ± 0.021 para la determinación realizada en P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, mientras que en el resto de las dispersiones (aquellas enfriadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $20 \text{ }^\circ\text{C}$), el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad se mantuvieron en promedio en $198.9 \text{ nm} \pm 1.9 \text{ nm}$ y 0.075 ± 0.024 y $219.7 \text{ nm} \pm 2.5 \text{ nm}$ y 0.075 ± 0.022 cuando las determinaciones se realizaron en $\text{NaCl } 0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en P188 al 2.5 % p/v + $\text{NaCl } 0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente (Figuras 4-1 y 4-2). Es decir, que la diferencia para el tamaño de partícula entre la dispersión preparada con 100 % de MMM enfriada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h y las demás dispersiones investigadas es de aproximadamente 43 nm, lo que indica que el tratamiento térmico induce cambios estructurales en las partículas evidenciables en el tamaño medio y en el índice de polidispersidad. Se puede deducir que en la porción de la dispersión preparada con 100 % de trimiristina enfriada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ se indujo la solidificación de las gotas fundidas mientras que, en la porción de esta misma dispersión enfriada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, las gotas permanecieron en estado líquido (Bunjes et al., 1996; Göke et al., 2016; Westesen et al., 1997).

Para que el tamaño de partícula de la dispersión aumentara durante el proceso de solidificación podrían ocurrir por lo menos dos fenómenos. El primero es un aumento del volumen de la gota si durante el enfriamiento, el arreglo de las moléculas de trimiristina genera expansión molecular como ocurre, por ejemplo, con el hielo. El segundo fenómeno tiene que ver con la forma final de la partícula una vez el proceso de solidificación haya terminado. En este caso, el hábito cristalino de la trimiristina consiste en lamelas superpuestas alargadas que generan cristales en forma de placa.

Si el primer fenómeno es el que se presenta, las partículas sólidas tendrían menor densidad. Sin embargo, se descarta esta posibilidad dado que como se observa en la Figura 4-4, ocurre sedimentación en la separación de fases de la dispersión enfriada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, contrario a la flotación evidente en la dispersión enfriada a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ con la misma composición (Figura 4-4). Es decir, que la formación de placas alargadas (partículas asimétricas) durante la solidificación de la dispersión es probablemente el fenómeno que se presenta durante el enfriamiento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Como resultado, durante la determinación del tamaño de partícula mediante DLS cada partícula alargada no es detectada como tal, sino más bien como una esfera con el diámetro promediado sobre los tres ejes. La razón es que las partículas en suspensión además del movimiento difusivo de traslación, tienen movimiento difusivo de rotación alrededor de sus ejes que contribuye a la aleatorización de la orientación de la partícula. Esto implica que cualquier partícula que se desvíe de la forma esférica se trata como un “elipsoide de revolución” (Uskoković, 2012).

Las dispersiones de nanopartículas son a menudo polidispersas, es decir, puede haber partículas con una distribución de tamaños y formas en lugar de partículas de un solo tamaño y forma. Por lo tanto, los coeficientes de difusión traslacional y rotacional son diferentes para cada partícula en la dispersión. Del análisis de la distribución de los coeficientes de difusión traslacional y rotacional se deriva el índice de polidispersidad (Pecora, 2000; Tscharnuter, 2000). Así, una dispersión de partículas puede ser polidispersa en tamaño, en forma (si el radio hidrodinámico estimado resulta igual para cada partícula) o tanto en forma como en tamaño (Figura 4–5). Por ejemplo, una dispersión O/W en la que las gotas de aceite se asumen como esferas, se considera monodispersa en forma; pero si las gotas tienen tamaños diferentes, la dispersión se considera polidispersa en tamaño.

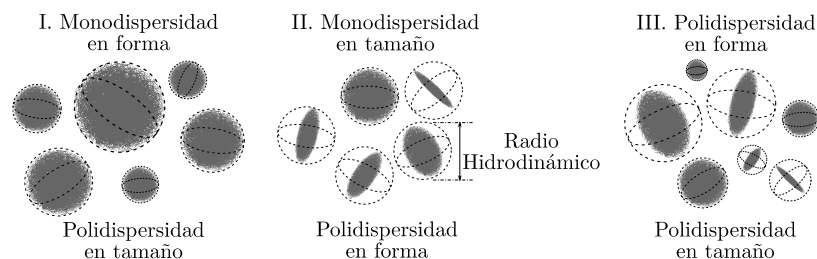


Figura 4–5. Representación esquemática del índice de polidispersidad en tamaño y forma.

El índice de polidispersidad obtenido mediante DLS debe ser evaluado con cuidado puesto que no siempre refleja la distribución real del tamaño y la forma de las partículas (Gaumet et al., 2008; Tscharnuter, 2000). Sin embargo, para efectos de comparación de los resultados mostrados en las Figuras 4–1 y 4–2 es suficiente. De ese modo, el alargamiento de las gotas durante la solidificación conduce a un aumento en el radio hidrodinámico estimado para la dispersión preparada con 100 % de trimiristina y enfriada a 4 °C durante 24 h; la formación de partículas anisométricas

conduce a la aleatorización de la orientación de las partículas, cuyo efecto se ve reflejado en un índice de polidispersidad mayor en comparación con la dispersión de la misma composición enfriada a 20 °C. Este comportamiento, en el que, el tamaño y el índice de polidispersidad de las partículas aumentan durante la solidificación, fue observado en nanoemulsiones y nanosuspensiones preparadas mediante homogeneización a alta presión en caliente a partir de trimiristina y P188 (Kupetz y Bunjes, 2014), incluso aún después de someter las dispersiones a un tratamiento por autoclave durante 15 min a 121 °C, con el ánimo de reducir la polidispersidad de las partículas obtenidas (Göke et al., 2016). Igualmente, ha sido descrito varias veces en dispersiones de lípidos de diversas composiciones (Andrade et al., 2014; Bunjes et al., 1996; De Souza et al., 2012; Garcia-Fuentes et al., 2005; Jores et al., 2005; Qian et al., 2013; Souto et al., 2004).

De hecho, la adición de un lípido líquido parece afectar la forma alargada de este tipo de lípidos normalmente asociada con la transición de líquido a sólido, en los que, además se logra mayor estabilidad (Yang et al., 2014).

La adición de TCC a la trimiristina con el objetivo de obtener transportadores lipídicos nanoestructurados, NLC, parece influir en el tamaño de partícula y en el índice de polidispersidad solo hasta un contenido de TCC del 20 %. A proporciones mayores no se observan cambios significativos en estas dos variables. No obstante, el patrón de separación de fases de la Figura 4-4 indica que la adición de TCC a la trimiristina parece afectar otras características de las dispersiones, principalmente en aquellas enfriadas a 4 °C. En general, el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad reportados para SLN parecen ser ligeramente mayores a los reportados para NLC (Aditya et al., 2014; Fang et al., 2008; Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018; Jores et al., 2004). Además, la separación de fases podría ser menos pronunciada en las dispersiones que contienen TCC hasta proporciones del 50 %, en particular, en las dispersiones con porcentajes de TCC entre 20 % y 50 %.

4.2 Caracterización de la matriz de los sistemas lipídicos

En el apartado anterior se señaló la importancia de conocer a profundidad las características de la matriz lipídica para entender las relaciones entre el agente

estabilizante y los lípidos que constituyen la estructura interna de la partícula. El estado físico, la fluidez y la estructura cristalina del interior de la partícula no solo es determinante en la forma y el tamaño de las partículas y el grado de hidratación de los segmentos de polioxietileno (PEO) del P188 en la región interfacial, y por lo tanto en el balance hidrófilo/hidrófobo de la superficie, sino que además influencia otras características como la densidad y la capacidad y eficiencia de incorporación del fármaco, así como su comportamiento de liberación.

Como un aporte en este sentido, la presente investigación avanzó en el conocimiento de las características de las matrices de los sistemas lipídicos de interés, a partir de estudios por calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X, espectroscopía Raman, la determinación de la densidad y la evaluación de la estabilidad frente a fuerzas centrífugas de las dispersiones. Igualmente, se consideró su capacidad para incorporar moléculas activas.

4.2.1 Estudios por calorimetría diferencial de barrido

- Ensayos en las mezclas físicas de MMM y TCC

Para entender el comportamiento cristalino de los sistemas lipídicos, es necesario conocer los procesos termodinámicos que ocurren durante el enfriamiento de la dispersión. Cuando dos triglicéridos se mezclan, cada especie puede influenciar las propiedades cristalinas de la otra y es necesario un diagrama de fases para definir las fuerzas que dirigen la cristalización en cada condición (Metin y Hartel, 2005). Ya que los triglicéridos de cadena media son uno de los lípidos líquidos más empleados en la preparación de NLC (Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018), es necesario conocer las posibles mezclas derivadas de la combinación con diferentes proporciones de MMM. El análisis térmico mediante DSC permite obtener información acerca del estado físico de los lípidos de la matriz y de las características energéticas asociadas a su estructura, es decir, al grado de cristalinidad. DSC también permite monitorear las transiciones o eventos térmicos de las partículas en suspensión y su relación con el método de obtención.

En particular, la trimiristina (1,3-di(tetradecanoiloxi)propan-2-il tetradecanoato) es el triglicérido del ácido mirístico (Figura 4–6), naturalmente encontrado en el aceite

de coco, el aceite de palmiste y la nuez moscada. Actualmente, el principal uso de la trimiristina es para investigación y desarrollo. La trimiristina posee un punto de fusión de 330.2 K (57.05 °C) y un valor de entalpía de fusión, ΔH_{fus} de 152.2 kJ · mol⁻¹ (Domalski y Hearing, 1996). Una de las propiedades más interesantes de la trimiristina es su elevado grado de subenfriamiento, es decir, la disminución de la temperatura de un líquido más allá de la temperatura de congelación permaneciendo en forma líquida. Comúnmente, la cristalización es el resultado de una nucleación heterogénea y el grado de subenfriamiento es menor que el máximo crítico asociado con la congelación del líquido puro. Sin embargo, dispersar un líquido en un gran número de gotas pequeñas, a menudo conduce a un aumento del grado de subenfriamiento. Para el caso particular de la trimiristina, la solidificación se produce por lo menos 20 °C por debajo del punto de fusión (~35 °C) y para tamaños de gota inferiores a 2 μm, dicha solidificación ocurre incluso a temperaturas menores a los 15 °C (Phipps, 1964).

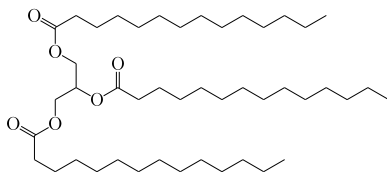


Figura 4-6. Estructura química de la trimiristina.

Por lo tanto, la pronunciada tendencia de la trimiristina hacia la formación de líquidos fundidos subenfriados con considerable estabilidad cinética puede ser utilizada para estudiar simultáneamente las diferencias entre nanoemulsiones, nanopartículas sólidas lipídicas (Bunjés et al., 1996) y transportadores lipídicos nanoestructurados en función de la historia térmica dada a la dispersión.

De otro lado, los triglicéridos de cadena media corresponden a una mezcla de lípidos líquidos (aceite) a temperatura ambiente, principalmente ácidos cáprico y caprílico (~60% C-8:0 y ~40 % C-10:0), fraccionada a partir de ácidos grasos vegetales, que se caracteriza por una baja viscosidad (25–33 mPa · s a 0 °C, menor densidad que el agua (0.93–0.96 g · cm⁻³) e índice de refracción entre 1.440–1.452. Los triglicéridos de cadena media han sido empleados en una amplia gama de aplicaciones principalmente en productos dérmicos como mejoradores de la permeabilidad y en formulaciones de base lipídica para incrementar la biodisponibilidad de fármacos poco solubles en agua o para diseñar sistemas autoemulsificables (Dahan y Hoffman, 2007; Devani et al.,

2005; Wang et al., 2008). Además, es uno de los lípidos líquidos más empleados en la preparación de NLC.

Las transiciones térmicas de la trimiristina y de las mezclas de trimiristina/TCC fueron registradas junto con las transiciones térmicas de las dispersiones de lípidos para comparar el comportamiento durante los procesos de fusión y solidificación (Figura 4–7). Como se observa, la trimiristina y las mezclas con TCC presentan un único evento endotérmico asociado al proceso de fusión del material. La fusión de la trimiristina bajo las condiciones de ensayo comienza en 55.51 °C y alcanza la velocidad máxima en 58.59 °C (temperatura del pico). El valor promedio entre el comienzo de la transición (onset) y su velocidad máxima (peak) es de 57.05 °C, exactamente el mismo valor reportado en la literatura para la temperatura de fusión de la trimiristina (Domalski y Hearing, 1996). A medida que aumenta la proporción de TCC en la mezcla se observa una reducción en la temperatura de fusión acompañada de un aumento en la diferencia entre el comienzo del evento térmico y su velocidad máxima (ver inserto en la Figura 4–7A).

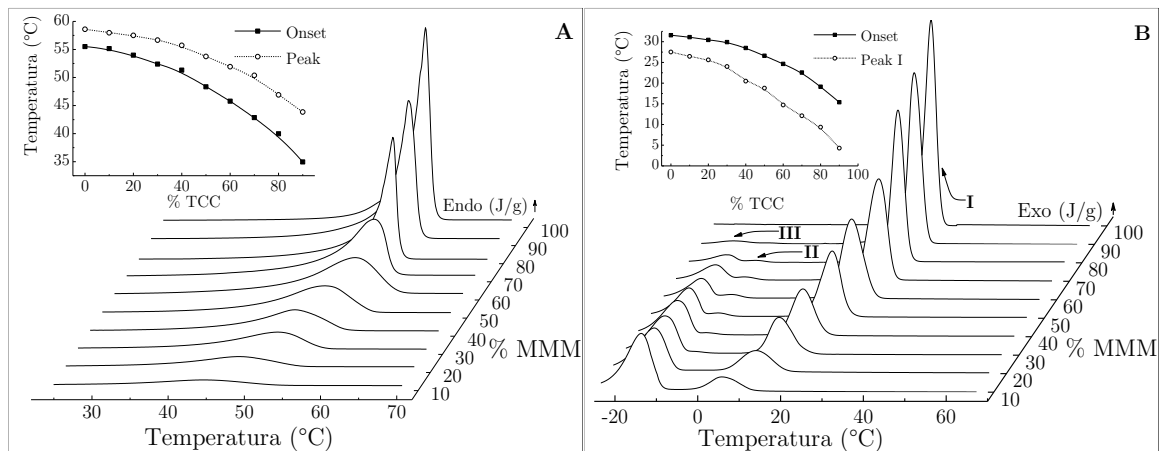


Figura 4–7. Transiciones térmicas de fusión y solidificación para las mezclas de MMM/TCC.

(A) durante el calentamiento y (B) durante el enfriamiento. En el inserto de la Figura 4–7 solo se muestra el comportamiento del evento térmico I, los valores para los eventos térmicos II y III se muestran en el Anexo B, Tabla B-1.

Los tres primeros termogramas de la Figura 4–7A, es decir, entre 0 % y 20 % de TCC, son más puntiagudos que los demás. Este comportamiento es notorio incluso visualmente como se muestra en la Figura 4–8, en el cual, la apariencia de las mezclas del Grupo I es más parecida a la de la trimiristina pura. De otro lado, las mezclas de

trimiristina con TCC entre el 30 % y el 60 % tienen una apariencia semisólida, mientras que cuando el TCC varía entre el 70 % y el 90 % se observan cristales rodeados por líquido.

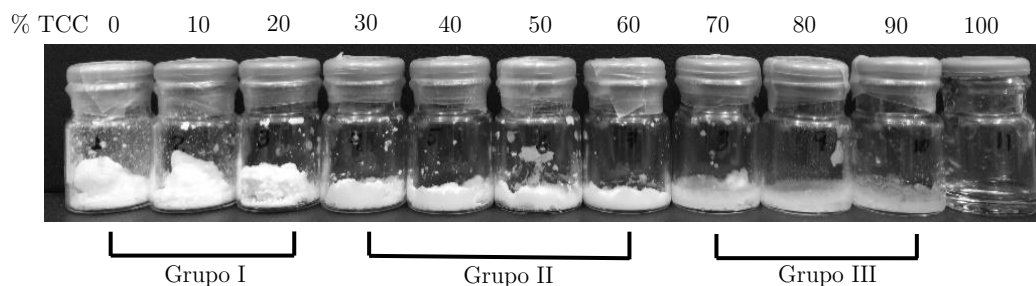


Figura 4-8. Apariencia física de las mezclas de MMM/TCC.

En los termogramas de enfriamiento de la Figura 4-7B se observa la presencia de tres eventos térmicos en el rango de temperaturas estudiado (70 °C hasta -25 °C). El primero de ellos (I) muestra una señal cuya aparición se evidencia a menores temperaturas según aumenta la proporción de TCC en la mezcla. El segundo evento térmico (II) corresponde a una débil señal que exhiben las muestras que contienen entre el 10 % y el 70 % de TCC a una temperatura de -6.2 °C aproximadamente. El tercer evento térmico, mucho más pronunciado que el segundo, se presenta en las muestras que contienen entre el 10 % y el 90 % de TCC a una temperatura de -3.7 °C, aproximadamente. Durante el enfriamiento no se observa la solidificación del TCC puro en el rango de temperaturas estudiado, contrario a lo reportado en estudios previos, cuya temperatura de fusión fue reportada en cerca de -14.5 °C (Pattarino et al., 2015).

A partir de las temperaturas del comienzo (onset) de los eventos de fusión y de cristalización de los termogramas de la Figura 4-7 se construyó el diagrama de fases para el sistema binario trimiristina y triglicéridos de cadena media cáprico/caprílico (MMM/TCC) de la Figura 4-9. En términos generales, dependiendo de las diferencias moleculares (interacciones cadena-cadena y polimorfismos) las mezclas binarias de triglicéridos pueden formar tres fases diferentes cuando los dos componentes son miscibles en todas las proporciones en el estado líquido: mezcla que forma una solución sólida, mezcla eutéctica y mezcla que forma un compuesto molecular (Sato, 2001; Sato y Ueno, 2005). El comportamiento del sistema binario MMM/TCC es esencialmente

el mismo que el comportamiento general observado en las mezclas binarias de ácidos grasos (Eckert et al., 2016; Gandolfo et al., 2003; Inoue et al., 2004) o en mezclas binarias de triglicéridos (Takeuchi et al., 2003). Sin embargo, en este caso se identifica en adición, una cuarta zona bien definida: Primera: Líquidos; segunda: $L + I_{MMM}$ o $I_{MMM} + II_{MMM} + III_{MMM}$; tercera: $I_{MMM} + II_{MMM}$; y cuarta: $I_{MMM} + III_{MMM}$ o $I_{MMM} + II_{MMM} + III_{MMM}$; donde I_{MMM} , II_{MMM} y III_{MMM} corresponden a los polimorfos de trimiristina y L a la mezcla eutéctica MMM-TCC (Figura 4-9).

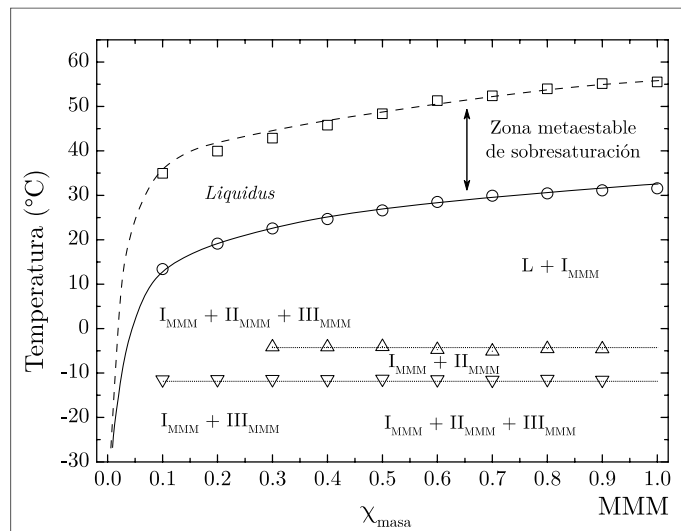


Figura 4-9. Diagrama de fases para la mezcla binaria MMM/TCC.

La primera zona *liquidus*, corresponde a la mezcla binaria fundida en la que los dos componentes se encuentran formando una fase líquida homogénea, es decir, esta fase se caracteriza porque los componentes son miscibles en todas las proporciones. En esta primera zona se encuentra la zona metaestable de sobresaturación que está definida por las líneas *liquidus* entre el evento de fusión durante el calentamiento (línea punteada) y el primer evento de solidificación (línea continua) durante el enfriamiento. La línea *liquidus* inferior representa la temperatura a la que la fase líquida comienza a cristalizar y define la ventana de temperatura de subenfriamiento de la mezcla, que es de aproximadamente 25 °C, similar al valor reportado en estudios previos (Hagemann y Rothfus, 1983). La segunda zona aparece a temperaturas menores a la línea *liquidus* y corresponde a la región donde la fase sólida de trimiristina y la fase líquida eutéctica formada por trimiristina y TCC son completamente inmiscibles independientemente de la forma polimórfica de las fases sólidas, es decir, que las fases coexisten de forma separada por debajo de la *liquidus*.

A medida que desciende la temperatura por debajo de esta línea, las moléculas de trimiristina cristalizan separándose de la fase líquida eutéctica, por lo que la mezcla eutéctica se enriquece con moléculas de TCC mientras que la fase sólida se enriquece con cristales de trimiristina. Mediante la aplicación de la regla de reparto, es posible determinar la cantidad relativa de las fases presentes en el equilibrio durante el enfriamiento a una determinada composición.

Por otro lado, ya que la línea *liquidus* aumenta monótonamente desde el que sería el punto de fusión del TCC puro hasta alcanzar el punto de fusión de la trimiristina pura, es evidente que la composición eutéctica se desplaza marcadamente hacia los lados del diagrama hasta que alcanza el componente puro. Es decir, a bajas proporciones de TCC (por ejemplo, entre el 10 % y el 20 %) la composición de la mezcla se desplaza hacia la MMM y la separación de la fase líquida es poco notoria, pero a elevadas proporciones de TCC (entre el 70 % y el 90 %) la composición de la mezcla eutéctica se desplaza hacia el componente líquido y la separación de fases es evidente (Figura 4–8, grupo III).

A temperaturas inferiores a $-6.2\text{ }^{\circ}\text{C}$ se presenta un segundo evento térmico (II) que se extiende hasta una proporción del 70 % de TCC (Figura 4–7). En esta zona coexisten dos formas cristalinas de trimiristina junto con la fase líquida eutéctica formada por trimiristina y TCC. Finalmente, a temperaturas inferiores a $-13.7\text{ }^{\circ}\text{C}$, entre 10 % y 90 % de TCC, se presenta un tercer evento térmico (III). En esta última zona coexisten tres fases sólidas de trimiristina hasta una proporción del 70 % de TCC y la fase líquida eutéctica, mientras que, a proporciones mayores de TCC existen solamente los polimorfos I y III junto con la fase líquida. El punto de fusión del TCC de acuerdo con la línea *liquidus* del diagrama de fases está por debajo de $-29\text{ }^{\circ}\text{C}$, y probablemente sea esa la razón por la cual no se detectó la solidificación del TCC en el rango de temperaturas estudiado.

El proceso de cristalización de la trimiristina ocurre a través de tres pasos consecutivos: a) sobresaturación o subenfriamiento, b) nucleación y c) crecimiento cristalino. A medida que desciende la temperatura, la fase líquida pasa de un estado estable de insaturación a un estado inestable de sobresaturación con un incremento en el grado de subenfriamiento. Una vez ocurre la nucleación, el exceso de trimiristina

de la solución sobresaturada formada por TCC y trimiristina comienza a cristalizar hasta que la concentración cae al valor de equilibrio (saturación). La precipitación continua de la trimiristina a medida que se enfría la solución provoca el ensanchamiento del primer evento exotérmico I (Ng, 1989), tal como se observa en el inserto de la Figura 4-7B y dado que este proceso no se presenta en las transformaciones de fase en el estado sólido, no se observa el ensanchamiento de la señal en los eventos térmicos II y III.

En el primer paso del proceso de cristalización, la fase líquida fundida puede reducir su energía libre mediante la nucleación. Esto se debe a que la fase sólida tiene menor energía libre que la fase líquida. Sin embargo, la formación de un núcleo sólido siempre está acompañada por la creación simultánea de una interfase sólido-líquido que incrementa la energía libre en una determinada cantidad (denominada energía libre de superficie, σ) por cada unidad de área en la interfase. Por lo tanto, un líquido puede permanecer notablemente estable por debajo de su punto de fusión, T_m , en un estado subenfriado sin sufrir cristalización, entre la zona metaestable de sobresaturación de la Figura 4-9 y la línea *liquidus* inferior, a menos que la nucleación pueda dar como resultado una disminución de la energía libre total del sistema (Marangoni et al., 2012).

Por ejemplo, para una partícula esférica de radio r , la contribución a la energía libre de superficie es $4\pi r^2\sigma$ y la contribución de la energía libre de volumen es $\frac{4}{3}\pi r^3\Delta G_v$, en donde $\Delta G_v = \Delta H_m(T_m - T)/vT_m$ es el cambio en la energía libre de volumen por unidad de volumen, v , del núcleo sólido formado, ΔH_m es la entalpía de fusión y T_m el punto de fusión del núcleo sólido. El cambio total en la energía libre bajo la nucleación está dado por (Lawler y Dimick, 2008; Ng, 1989):

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3\Delta G_v + 4\pi r^2\sigma \quad (4-1)$$

Diferenciado la Ecuación 4-1 con respecto a r e igualando a cero, se obtiene un radio crítico, $r_c = \frac{2\sigma}{\Delta G_v}$. Por encima de r_c , si el núcleo crece, la energía libre total se reduce. La energía libre de activación de Gibbs para la formación de un núcleo crítico, ΔG_c , está dada por (Kloek et al., 2000; Ng, 1989; Povey, 2014):

$$\Delta G_c = \frac{16\pi\sigma^3}{3(\Delta G_v)^2} = \frac{16\pi\sigma^3 v^2 T_m^2 N_{Av}^2}{3\Delta H_m^2 (T_m - T)^2} \quad (4-2)$$

Donde N_{Av} es el número de Avogadro. Por lo tanto, hay una barrera de potencial termodinámico para crear un núcleo crítico. Una vez la fluctuación local en energía es suficientemente grande para superar esta barrera (por ejemplo, mediante la reducción de la temperatura), entonces ocurre espontáneamente la nucleación.

El cambio en el patrón de cristalización de la trimiristina con la adición de TCC de la Figura 4-7B indica que ocurre una interacción entre el lípido sólido y el lípido líquido durante los pasos de nucleación y crecimiento cristalino (Simoneau et al., 1993). Dichas interacciones están relacionadas con la conformación molecular y la estructura líquida de los lípidos en la fase fundida (Inoue et al., 2004). Aunque los triglicéridos se encuentran en una fase desordenada a altas temperaturas o en fase líquida, los grupos polares muestran una tendencia pronunciada hacia la agregación (Sum et al., 2003), lo que conduce a la formación de diferentes estructuras en fase líquida. En este caso, es probable la formación de estructuras esmécticas, nemáticas y discóticas, así como la formación de agregados de dichas estructuras (Iwahashi y Kasahara, 2011) o incluso, estructuras de ensamblajes lamelares embebidos en un medio isotrópico (Sadeghpour et al., 2018). Estas interacciones probablemente aumentan con la proporción de TCC, por lo tanto, la formación de un núcleo crítico de trimiristina se hace cada vez más difícil de alcanzar y la solidificación de la trimiristina se ve retrasada (Simoneau et al., 1993). Además, suponiendo que en la fase líquida la trimiristina este disuelta en el TCC, cuanto menor sea la proporción de trimiristina en la mezcla mayor será el tiempo requerido para la alineación molecular adecuada y el empaquetamiento tras la nucleación, dado que las largas cadenas alifáticas en la trimiristina pueden adoptar un gran número de conformaciones, es decir, son muy flexibles, sin un mínimo global de energía libre para una conformación particular en el estado fundido (Marangoni et al., 2012). Así, debido a que están cada vez más “diluidas”, les es más difícil encontrarse, por lo que el comportamiento de nucleación metaestable se hace más pronunciado conforme disminuye el grado de sobresaturación en la fase líquida.

La habilidad de los triglicéridos para permanecer en una fase desordenada durante el proceso de enfriamiento puede relacionarse con las temperaturas de transición de fase desordenada-ordenada. Dado que las transformaciones de fase están determinadas por la densidad de los triglicéridos en el estado líquido y la velocidad de los cambios conformacionales, los triglicéridos que exhiben una alta temperatura de transición de fase también pueden exhibir una elevada estabilidad térmica durante el proceso de enfriamiento. Las transiciones de una fase ordenada a una fase desordenada a altas temperaturas indican que se necesita elevada energía para la transformación y que la transición opuesta, es decir, de una fase desordenada a una fase ordenada, requiere mucho tiempo y bajas temperaturas (Hsu y Violi, 2009).

Adicionalmente, pequeñas diferencias en la longitud total de la cadena alifática o un simple reordenamiento de las cadenas, afecta dramáticamente la solubilidad mutua en mezclas binarias de triglicéridos (Bouzidi et al., 2010). En particular, las fases presentes en mezclas binarias de triglicéridos dependen notablemente del número de átomos de carbono, C_n , de las cadenas hidrocarbonadas de los triglicéridos en la mezcla. Cuando la diferencia de C_n es de 2, las formas metaestables pueden formar una solución sólida, como por ejemplo, la mezcla de trilaurina y trimiristina (Simoneau et al., 1993), aunque la forma más estable sea una fase eutéctica. Sin embargo, cuando la diferencia de C_n es de 4 o 6 (tal como ocurre entre la trimiristina y los TCC), las fases polimórficas sólidas de ambos triglicéridos son completamente inmiscibles (Takeuchi et al., 2003).

No obstante, para ser completamente miscibles en todas las proporciones en el estado sólido, los dos componentes deben ser prácticamente idénticos. Además, la inmiscibilidad completa en el estado sólido también es improbable en el rango completo de la composición, debido a que se esperaría miscibilidad para composiciones muy diluidas de ambos componentes. De ese modo, asumiendo un comportamiento de soluciones regulares, la temperatura en el equilibrio dada por la línea *liquidus* para sistemas eutécticos en los cuales se asume miscibilidad en el estado líquido y completa inmiscibilidad en el estado sólido puede ajustarse mediante la Ecuación 4-3 (Lee, 1977):

$$T = \frac{T_a[\Delta H_a + \omega(1-\chi_a)^2]}{\Delta H_a - RT_a \ln \chi_a} \quad (4-3)$$

En donde χ_a es la fracción molar del compuesto a en la mezcla, T_a y ΔH_a representan la temperatura de fusión y la entalpía de fusión del componente a , respectivamente. El término ω está relacionado con la diferencia en la energía interna U de las interacciones entre un par de moléculas diferentes (a-b) y el promedio de la energía entre pares de moléculas similares (a-a, b-b):

$$\omega = Z \left[U_{ab} - \frac{1}{2} (U_{aa} + U_{bb}) \right] \quad (4-4)$$

En donde Z es el primer número de coordinación que representa el número de moléculas vecinas más cercanas a una molécula individual. De otro lado, la interacción entre dos moléculas ocurre más fácilmente a valores bajos de U . En el caso de mezclas ideales no hay diferencia de energía entre las moléculas de la mezcla, por lo tanto, ω se hace cero, y en este caso, la Ecuación 4-4 representa el punto de fusión de cada componente por separado. Si ω tiene un valor negativo, la energía del par de moléculas iguales es mayor que la energía del par de moléculas distintas, es decir, predominan las interacciones atractivas entre dichas moléculas. Por el contrario, si ω es positivo la energía de las moléculas diferentes es alta y predominan las interacciones repulsivas (Eckert et al., 2016; Inoue et al., 2004). Como resultado, la mezcla de componentes conduce a la formación de mezclas eutécticas.

En la Figura 4-10 se presenta el comportamiento de la entalpía de fusión para el evento térmico obtenido durante el calentamiento de las mezclas de trimiristina/TCC (ver valores en el Anexo B, Tabla B-3). Para el cálculo de dicha entalpía, el área bajo la curva (A_c) de cada transición se divide entre la fracción molar de la trimiristina (χ_a) en determinada composición de la mezcla, $\Delta H_c = \frac{A_c}{\chi_a}$. Sin embargo, en la literatura es común encontrar valores para la entalpía en fracción másica y no en fracción molar (Figura 4-10A).

En reportes previos se muestra una reducción del valor de la entalpía de fusión a medida que aumenta la proporción del componente de menor punto de fusión en la mezcla (Anantachaisilp et al., 2010; Eckert et al., 2016; Kovačević et al., 2011; Pattarino et al., 2015; Severino et al., 2011a), la que en varias ocasiones ha sido asociada con una reducción en el grado de cristalinidad de la mezcla lipídica, generando una matriz lipídica con imperfecciones en su estructura que le facilitan

acomodar grandes cantidades de fármaco minimizando su expulsión durante el almacenamiento y modulando el comportamiento de liberación (Anantachaisilp et al., 2010; Das et al., 2012; De Souza et al., 2012; Fang et al., 2015; Farboud et al., 2011; Fazly Bazzaz et al., 2016; Guo et al., 2015; Hu et al., 2006, 2005; Jennings et al., 2000a; Kovačević et al., 2011; Li et al., 2010; Lin et al., 2007; Pan et al., 2016; Saupe et al., 2005; Severino et al., 2011b; Shah et al., 2014; Teeranachaideekul et al., 2008; Zoubari et al., 2017).

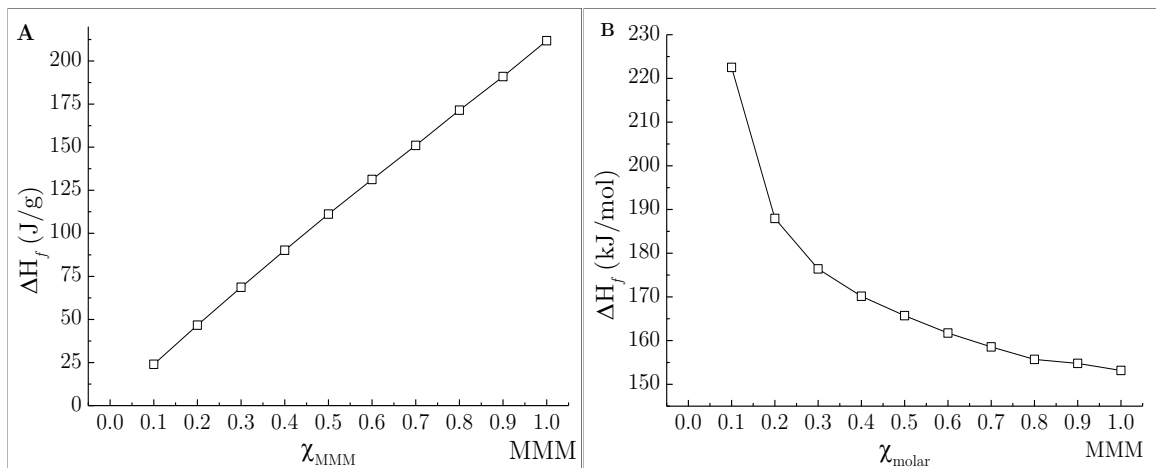


Figura 4–10. Entalpía de fusión para las mezclas binarias de MMM/TCC.

En A: la entalpía se obtiene a partir del cociente entre el área bajo la curva del evento térmico de fusión y la masa total de la muestra, en B) la entalpía se calcula a partir del cociente entre el área bajo la curva sobre la cantidad relativa (en moles) del sólido obtenida a partir de la aplicación de la regla de reparto a cada composición a una temperatura de 20 °C.

Por otro lado, la entalpía de transición de fases durante el calentamiento se puede calcular a partir de la cantidad relativa de las fases presentes en el equilibrio al final de cada evento térmico para cada composición mediante la aplicación de la regla de reparto. De acuerdo con el diagrama de fases de la Figura 4–9, por debajo de la línea *liquidus* inferior coexisten el sólido I de trimiristina y la fase líquida de TCC y trimiristina, es decir, que el evento térmico I del termograma de la Figura 4–7B corresponde a la transición de líquido a sólido de una cantidad relativa de trimiristina en la mezcla eutéctica. Por lo tanto, la energía proporcional al área bajo la curva de dicho evento térmico corresponde a la transición de una cierta cantidad de trimiristina, en todo caso, menor a la cantidad total de trimiristina en cada composición de la mezcla. Además, el ensanchamiento de la señal de fusión durante

el calentamiento (Figura 4–7) podría atribuirse a las diferencias en el tamaño de los cristales de trimiristina presentes en la mezcla eutéctica, en donde los más pequeños funden primero que los más grandes dando origen a un rango amplio de temperaturas en las cuales ocurre la transición.

Por ejemplo, cuando la proporción de trimiristina en la mezcla es del 10 %, la cantidad relativa de trimiristina en fase sólida aplicando la regla de reparto para una temperatura de 20 °C apenas corresponde al 7.8 % aproximadamente de la mezcla eutéctica, mientras que la fase líquida estará formada por una solución homogénea de trimiristina y TCC enriquecida en este último componente, tal y como se discutió previamente.

En el caso contrario, cuando la proporción de trimiristina es del 90 % en la mezcla, la cantidad relativa de trimiristina sólida aplicando nuevamente la regla de reparto en la mezcla eutéctica, es del 89 %, aproximadamente. Es decir, a estas proporciones la mezcla eutéctica está desplazada hacia la trimiristina. En consecuencia, los cristales de trimiristina “dispersos” en una fase líquida funden durante el calentamiento de la mezcla y la energía de dicha transición corresponde a la entalpía de fusión de la trimiristina, cuyo valor normalmente aceptado es de $152.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Domalski y Hearing, 1996).

El cálculo de la entalpía de fusión (en $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) para las mezclas binarias de MMM/TCC teniendo en cuenta la cantidad relativa de la trimiristina en fase sólida para cada composición en la mezcla se muestra en la Figura 4–10B. El valor de la entalpía de fusión aparentemente aumenta con la proporción de TCC, particularmente cuando la proporción es mayor al 90 %. Sin embargo, debe tenerse presente que durante el análisis por DSC la señal obtenida corresponde al flujo de calor como una función de la diferencia de la temperatura entre la muestra y el crisol de referencia normalmente vacío. Por lo tanto, la desviación de los valores para la entalpía de fusión observados en la Figura 4–10B con respecto al valor para la entalpía de fusión de la trimiristina pura ($153.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) pueden ser causados por la diferencia entre la elevada capacidad calorífica del TCC con respecto al crisol de referencia (Bunjes y Unruh, 2007). Es decir, cuando la proporción de TCC es predominante en la mezcla, los cristales de trimiristina funden en un medio líquido (la mezcla eutéctica de TCC

y trimiristina), de modo que la diferencia entre la capacidad calorífica del crisol de referencia frente al crisol conteniendo la muestra (los cristales de trimiristina) es significativa.

Por lo tanto, no es del todo cierto que se afirme sobre la base de resultados de DSC, que las mezclas de lípidos sólidos con lípidos líquidos generan estructuras con menor grado de cristalinidad, menos aún, cuando la mezcla binaria conlleva a la formación de una mezcla eutéctica en la que las fases sólidas formadas son completamente inmiscibles (Kovačević et al., 2011) incluso, teniendo presente que el comportamiento polimórfico de las dispersiones de lípidos presenta una fuerte dependencia con respecto a la matriz lipídica, al agente estabilizante y a la velocidad de enfriamiento (Trujillo y Wright, 2010). Para que tal afirmación fuese válida, la mezcla binaria de lípidos debe conducir a la formación de una solución sólida con un menor empaquetamiento molecular que el de los lípidos por separado.

Un análisis similar al realizado para la entalpía de fusión aplica para los eventos térmicos que tienen lugar durante el enfriamiento. La Figura 4–11A presenta el comportamiento de la entalpía de cristalización para los eventos térmicos I, II y III calculada a partir del cociente entre el área bajo la curva del evento térmico y la masa total de la muestra. En términos generales, este tipo de curvas representan el comportamiento de los eventos térmicos que se presentan en la mezcla. A medida que la proporción de TCC aumenta, parte del sólido I se transforma en los sólidos II y III. La cantidad relativa del sólido II alcanza un máximo cuando la proporción de trimiristina es del 60 % y comienza a descender hasta desaparecer cuando la proporción de trimiristina es del 30 %. De modo similar, a partir del 60 % de trimiristina en la mezcla, la pendiente de la curva de transformación del sólido III se hace más pronunciada, lo que podría indicar un aumento en la velocidad de la transformación.

Curiosamente, a proporciones superiores al 60 % de trimiristina en la mezcla, la suma de las entalpías de los tres eventos térmicos se mantiene aproximadamente constante (Anexo B, Tabla B-4). Las razones por las que la suma de los tres eventos térmicos no es igual en todas las proporciones podrían estar relacionadas con las condiciones experimentales como la velocidad de enfriamiento o el retraso térmico del instrumento,

las que determinan en gran medida el comportamiento de la mezcla binaria (Boettinger et al., 2007). En particular, a velocidades de enfriamiento muy altas es posible que algunas transiciones de fase no se alcancen a completar debido a factores cinéticos, en particular, la temperatura de subenfriamiento requerida para la formación del núcleo crítico se hace difícil de alcanzar y por lo tanto, el tiempo para la transformación no es lo suficientemente largo para alcanzar el equilibrio (Zhao, 2007). A muy bajas temperaturas, el subenfriamiento es mucho más drástico, las transformaciones de fase se retrasan o no se alcanzan a presentar. En consecuencia, el valor de la energía liberada se reduce.

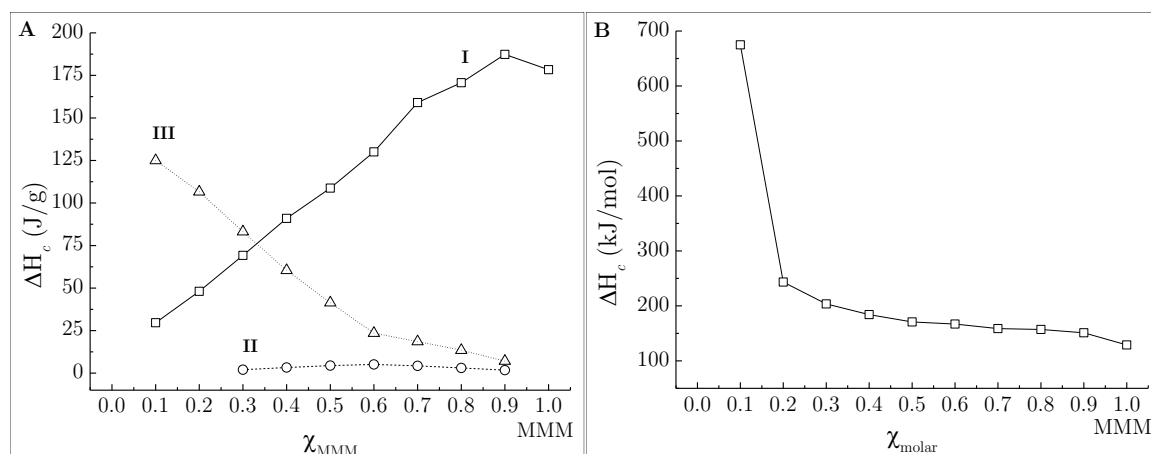


Figura 4–11. Entalpía de cristalización para las mezclas binarias de MMM/TCC.

En A: la entalpía se obtiene a partir del cociente entre el área bajo la curva del evento térmico I y la masa total de la muestra, en B) la entalpía se calcula a partir del cociente entre el área bajo la curva sobre la cantidad relativa (en moles) del sólido I estimada a partir de la aplicación de la regla de reparto a cada composición a una temperatura de 4 °C.

De otro lado, la entalpía calculada a partir de la cantidad relativa del sólido I a 4 °C se muestra en la Figura 4–11B. De acuerdo con el diagrama de fases a esta temperatura no se alcanzan a formar los sólidos II y III. Como era de esperar, la entalpía de solidificación para la trimiristina pura ($129.0 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) es menor que la entalpía de fusión ($-153.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$) debido justamente a los factores cinéticos relacionados con el proceso. Sin embargo, la entalpía de la mezcla aumenta progresivamente hasta aproximadamente el 70 % de TCC y a partir de esta proporción, la entalpía se dispara a valores muy superiores al valor de la entalpía de fusión. Estas desviaciones están relacionadas con la variación de la capacidad calorífica del TCC con el ciclo de calentamiento y enfriamiento del proceso. Durante el

calentamiento, la mezcla se lleva hasta 70 °C e inmediatamente se inicia el enfriamiento, el calor absorbido por el TCC comienza a ser liberado y se suma al calor liberado por el evento exotérmico de la transición de líquido a sólido de la trimiristina. Además, debido al subenfriamiento, el calor absorbido por la mezcla se acumula de modo que se libera en cantidades mayores a medida que la temperatura de la mezcla desciende.

Para conocer las proporciones relativas de los sólidos II y III a las temperaturas en las que están presentes, se debe usar una relación de proporcionalidad entre el área bajo la curva para los tres eventos con respecto a la cantidad relativa de la fase sólida formada a determinada composición y temperatura. Sin embargo, debe tenerse presente el valor de la entalpía involucrada en cada transición. Es decir, la energía del evento I no necesariamente es igual a la energía del evento II o III y por esa razón, el cálculo de la entalpía a temperaturas en las que están presentes más de dos sólidos no es posible bajo las condiciones de ensayo empleadas en esta investigación.

Adicionalmente, es importante mencionar las diferencias en la interpretación de la entalpía de las Figuras 4-10A y 4-11A con respecto a las Figuras 4-10B y 4-11B. En las primeras, no se tiene en cuenta el efecto de la capacidad calorífica del TCC y, además, el área bajo la curva de la transición se divide entre la masa total de la muestra (trimiristina + TCC). En las segundas, el cálculo se hace a partir de la división de la cantidad relativa de trimiristina en fase sólida (en moles) a cada composición, obtenida mediante la aplicación de la regla de reparto a una temperatura específica, sobre el área bajo la curva.

Es decir, en este último método de cálculo, no solo están presentes los fenómenos de subenfriamiento mencionados, sino que, en adición, el efecto de la capacidad calorífica se hace notable en el valor obtenido. Por lo tanto, en mezclas eutécticas en las que la fase sólida sea inmisible con la fase líquida, los análisis por DSC, deben ser llevados a cabo usando la fase líquida, en este caso TCC, en el crisol de referencia, lo que además implica considerar los aspectos relacionados con la calibración del equipo a diferentes temperaturas y a diferentes velocidades.

- Ensayos en los sistemas lipídicos

De otro lado, se ha demostrado que existen diferencias en el comportamiento de cristalización en el material a granel respecto al material en emulsión las que pueden ser explicadas a partir del proceso de nucleación que tiene lugar durante el enfriamiento (Simoneau et al., 1993). La presencia de señales endotérmicas de fusión en el termograma de calentamiento confirma el estado sólido de las dispersiones enfriadas a 4 °C hasta proporciones de TCC inferiores al 50 % (Figura 4-12A). Por el contrario, la ausencia de eventos endotérmicos confirma el estado de subenfriamiento de las dispersiones enfriadas a 20 °C (Figura 4-15A). Es decir, las dispersiones con hasta 50 % de trimiristina enfriadas durante 24 h a 4 °C constituyen nanosuspensiones de lípidos en las que la dispersión con 100 % de trimiristina corresponde a SLN y las dispersiones entre 10 % y 50 % de trimiristina constituyen NLC. Las dispersiones enfriadas a 20 °C se mantienen en estado líquido formando nanoemulsiones.

Teniendo en cuenta que en dispersiones al 5 % de trimiristina las partículas están bien separadas unas de otras, puede descartarse la formación de fases de cristal líquido presentes en dispersiones con concentraciones de trimiristina ≥ 12 % (Gehrer et al., 2014), las que podrían influenciar el comportamiento térmico de las partículas individuales. El evento térmico de fusión de las dispersiones se observa solo a proporciones de trimiristina mayores al 50 % y ocurre a temperaturas inferiores a las observadas en las mezclas a granel (ver inserto de la Figura 4-12A). En consecuencia, la dificultad de las dispersiones para solidificar a medida que aumenta la proporción de TCC, puede atribuirse al comportamiento metaestable previamente discutido para la mezcla de lípidos y al aumento del subenfriamiento resultado de dispersar un líquido en un gran número de pequeñas gotas (Phipps, 1964).

Todos los sistemas lipídicos estudiados presentan un único evento discreto de fusión, contrario a reportes previos en los que, los eventos de fusión de nanopartículas se caracterizan por un comportamiento de fusión expresado por múltiples picos discretos (una señal dentada) que corresponden a la fusión de partículas que difieren en el grosor de sus estructuras lamelares de la red cristalina (Bunjes et al., 2000; Tobias Unruh et al., 2002). Sin embargo, una comparación directa de los comportamientos no es del todo posible debido a las diferencias en la composición de las dispersiones, en

particular, al agente estabilizante (lecitina de soya, glicolato de sodio y glicerol) y a las condiciones experimentales durante el análisis térmico, en ese caso, la velocidad de calentamiento ($0.04 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ y $0.1 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$). En adición, dichas diferencias también podrían ser el resultado de una estrecha distribución del tamaño de la partícula como consecuencia del método de preparación de las dispersiones de nanopartículas, de modo similar a lo observado con tratamientos térmicos (autoclave) posteriores a la preparación de dispersiones de nanopartículas de trimiristina estabilizadas con P188, donde los múltiples picos presentes en el evento de fusión desaparecen con el tratamiento térmico (Göke et al., 2018, 2016).

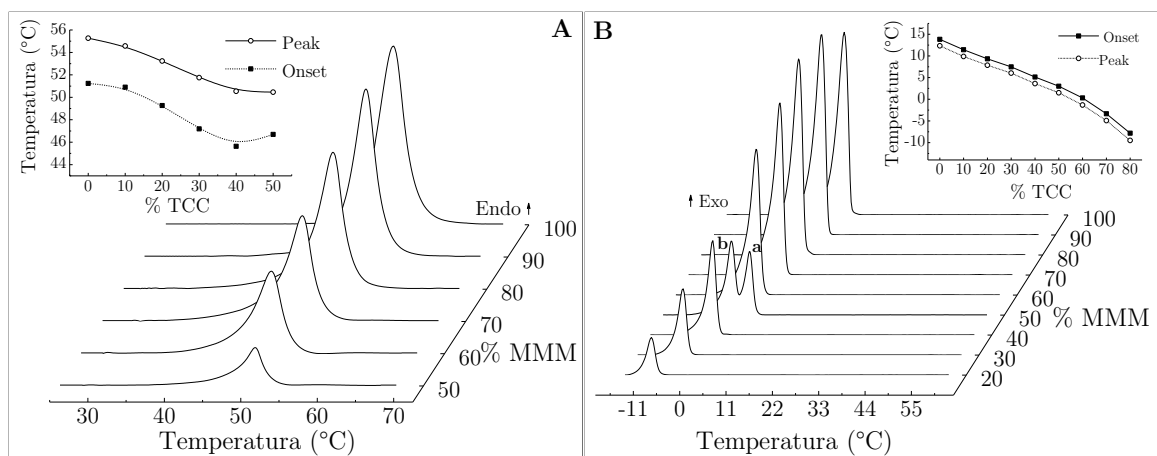


Figura 4–12. Transiciones térmicas de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

(A) calentamiento y (B) enfriamiento. Los termogramas se muestran solo hasta $-16 \text{ }^\circ\text{C}$ puesto que a temperaturas inferiores se presenta la congelación de la fase acuosa.

Respecto al comportamiento bajo enfriamiento (Figura 4–12B), el evento de cristalización de las gotas se observa hasta proporciones del 80 % de TCC y contrario al comportamiento de solidificación de las mezclas a granel, se evidencia un único evento en todos los termogramas, salvo en la proporción al 50 %, de la que se hablará más adelante. Tal y como se podría esperar, el subenfriamiento aumenta a medida que disminuye la proporción de trimiristina en la mezcla. Además de la ausencia de los eventos térmicos II y III durante el enfriamiento, las señales tanto de fusión como de cristalización de las dispersiones son un poco más estrechas y no ensanchan con el aumento de TCC en la dispersión, es decir, la diferencia entre el inicio y la velocidad máxima de la transición permanece prácticamente invariable (ver insertos de las Figuras 4–12A y 4–12B). El valor promedio entre el comienzo de la transición y la velocidad máxima de fusión para la dispersión con 100 % de trimiristina es de

52.84 °C, es decir, aproximadamente 5 °C inferior a la temperatura de fusión observada para la trimiristina a granel.

Para interpretar el comportamiento térmico de los sistemas lipídicos con respecto a las mezclas a granel, es necesario conocer los mecanismos que dirigen el proceso de cristalización en sistemas dispersos. Generalmente, el proceso de cristalización se divide en cuatro etapas. La primera es considerada la etapa de inducción, en la que la fase líquida debe alcanzar la zona de sobresaturación en donde la fuerza motriz para una transición líquido-sólido está dada por la diferencia en el potencial químico ($\Delta\mu$) entre una molécula de trimiristina en el estado líquido y una molécula en el estado sólido, $\Delta\mu = RT \ln \beta$, siendo T la temperatura y R la constante de los gases. La relación de sobresaturación $\beta = \frac{C}{C^*}$, indica la solubilidad del componente de cristalización en condiciones saturadas C^* , e insaturadas C . Para fases líquidas fundidas $\Delta\mu$ puede ser descrito en términos del subenfriamiento de la zona metaestable como $\Delta\mu = \frac{T_m - T}{T_m}$. Una vez es alcanzada la fuerza motriz para superar la barrera energética ocurre la etapa de nucleación en donde las moléculas en el estado líquido se unen para crear un núcleo estable, esta etapa constituye el paso limitante de velocidad para la cristalización en sistemas coloidales. Después de la formación de un núcleo estable, ocurre una rápida transición a la etapa de crecimiento cristalino durante la cual moléculas adicionales o unidades de crecimiento se incorporan a la red cristalina, disminuyendo la fuerza motriz de sobresaturación. El crecimiento continúa hasta que el sistema alcanza el equilibrio; en esta última etapa, la fuerza motriz para la cristalización se acerca a cero y se obtiene el volumen máximo de la fase cristalina (Fontenele et al., 2015; Povey, 2014).

La teoría clásica establece que la etapa de nucleación comprende la formación de un dominio ordenado capaz de reducir la energía y la entropía del sistema a través de un núcleo sólido de cierto volumen estable y de un incremento en la energía en virtud de la creación de una interfase entre el dominio ordenado y el líquido desordenado. Por lo tanto, para iniciar el proceso de cristalización se requiere de un tamaño crítico del dominio ordenado capaz de superar la barrera energética debida al aumento de la energía de interfase.

La velocidad de nucleación para un proceso homogéneo, J , está dada por el producto de la frecuencia de colisión en un sistema de N moléculas cristalizables junto con un factor de barrera cinética que retrasa la cristalización y la pérdida de entropía asociada con la formación de un núcleo (Kloek et al., 2000; Povey, 2014):

$$J = N \frac{k_B T}{h} e^{\left(\frac{-\alpha \Delta S_m}{R}\right)} e^{\left(\frac{-\Delta G_c}{k_B T}\right)} \quad (4-5)$$

En donde J es el número de núcleos formados por segundo por unidad de volumen. El factor pre-exponencial $N \frac{k_B T}{h}$, describe la frecuencia máxima de colisión, k_B es la constante de Boltzmann y h la constante de Planck. El primer factor exponencial considera los efectos estéricos en los que las moléculas tienen que estar en la conformación adecuada antes de que puedan ser incorporadas en un núcleo y describe la probabilidad de que una fracción α de la molécula esté en la conformación correcta antes de que puedan ser incorporadas en un núcleo. Depende de la pérdida de entropía, ΔS_m , durante la incorporación de las moléculas al núcleo, la que a su vez está dada por $\Delta S_m = \frac{\Delta H_m}{T_m}$. Este término es importante debido al gran número de conformaciones posibles de las cadenas alifáticas de los triglicéridos. El segundo término exponencial corresponde a la energía de activación de Gibbs, ΔG_c , para la formación de un núcleo de tamaño crítico (Ecuación 4-2).

Asumiendo que probablemente solo un único núcleo inicia la cristalización en cada gota, entonces la velocidad de cristalización de cada gota es una medida directa de la velocidad de nucleación. Por otro lado, también es probable que ocurran varios eventos de nucleación simultáneos dentro de una gota, lo que daría cuenta del aspecto policristalino observado en las gotas solidificadas de la mayoría de las dispersiones (Phipps, 1964). Sin embargo, la velocidad de nucleación puede medirse a partir de la fracción del volumen de triglicérido sólido, φ , en función del tiempo, t , asumiendo que el tiempo promedio necesario para un evento de nucleación es mucho mayor que el tiempo necesario para conseguir la cristalización completa de la gota. La velocidad de cristalización será proporcional a la fracción de volumen de gotas que no contienen cristales (φ) y por lo tanto disminuye con el tiempo (Kloek et al., 2000; Povey, 2014):

$$\frac{d\varphi}{dt} = \kappa(1-\varphi) \quad (4-6)$$

en donde κ es la constante de velocidad de nucleación y representa la frecuencia de nucleación en una gota de volumen V , entonces $\kappa=JV$. Resolviendo la Ecuación 4-6,

$$\varphi=1-e^{-\kappa t} \quad (4-7)$$

De la Ecuación 4-7 se deduce que la disminución en el volumen de las gotas en una dispersión de lípidos reduce la fracción del volumen de sólido en un determinado tiempo. Por lo tanto, la temperatura requerida para la cristalización de las gotas de trimiristina es menor que la temperatura requerida para la cristalización de la trimiristina a granel, es decir, se produce un aumento del subenfriamiento en las dispersiones en el rango submicrométrico de las dispersiones de lípidos, tal y como se observa en la zona metaestable de sobresaturación de la Figura 4-13.

Por otro lado, si el proceso de nucleación es heterogéneo, no es posible modelar la velocidad de cristalización puesto que el número de impurezas en cada gota puede variar con el diámetro. Es decir, en tamaños de gota relativamente grandes, es posible encontrar un número importante de impurezas distribuidas aleatoriamente que inducen la nucleación. La fracción de volumen máxima de gotas sólidas (φ_{max}) está relacionada con el número de impurezas por unidad de volumen mediante la expresión:

$$\varphi_{max}=1-e^{-VN_{imp}} \quad (4-8)$$

en donde N_{imp} es el número de impurezas catalíticas por gota. Sin embargo, conforme el tamaño de gota disminuye, la probabilidad de encontrar impurezas en las gotas se va reduciendo y en ese caso, la cristalización comienza a ser dominada por procesos de nucleación homogénea.

Asumiendo que el diámetro de las gotas es de aproximadamente 200 nm en las dispersiones con diferentes proporciones de TCC (ver Figura 4-1) y despreciando la distribución del tamaño de las gotas, es decir, la fracción de volumen de gotas con tamaños entre $d\pm\delta d$, la reducción en la temperatura de cristalización de las dispersiones a medida que aumenta la proporción de aceite en la mezcla debería estar asociada a otros factores diferentes al volumen.

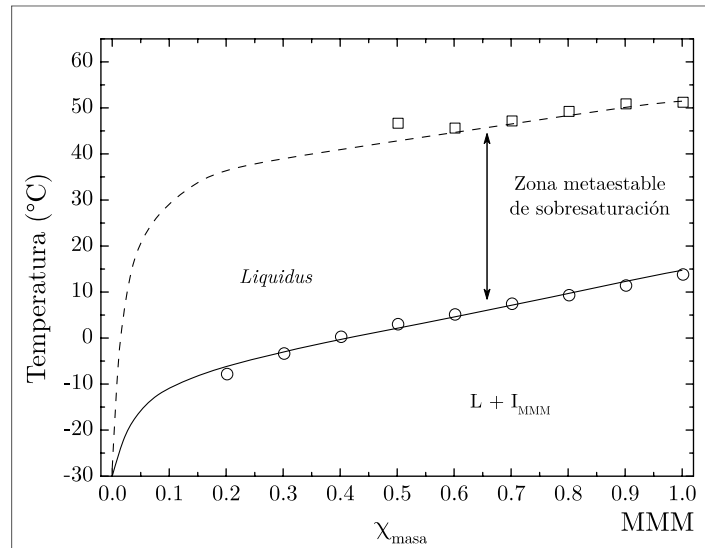


Figura 4-13. Zona metaestable de sobresaturación para los sistemas lipídicos enfriados a 4 °C.

Probablemente, el aumento progresivo del TCC en la mezcla genera la dilución de las moléculas cristalizables de trimiristina. Puesto que el número de núcleos formados por segundo por unidad de volumen en una gota depende de factores cinéticos y termodinámicos, la fuerza motriz de sobresaturación que dirige el proceso cristalización disminuye debido a la menor cantidad de trimiristina disuelta. Por lo tanto, también disminuye la frecuencia de colisión entre las moléculas de este lípido con la conformación adecuada para producir una agrupación lo suficientemente estable en el tiempo que permita la formación de un núcleo cristalino. Como resultado, disminuye la velocidad de cristalización J , es decir, si el volumen de la gota se mantiene constante, pero disminuye el número de núcleos formados por segundo por unidad de volumen, entonces la constante de velocidad disminuye dando lugar a un aumento del subenfriamiento de la dispersión, por lo que, para mantener el crecimiento de núcleos cristalinos se requiere compensar el factor de energía libre de Gibbs bajando la temperatura del sistema.

Por otro lado, si se asume que la distribución de impurezas es igual en todas las dispersiones, el tamaño medio de las impurezas por gota capaces de iniciar la nucleación debe ser inferior a 200 nm. Sin embargo, la probabilidad de encontrar impurezas de tales tamaños en las dispersiones es bastante reducida, teniendo en cuenta la estabilidad de las dispersiones por más de dos años. En consecuencia, cuando la temperatura disminuye lo suficiente para compensar la energía libre de superficie,

σ , la nucleación podría ser inducida a nivel de superficie (Povey, 2014) en un proceso catalizado por los grupos hidrófobos del P188.

La entalpía de transición de los termogramas de fusión y de cristalización para las dispersiones enfriadas a 4 °C se calcula a partir de la cantidad relativa de trimiristina obtenida con respecto a la línea *liquidus* superior de la Figura 4-13. Durante la fusión, el valor de la entalpía permanece relativamente constante en aproximadamente 120 kJ · mol⁻¹ hasta el 40 % de TCC en donde la entalpía se reduce hasta aproximadamente 55 kJ · mol⁻¹ (Figura 4-14A y Anexo B, Tabla B-7), es decir, contrario a las mezclas a granel, no se observa un aumento de la entalpía a elevadas proporciones de TCC.

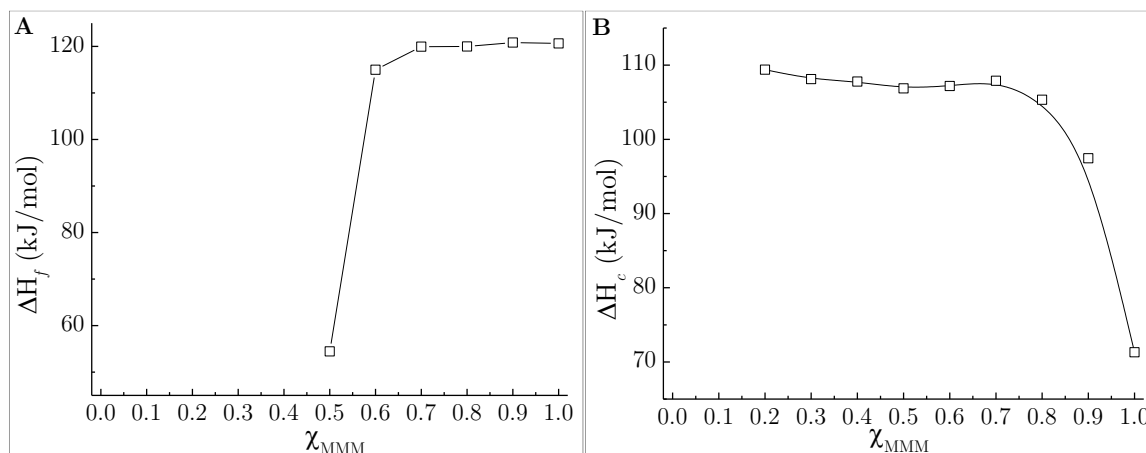


Figura 4-14. Entalpía de fusión (A) y de cristalización (B) para las dispersiones enfriadas a 4 °C. La entalpía de cristalización de la dispersión al 50 % se calcula a partir del cociente de la suma de las señales **a** y **b** en el termograma de la Figura 4-12B, sobre la cantidad relativa de trimiristina obtenida a partir de la línea *liquidus* superior de la Figura 4-13.

Respecto al comportamiento térmico bajo calentamiento de la nanosuspensión con 50 % de trimiristina, se debe considerar que la fracción de gotas que no contienen cristales aumenta con el tiempo (Ecuación 4-7), en particular, debido a la reducción de la fuerza motriz para la nucleación dada por $\Delta\mu$. Por lo tanto, es posible afirmar que el tratamiento térmico (4 °C y 24 h) no fue suficiente para cristalizar toda la trimiristina disponible en dicha dispersión. Esta afirmación se refleja en el termograma de la Figura 4-12A, donde el evento de fusión no sigue el mismo comportamiento que las dispersiones con menor proporción de TCC. Además, durante la etapa de cristalización, la suma de los picos **a** y **b** de la dispersión al 50 % se ajusta a la

tendencia de la curva seguida por la entalpía del resto de las dispersiones (Figura 4–14B).

Adicionalmente, los termogramas de cristalización de las dispersiones enfriadas a 20 °C (Figura 4–15) muestran una única señal para la dispersión con 50 % de TCC que corresponde a la señal a menor temperatura (denotada por **b**) del termograma de enfriamiento de las dispersiones enfriadas a 4 °C. De otro lado, como se presenta en la Figura 4–15B, la entalpía asociada al proceso de cristalización de las dispersiones subenfriadas (aquellas enfriadas a 20 °C) muestra el mismo comportamiento de las dispersiones enfriadas a 4 °C, lo que sugiere que la cristalización en ambos casos procede a partir del mismo mecanismo.

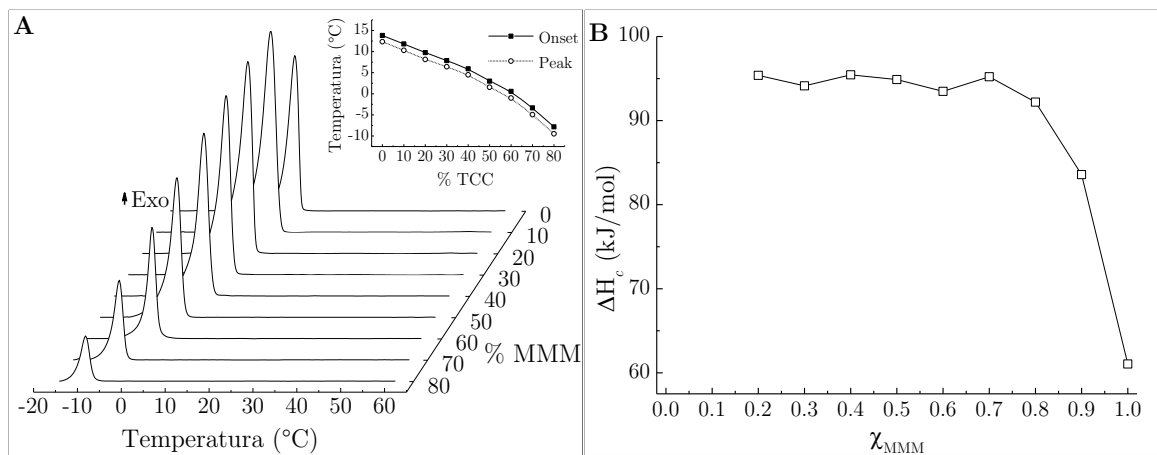


Figura 4–15. Transiciones térmicas de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 20 °C. En A) se muestran los termogramas de solidificación y en B) se muestran las entalpías para cada evento, calculadas a partir de la cantidad relativa la trimiristina a 10 °C.

Este comportamiento podría estar relacionado con la velocidad de enfriamiento del sistema y el proceso de nucleación generado. Bajo condiciones de enfriamiento lento (4 °C en refrigerador durante 24 h) probablemente se produce la solidificación homogénea (sin la asistencia del agente estabilizante) de una parte de la trimiristina disuelta en la fase líquida, a partir de un único núcleo. Durante el enfriamiento, se induce la solidificación de la trimiristina restante de acuerdo con la línea *liquidus* inferior de la Figura 4–13. Por lo tanto, durante la fusión de dicha dispersión el evento térmico se produce a temperaturas más altas y con menor entalpía. De hecho, en un segundo ciclo de fusión y solidificación el comportamiento se mantiene (Figura 4–16), por lo que es válido suponer que se conserva el efecto de memoria cristalina, en el que

las moléculas de trimiristina formando el primer cristal, se reasocian con mayor facilidad durante la etapa de enfriamiento.

La dependencia del proceso de cristalización de la trimiristina con el tiempo de enfriamiento a 4 °C se verifica manteniendo las dispersiones durante mayor tiempo a baja temperatura. En la Figura 4–16A se muestran los termogramas para una dispersión con 50 % de TCC enfriada durante 48 h. Durante el primer ciclo de calentamiento y enfriamiento se observa que la señal denotada por **a** es mucho mayor que la señal denotada por **b**, lo que demuestra que la fracción de gotas que no contienen cristales de trimiristina se ha reducido. El efecto de memoria cristalina se verifica durante el segundo ciclo, en el cual, durante la etapa de calentamiento es posible evidenciar dos señales solapadas con respecto a la única señal presente durante el primer ciclo. Además, durante en el segundo ciclo, el calor normalizado de los eventos de fusión y de solidificación son prácticamente iguales lo que confirma el efecto del tiempo sobre la fracción de volumen de gotas solidificadas, es decir, durante el primer ciclo de enfriamiento todas las moléculas de trimiristina cristalizables solidifican, de modo que durante el segundo ciclo de enfriamiento y calentamiento los eventos de fusión y de cristalización deben ser equivalentes, tal y como se observa en el segundo ciclo para la dispersión mantenida a 20 °C (Figura 4–16B).

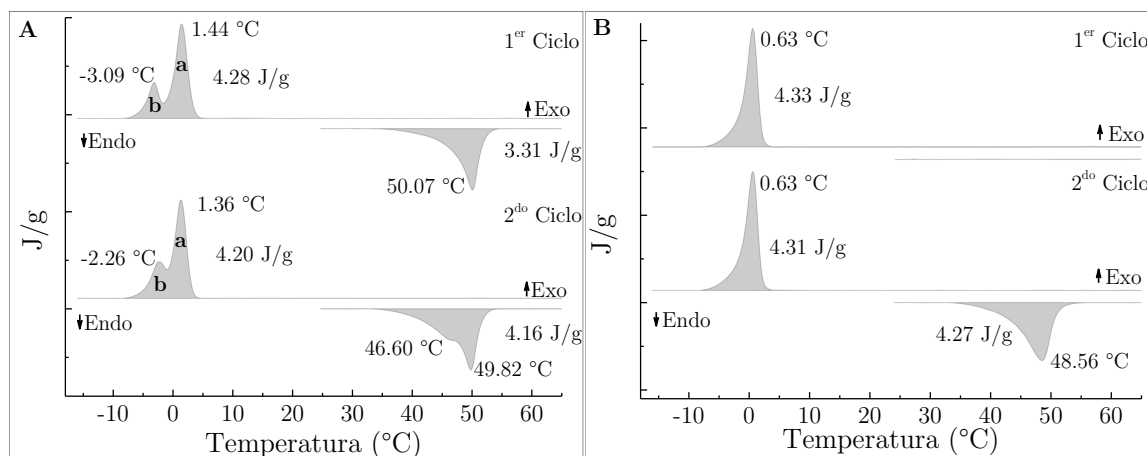


Figura 4–16. Comportamiento térmico para la dispersión preparada con 50 % de TCC.

A) la dispersión enfriada a 4 °C durante 48 h y B) la dispersión enfriada a 20 °C.

De otro lado, la relación entre la entalpía de fusión y la entalpía de cristalización puede ser considerada como un indicador del grado de cristalinidad de la matriz

lipídica y por lo general, se calcula de acuerdo con la siguiente Ecuación 4–9 (Ban et al., 2014; De Souza et al., 2012; Freitas y Müller, 1999; Kovačević et al., 2014):

$$CI(\%) = \frac{\Delta H_{f(NP)}}{\Delta H_{f(MMM)} \times \chi_{FL(masa)}} \times 100 \quad (4-9)$$

En donde CI es el índice de cristalinidad, $\Delta H_{f(NP)}$ es la entalpía de fusión de las nanopartículas obtenida a partir del cociente del área bajo la curva de la curva de fusión sobre la masa de nanopartículas, $\Delta H_{f(MMM)}$ es la entalpía de fusión de la trimiristina pura y $\chi_{FL(masa)}$ es la fracción total de la fase lipídica.

Sin embargo, $\chi_{FL(masa)}$ puede ser considerada como la fracción de la fase lipídica resultado de la suma del lípido sólido y el lípido líquido (5 %). Desde otra perspectiva, $\chi_{FL(masa)}$, corresponde solamente a la fracción del lípido sólido, $\chi_{LS(masa)}$, en la matriz lipídica, $\chi_{FL(masa)} \times \chi_{LS(masa)}$, la que varía según la muestra preparada. De otro lado, dado que la entalpía de las transiciones de las dispersiones del presente estudio ya considera la concentración de lípidos en la fase acuosa, en este caso, para calcular el índice de cristalinidad basta con dividir la entalpía de las dispersiones sobre la entalpía de la trimiristina pura. El comportamiento del índice de cristalinidad teniendo en cuenta las tres posibilidades de cálculo se muestra en la Figura 4–17.

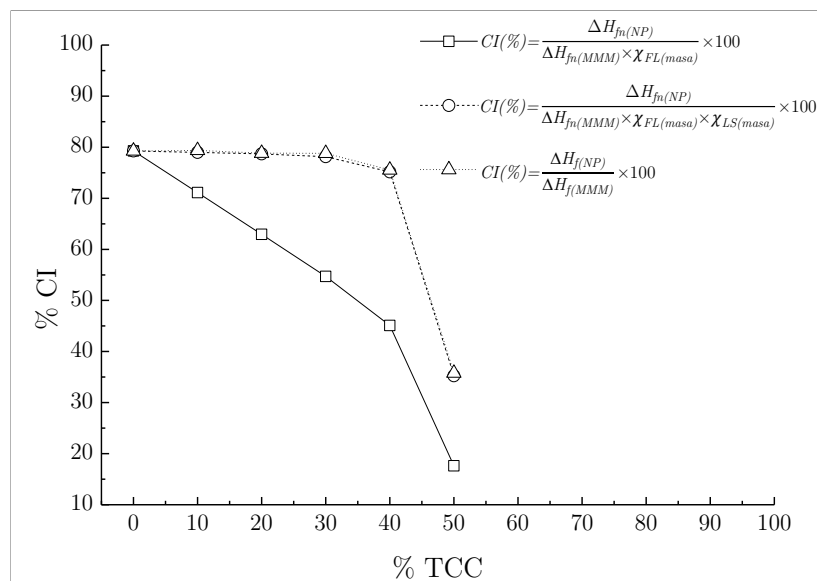


Figura 4–17. Índice de cristalinidad de las dispersiones calculado con diferentes ecuaciones.

El índice de cristalinidad calculado de acuerdo con la Ecuación 4–9, asumiendo $\chi_{FL(masa)}$ como la fracción total de lípidos en las dispersiones (5 %), muestra una reducción lineal de la entalpía a medida que aumenta la concentración de TCC, lo que sugiere que la mezcla de lípidos forma una solución sólida. Sin embargo, teniendo en cuenta el diagrama de fases de la Figura 4–13, no es posible asumir que la mezcla binaria de TCC y trimiristina forme una solución sólida durante el proceso de solidificación, por lo tanto, la Ecuación 4–9 no se ajusta al comportamiento de esta mezcla binaria.

En este caso, si en el cálculo se tiene en cuenta solo la fracción de trimiristina en la mezcla corregida o no con respecto al diagrama de fases de la Figura 4–13, es decir, el índice de cristalinidad calculado a partir de las entalpías de fusión de la Figura 4–14A, el índice de cristalinidad se mantiene relativamente constante en un valor cercano al 80 % en las dispersiones con hasta el 40 % de TCC (Anexo B, Tabla B-9). Dado que en la dispersión con 50 % de TCC la fracción de gotas que no han cristalizado es considerable, la entalpía de fusión para esta dispersión es menor, por lo que el índice de cristalinidad también lo es.

La reducción en el índice de cristalinidad se ha asociado con una alteración de la estructura interna del lípido sólido que la hace menos ordenada (Anantachaisilp et al., 2010; Chantaburanan et al., 2017; Freitas y Müller, 1999; Keck et al., 2014a; Kovačević et al., 2011; Seetapan et al., 2010; Severino et al., 2011a; Shah y Pathak, 2010; Teeranachaideekul et al., 2008; Varshosaz et al., 2012). Sin embargo, índices de cristalinidad del 80 % también podrían indicar que una parte de la trimiristina no ha cristalizado o se encuentra en estado amorfo, particularmente en la interfase entre la partícula y el agente estabilizante. Es decir, en la interfase se insertan los grupos PPO (monómeros de polioxipropileno) del P188 en la red cristalina de la trimiristina tal y como se ha sugerido en las investigaciones con nanopartículas lipídicas estabilizadas con poliglicerol 6-diestearato o con glucósido de caprililo/caprilo donde se estimaron índices de cristalización mayores para el estabilizante con cadenas alifáticas más largas, es decir, poliglicerol 6-diestearato (Kovačević et al., 2011). Igualmente, estos índices de cristalinidad del 80 % podrían resultar de las diferencias en la capacidad calorífica del crisol de muestra y el crisol de referencia. Aun así, llama la atención que

el índice de cristalización se mantenga prácticamente constante (en realidad hay una ligera disminución conforme aumenta la proporción de TCC), lo que podría confirmar que la trimiristina en las nanopartículas lipídicas cristaliza en una fase separada del TCC y, además, lo hace en la misma forma polimórfica. Cuando la proporción de TCC aumenta hasta cierto valor, los grupos PPO probablemente se insertan en una fase líquida de TCC ubicada en la superficie de los cristales de trimiristina al interior de la partícula.

De otro lado, porcentajes de cristalinidad mayores al 100 % han sido asociados a sistemas de lípidos gelificados en donde se asume que toda la fracción lipídica está en estado sólido (Freitas y Müller, 1999). No obstante, ninguna de las dispersiones del presente estudio evidenció gelificación o algún otro signo de inestabilidad, por lo menos durante seis meses. Incluso, al cabo de dos años de almacenamiento las dispersiones que presentaron separación de fases fueron fácilmente redispersables manteniendo el tamaño e índice de polidispersidad inicial (véase la Figura 4-2).

Sin embargo, debe tenerse presente que el comportamiento térmico de las dispersiones de lípidos (SLN y NLC) depende en gran medida de si para el ensayo se emplean muestras en estado líquido o muestras en estado sólido. Dado que varios reportes emplean muestras liofilizadas para la caracterización por DSC (Fang et al., 2015, 2008; Farboud et al., 2011; Li et al., 2010; Lin et al., 2007; Varshosaz et al., 2012; Venkateswarlu y Manjunath, 2004), la interpretación de los valores para las temperaturas de las transiciones térmicas y para las entalpías debe hacerse con sumo cuidado debido a que en muestras liofilizadas, además de los lípidos en estado sólido, también se encuentran los agentes estabilizantes, los agentes crioprotectores, y de ser el caso, las moléculas activas en la fase acuosa no atrapadas por las partículas lipídicas.

Finalmente, los resultados del análisis térmico de las dispersiones demuestran que es posible desarrollar sistemas coloidales tipo emulsión y tipo particulado (SLN, NLC y NE) garantizando la misma composición y empleando la técnica modificada de emulsificación-difusión como método de preparación. En particular, el enfriamiento a 4 °C solo es suficiente para asegurar la cristalización de las dispersiones con 40 % de TCC, la proporción al 50 % solo cristaliza parcialmente y a proporciones mayores de TCC las mezclas binarias no cristalizan. Adicionalmente, el análisis térmico indica

que las mezclas binarias entre la trimiristina y el TCC conducen a la formación de una mezcla eutéctica en la que la trimiristina cristaliza como un sólido puro rodeado de una fase líquida formada por trimiristina disuelta en el TCC, tal y como se ha sugerido en estudios previos en donde si bien se asume que las moléculas del TCC podrán ser incluidas en la red cristalina, la mayoría deberán estar en la forma de un dominio separado de las partículas (Garcia-Fuentes et al., 2005). Por lo tanto, las mezclas binarias de triglicéridos usadas para preparar NLC no garantizan la obtención de una solución sólida ya que en la mayoría de los casos se obtienen mezclas eutécticas.

4.2.2 Densidad y estabilidad de las dispersiones frente a fuerzas centrífugas

Los resultados del ensayo de estabilidad de los sistemas lipídicos bajo estudio frente a fuerzas centrífugas, indica que el estado físico de las dispersiones afecta su patrón de separación de fases (Figura 4-18), el cual conserva las características de separación de fases de las dispersiones almacenadas durante dos años mostrado en la Figura 4-4. El patrón de separación de fases se hace evidente en la densidad de las dispersiones enfriadas a 4 °C con respecto a las dispersiones enfriadas a 20 °C, tal como se presenta en la Figura 4-19.

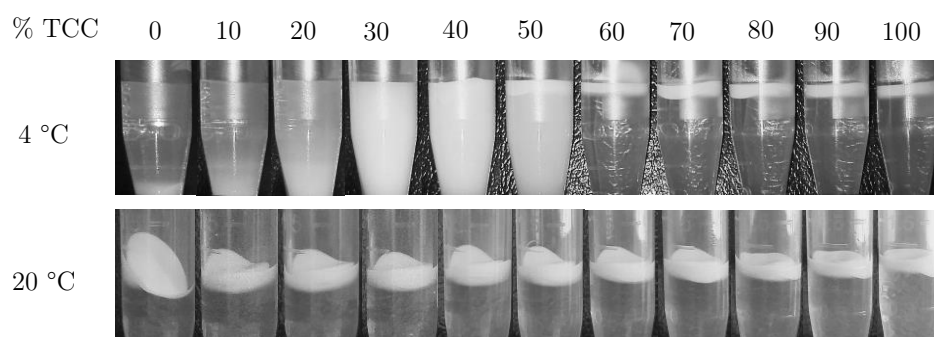


Figura 4-18. Comportamiento de las dispersiones de lípidos bajo centrifugación.

La densidad de las dispersiones enfriadas a 4 °C disminuye a medida que aumenta la proporción de TCC hasta el 50 %. A proporciones de TCC superiores las dispersiones independientemente de la historia térmica inducida se comportan de la misma manera. Por otro lado, la densidad de las dispersiones enfriadas a 20 °C aumenta linealmente con la proporción de TCC, es decir, las suspensiones de nanopartículas (SLN y NLC)

tienen mayor densidad que las emulsiones y, por lo tanto, las emulsiones flotan mientras que las suspensiones sedimentan.

Además, la diferencia de densidad entre las dispersiones enfriadas a 4 °C indica que la estructura de las partículas cambia durante la solidificación. Una de las razones podría ser que durante el enfriamiento y posterior solidificación, una mayor cantidad de moléculas de P188 migra de la fase acuosa a la superficie de las partículas sólidas formadas provocando una disminución de la densidad de la solución inicial de P188 al 2.5 % p/v debido a que la cantidad de moléculas del polímero libre se reduce. La elevada estabilidad de las dispersiones al 30 % y 40 % de TCC es una evidencia de que la densidad de estas partículas es similar a la densidad de la fase continua. En esta misma línea de análisis, en el caso de las emulsiones, la cantidad de P188 adsorbida en la superficie debe ser mucho menor para mantener valores de densidad inferiores a los de la fase continua que les permitan flotar.

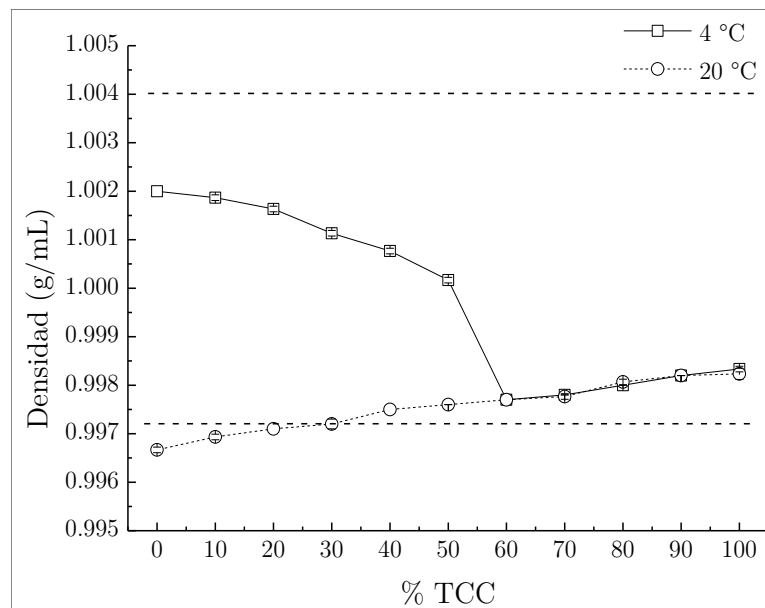


Figura 4–19. Densidad de las dispersiones respecto al estado físico y a la proporción de TCC. La línea punteada superior indica la densidad de una solución de P188 al 2.5 % p/v y la línea punteada inferior indica la densidad del agua a 25 °C.

La reducción lineal de la densidad conforme aumenta la proporción de TCC en la mezcla es otro indicador que apoya la hipótesis de que las moléculas del TCC no se incorporan en la red cristalina del lípido sólido (Jores et al., 2005). Incluso, en reportes previos (García-Fuentes et al., 2005) la sedimentación de las partículas conteniendo

TCC se ha considerado como una evidencia de la asociación del TCC en las nanopartículas, teniendo en cuenta que el triglicérido tiene menor densidad que el agua, por lo tanto, éste debería cremar si se encontrará libre en la dispersión. De hecho, los análisis por $^1\text{H-NMR}$ indican que la incorporación del aceite no interfiere con la cristalización del lípido sólido (tripalmitina), lo que sugiere la formación de una fase líquida separada de la fase sólida en la partícula. En otros casos, la separación de fases de las dispersiones lipídicas, a pesar de estar en el estado sólido presentan flotación en vez de sedimentación y, además, la separación de fases disminuye a medida que aumenta la proporción de aceite. Tal comportamiento también ha sido asociado a la diferencia de densidades de la fase acuosa y de las partículas (Ban et al., 2014). Además, por lo general, los triglicéridos monoácidos en el estado líquido tienen mayor densidad que en el estado sólido (Sato y Ueno, 2005).

Debido al mayor empaquetamiento característico de las moléculas pequeñas, los triglicéridos compuestos de cadenas alifáticas cortas tienen mayor densidad ($0.94\text{--}0.95\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ para el TCC (Rowe et al., 2009)) que los triglicéridos compuestos de cadenas alifáticas largas ($0.862\text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ para la trimiristina (Sharma et al., 2004)). Por tal razón, la densidad de las dispersiones preparadas con 100 % de TCC es mayor que la densidad de las dispersiones subenfriadas preparadas con 100 % de trimiristina. De hecho, en el estado líquido, las moléculas de TCC exhiben temperaturas de transición térmica más elevadas que las moléculas de trimiristina (Hsu y Violi, 2009) como resultado de una estructura altamente empaquetada en el estado líquido que requiere de mayor energía durante un cambio de fase.

Lo anterior explica el comportamiento de las mezclas binarias en donde se evidencia el aumento lineal de la densidad a medida que aumenta la proporción de TCC en las dispersiones. Adicionalmente, en la Figura 4-18 la dispersión de sistemas lipídicos enfriada a $4\text{ }^\circ\text{C}$ y preparada con 50 % de TCC presenta una capa en la superficie probablemente formada por partículas con una fracción elevada de gotas que no contienen cristales, congruente con el comportamiento térmico de dicha dispersión. Tales gotas probablemente tienen tamaños más pequeños y por lo tanto, mayor subenfriamiento, lo que influye en la velocidad de cristalización. Esto último podría

confirmar que en las dispersiones coloidales de lípidos el proceso de nucleación y posterior cristalización ocurre independientemente en cada gota (Dyett et al., 2018).

4.2.3 Difracción de rayos X

Hasta ahora, podemos señalar que las mezclas binarias entre la trimiristina y el TCC producen una mezcla eutéctica en la que la trimiristina cristaliza separada del TCC, dando lugar a la formación de una partícula bifásica formada por una fase cristalina de trimiristina y una fase líquida compuesta de trimiristina disuelta en TCC. Por lo tanto, la interpretación exacta de los termogramas de DSC de las nanopartículas de trimiristina y TCC y la correcta asignación de las formas polimórficas presentes requiere el conocimiento de las modificaciones cristalinas de la trimiristina. La asignación correcta de estas modificaciones cristalinas es la base para la evaluación del curso temporal de las transiciones polimórficas y el cálculo del índice de cristalización a partir de la entalpía de fusión determinado termoanalíticamente (Siekmann y Westesen, 1994).

De otro lado, el conocimiento de la cristalinidad es de relevancia especial para evaluar la incorporación de fármacos en la matriz del triglicérido. Un fármaco que puede ser soluble en altas proporciones en un triglicérido o en una mezcla de estos, podría ser expulsado de la matriz durante la recristalización si no es capaz de “acomodarse” en la red cristalina. Por lo tanto, una estimación adecuada de la estructura interna de la partícula, incluyendo los polimorfos presentes, es esencial para entender la capacidad de carga y el comportamiento de liberación de estos sistemas coloidales.

En general, las moléculas de triglicéridos saturados adoptan una conformación y disposición ideal en relación con sus vecinas para optimizar las interacciones intramoleculares e intermoleculares y lograr un empaquetamiento eficiente. En triglicéridos, normalmente son encontrados tres polimorfos fundamentales denominados α , β' y β , cada uno caracterizado por su estabilidad térmica, empaquetamiento de la subcelda y estructura de la longitud de cadena. El polimorfo más estable y de mayor punto de fusión es el polimorfo β , seguido de β' y finalmente de α , siendo este último el menos estable y con menor punto fusión. La estructura de la subcelda define el modo de empaquetamiento lateral de las cadenas alifáticas

(Hagemann y Rothfus, 1983; Marangoni et al., 2012; Sato, 2001) y se representan esquemáticamente en la Figura 4–20.

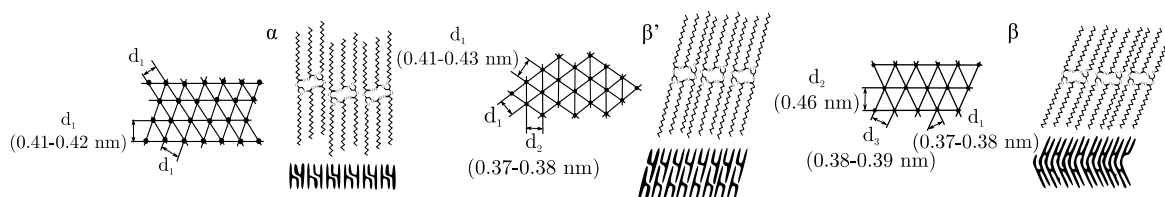


Figura 4–20. Representación esquemática de los polimorfos comunes de los triglicéridos.

Adaptado a partir de (Fontenele et al., 2015; Tran y Rousseau, 2016).

En el polimorfo α la estructura de la subcelda de la red bidimensional es hexagonal (H) y da lugar a un patrón intenso de difracción de rayos X de amplio ángulo (WAXS) de 0.41–0.42 nm para las distancias de separación de las cadenas alifáticas (espaciamento corto, d), no hay empaquetamiento de cadena y las interacciones específicas cadena–cadena se pierden debido a la capacidad de los átomos de carbono para girar varios grados y lograr conformaciones desordenadas de las cadenas alifáticas. La forma β' tiene una estructura de la subcelda ortorrómbica (O_{\perp}) perpendicular, con una red apretada debido a interacciones cadena–cadena específicas, lo que genera un patrón muy intenso de difracción WAXS de 0.41–0.43 nm y otro de menor intensidad de 0.37–0.38 nm. En el polimorfo β , la red bidimensional es oblicua con una estructura de subcelda triclinica paralela (T_{\parallel}), en donde las cadenas alifáticas están altamente empaquetadas con interacciones cadena–cadena específicas y se caracteriza por un patrón de difracción WAXS intenso en 0.46 nm y dos señales más débiles en 0.37–38 nm y 0.38–0.39 nm (Lawler y Dimick, 2008; Metin y Hartel, 2005; Sato y Ueno, 2005). Además, en el polimorfo β' las cadenas alifáticas están inclinadas con respecto al plano basal cerca de 108° y en el polimorfo β cerca de 128° (Takeuchi et al., 2003).

Algunos valores reportados para el espaciamento largo de la trimiristina se presentan en la Tabla 4-1. El patrón de difracción WAXS de las dispersiones de lípidos enfriadas a 4°C obtenido en fase líquida se muestra en la Figura 4–21. Como se podría esperar, para dispersiones con proporciones de TCC superiores al 50 % y para la solución de

P188 al 2.5 % p/v, no se alcanza a detectar ninguna señal, por lo menos bajo las condiciones de análisis (Tabla 4-2). La ausencia de un patrón de difracción en estas dispersiones es consecuente con el comportamiento térmico previamente observado, en el que las dispersiones con proporciones mayores al 50 % de TCC no alcanzan a solidificar durante las 24 h a 4 °C de almacenamiento.

Tabla 4-1. Valores reportados para el patrón de difracción de espaciamiento corto de la trimiristina.

α	Espaciamiento corto (nm)					Punto de fusión (°C)			Referencia
	β'		β			α	β'	β	
0.414 ms	0.418 ms	0.378 i	0.461 mi	0.384 i	0.368 i	32	44	55.5	(Lutton, 1945)
—	—	—	0.456	0.385	0.372	—	—	—	(Kern, 1953)
0.42	0.422 i	0.38 i	0.46 i	0.39 m	0.37 m	33	46.5	57.0	(Chapman, 1962)
0.42	0.42	0.38	0.46	0.39	0.38	33	46.5	57.0	(Takeuchi et al., 2003)

mi: Muy intenso; i: Intenso; m: Medio

La forma de los difractogramas es característica de un medio altamente amorfo y en particular se debe a que la fase acuosa ocupa cerca del 95 % de la masa analizada, mientras que el material cristalino capaz de difractar los rayos X corresponde a solo una pequeña proporción. De otro lado, los difractogramas de la Figura 4–21 presentan el patrón de difracción WAXS característico de los triglicéridos monoácidos saturados en una configuración polimórfica tipo β , con una señal intensa hacia 0.45–0.46 nm y dos señales débiles hacia 0.36–0.37 nm y 0.37–0.38 nm (Tabla 4-2). La ausencia de una señal intensa hacia 0.41–0.43 nm indica que los polimorfos α y β' no están presentes en las dispersiones o por lo menos, no son detectados bajo las condiciones de ensayo.

La ausencia de polimorfos de baja energía ya ha sido descrita con anterioridad en nanopartículas lipídicas. Así, por ejemplo, nanopartículas preparadas a partir de trimiristina y triestearina estabilizadas con lecitina de soya o Tyloxapol® mostraron patrones de difracción de rayos X de amplio ángulo alrededor de 0.46 nm, 0.385 nm y 0.37 nm, típicas de la forma β , en un rango de tamaños de partícula entre 65 nm y 365 nm. Además, la matriz lipídica de las nanopartículas de trimiristina y triestearina no presentó una reducción en el índice de cristalinidad (Bunjes et al., 2000).

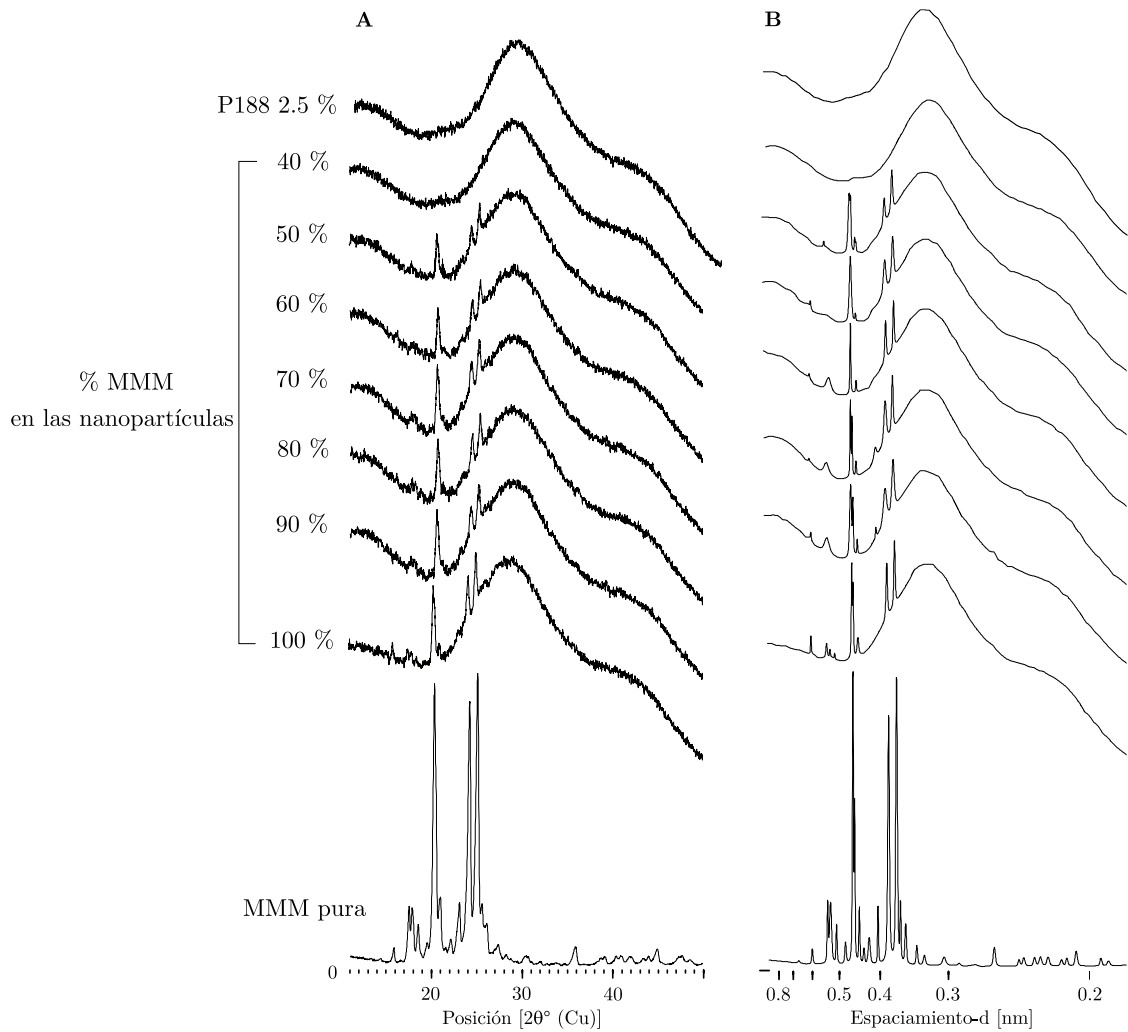


Figura 4–21. WAXS capilar de las dispersiones acuosas de los sistemas coloidales enfriados a 4 °C. La intensidad de todos los difractogramas esta normalizada. En A se muestran los difractogramas crudos en función de la posición 2θ y en B se presentan los difractogramas procesados con el software HighScore Plus 3.0e usado para identificar cada una de las señales de difracción en función del espaciamiento corto.

La ausencia de polimorfos de baja energía tiene origen en el proceso de solidificación de las gotas de lípidos fundidas. Dado que la forma α tiene la tendencia a ser transformada rápidamente a una forma con un mejor empaquetamiento de las cadenas alquílicas, la transición del líquido (lípidos fundidos) desde la forma α a la β normalmente transcurre vía el polimorfo β' (Bunjés y Unruh, 2007; Ribeiro et al., 2015). Sin embargo, la transición desde el polimorfo menos estable al más estable no siempre es completa y en ocasiones el producto final puede contener mezclas de los tres polimorfos o incluso, detenerse en un polimorfo de estabilidad intermedia tipo β' ,

como sucede en mezclas de triglicéridos con solubilidad parcial (Lawler y Dimick, 2008; Metin y Hartel, 2005), por ejemplo, en mezclas de triglicéridos cuya diferencia de C_n es de 2 (Simoneau et al., 1993).

Tabla 4-2. Espaciamento corto de la trimiristina en las dispersiones lipídicas en medio líquido.

% MMM	Espaciamento corto (nm)		
P188 2.5 %	–	–	–
40	–	–	–
50	0.4517	0.3785	0.3655
60	0.4508	0.3790	0.3655
70	0.4595	0.3837	0.3703
80	0.4540	0.3805	0.3681
90	0.4540	0.3804	0.3680
100	0.4536	0.3809	0.3671
Trimiristina pura	0.4603	0.3833	0.3693

De modo similar, los lípidos sólidos de bajo peso molecular o lípidos menores, incluyendo lípidos de gran polaridad y con una estructura anfifílica, tales como los diacilgliceroles, monoacilgliceroles, ácidos grasos libres, fosfolípidos y esteroides, pueden modular el proceso de cristalización desde la nucleación hasta los eventos de post-cristalización. En algunos casos promueven la cristalización, mientras que en otros sistemas producen un efecto inhibitorio, lo que se ha atribuido a factores relacionados con la concentración de estos lípidos en la mezcla, las diferencias entre los puntos de fusión, como en el caso de los fosfolípidos, y la similitud en la composición química respecto a los otros lípidos de la mezcla (Ribeiro et al., 2015).

Por el contrario, si una de las especies en una mezcla binaria es un lípido líquido (como en este caso), una cierta cantidad del lípido sólido puede disolverse en el aceite y dado que la solubilidad por lo general aumenta con la temperatura, la cantidad de lípido sólido disuelto será mayor a elevadas temperaturas de procesamiento como sucede con los métodos de homogeneización a alta presión empleados en la preparación de nanopartículas lipídicas. Al disminuir la temperatura de la mezcla, la concentración de saturación aumenta dando inicio al proceso de cristalización en donde se pueden generar diferentes fases sólidas incluyendo formas cristalinas estables y metaestables en equilibrio, lo que depende de la compatibilidad de la mezcla de lípidos y de la presencia de mecanismos capaces de estabilizar en el tiempo las fases metaestables.

También es probable que la mezcla con triglicéridos líquidos favorezca en algunos casos transiciones polimórficas más estables para el lípido sólido debido al incremento en la movilidad de la matriz cristalina. Esto facilita los cambios conformacionales y da como resultado sistemas de fases separadas (Metin y Hartel, 2005) en donde la incorporación de un segundo componente en la red cristalina puede ser difícil de conseguir, ya que incluso las sustancias estructuralmente relacionadas tienden a separarse en fases dentro de la estructura de las partículas (Bunjes et al., 1996).

Puesto que en los difractogramas de la Figura 4-21 no hay señales de polimorfos de baja energía, se puede concluir que para los sistemas lipídicos preparados por el método de emulsificación-difusión, a partir de mezclas binarias de trimiristina y TCC y estabilizados con P188, no hay presentes mecanismos capaces de estabilizar las fases metaestables intermedias. Por lo tanto, es posible suponer que en las dispersiones de las mezclas binarias de trimiristina y TCC coexisten una fase sólida de trimiristina en el polimorfo β en equilibrio con una fase líquida de TCC y trimiristina. Por lo tanto, la reducción en la intensidad de las señales de los difractogramas a medida que se incrementa la proporción de TCC en las dispersiones (ver panel izquierdo de la Figura 4-21) sería consecuencia de una menor cantidad de trimiristina cristalina capaz de difractar los rayos X (según el comportamiento térmico previamente observado) y no de una reducción en el grado de cristalinidad de la mezcla binaria MMM/TCC.

Se presume que pueden existir dos posibles mecanismos en la modulación del proceso de cristalización mediado por lípidos de bajo peso molecular, incluyendo sólidos y líquidos. El primero se basa en la ocurrencia de interacciones entre las moléculas de los lípidos de bajo peso molecular con las moléculas de los triglicéridos de mayor peso molecular. Esto podría dar lugar a un efecto de competitividad estructural que limita la velocidad de transferencia de las moléculas de mayor peso molecular a los sitios de incorporación dentro de la estructura cristalina o, a la incorporación permanente de los triglicéridos de bajo peso molecular en la estructura cristalina de los triglicéridos de alto peso molecular promoviendo el desarrollo de ciertas caras cristalinas.

El segundo mecanismo de cristalización está asociado con la inducción de procesos de nucleación heterogénea en los que los lípidos de bajo peso molecular se organizan separadamente en estructuras micelares actuando como moldes para el proceso de

nucleación heterogénea (Foubert et al., 2004). No obstante, el TCC no tiene la habilidad de formar estructuras micelares y, por lo tanto, no contribuye de manera directa en el proceso de nucleación heterogénea. Consecuentemente, es más probable que el TCC favorezca la transición polimórfica de la trimiristina desde las fases metaestables α y β' hacia la fase β .

Adicionalmente, se ha observado que la adición de bajos porcentajes de tensioactivos a los triglicéridos o a mezclas de triglicéridos, puede cambiar los rangos de fusión y el número y tipo de polimorfos dependiendo de la compatibilidad con el sistema o, por el contrario, afectar la velocidad de transformación sin alterar sensiblemente la red cristalina, esto debido posiblemente a que los tensioactivos podrían estabilizar los polimorfos metaestables retrasando así la transformación a la forma más estable (Lawler y Dimick, 2008; Schubert et al., 2005). El primer efecto ha sido descrito en varias ocasiones en emulsiones en donde la temperatura de cristalización depende de la similitud entre la estructura química del agente estabilizante con la fase cristalina del lípido (Palanuwech y Coupland, 2003). De otro lado, se cree que las moléculas de tensioactivo sobre la superficie de las gotas actúan como molde causando algún alineamiento de las moléculas del lípido cercanas a la interfase, iniciando la nucleación a altas temperaturas. Los efectos de este fenómeno parecen ser más marcados en emulsiones en el rango nanométrico que en emulsiones en el rango micrométrico, debido probablemente, al empaquetamiento apretado de la región hidrófoba de la capa emulsificadora interfacial de las emulsiones en el rango nanométrico (Sonoda et al., 2006).

El impacto del agente tensioactivo sobre las características cristalinas del lípido de la matriz en SLN y NLC ha sido estudiado en varias ocasiones. El uso de agentes tensioactivos con alto punto de fusión, por ejemplo, cerca de 52 °C para el Phospholipon® 80H, parece mantener los lípidos en formas polimórficas de baja estabilidad termodinámica mientras que agentes estabilizantes con bajo punto de fusión, por ejemplo < 0 °C para el Alcolac® PC 75, podrían favorecer transiciones polimórficas más estables (Helgason et al., 2009a). Tal es el caso de SLN preparadas a partir de triestearina y lecitina de alto punto de fusión (lecitinas totalmente hidrogenadas) en donde el lípido de la matriz cristaliza en una estructura polimórfica α y más del 70 % de esta estructura se mantiene así por cerca de seis meses de

almacenamiento (Bunjes et al., 2007). Lo mismo se ha reportado en dispersiones de nanopartículas de trimiristina y triestearina estabilizadas con alcohol polivinílico (PVA) al 5 %, las que pueden permanecer en el polimorfo α durante más de nueve meses debido posiblemente a las elevadas viscosidades de las dispersiones de PVA empleadas o a la inmovilización de las moléculas del triglicérido en la región interfacial. Por lo tanto, dificulta estéricamente la reorientación conformacional de las moléculas del triglicérido que es necesaria para la conversión de α a β (Rosenblatt y Bunjes, 2009) permitiendo que la fase de alta energía pueda ser estable en el tiempo.

Por el contrario, el uso de algunos agentes estabilizantes no iónicos (P188) (Bunjes et al., 2003; Nik et al., 2012) o fosfolípidos de bajo punto de fusión (lecitinas con diferentes grados de purificación) favorecen la rápida transición a la forma más estable β (Bunjes y Koch, 2005). Sin embargo, también se ha aportado evidencia en la que el uso del P188 como agente tensioactivo retrasa la transición desde la forma α a la forma β en SLN preparadas a partir de gliceril behenato contribuyendo de este modo a mantener la estabilidad de la dispersión en el tiempo en una forma polimórfica intermedia β' (Freitas y Müller, 1999). Incluso, se ha reportado que las transiciones de fase del eicosano, al pasar del estado líquido al estado sólido, en SLN estabilizadas con lecitinas de alto y de bajo punto de fusión, no es diferente del comportamiento del lípido a granel (Bricarello et al., 2015). Por lo tanto, el efecto del agente estabilizante sobre el comportamiento cristalino de las nanopartículas lipídicas debe ser evaluado en cada caso particular teniendo presente cualquier tratamiento térmico que pueda tener una influencia directa sobre el estado cristalino final.

Por otro lado, en sistemas coloidales basados en lípidos, el comportamiento cristalino de los lípidos que conforman la estructura interna determina la forma final que toman las partículas y los posibles cambios a que haya lugar durante el almacenamiento. Como se había mencionado, las nanopartículas lipídicas típicamente cristalizan en la forma metaestable α , la que subsecuentemente se transforma en el polimorfo β bajo tratamiento térmico o durante el almacenamiento. En ese proceso las partículas pueden pasar de tener formas esféricas a formas de placa (Heurtault et al., 2003) probablemente organizadas en una estructura de red laminar (Lukowski et al., 2000).

Dado que el algoritmo para la determinación del tamaño de partícula mediante DLS se basa en el supuesto de partículas esféricas, los valores promedio dados por el Z-Ave no representan una dimensión real de las partículas con formas de placa, sino que caracterizan las dispersiones por un valor proporcional de masa promediado sobre todas las partículas. De acuerdo con esto, se puede decir que la relación volumen-espesor (una medida del grado de asimetría de partículas) aumenta durante la transición de la forma metaestable α a la forma estable β por lo que el índice de polidispersidad es una buena aproximación del grado de asimetría de las partículas.

Se ha reportado que la relación de proporcionalidad entre el diámetro y el espesor de las nanopartículas, D/h , aumenta con la longitud de la cadena alifática en el orden trilaurina ($C_n=12$), trimiristina ($C_n=14$) y tripalmitina ($C_n=16$) (Illing y Unruh, 2004; T. Unruh et al., 2002). Además, el índice de polidispersidad de las dispersiones de la Figura 4-2 indica que la adición de TCC a la matriz lipídica favorece la formación de estructuras con baja asimetría. En consecuencia, es posible suponer que las nanopartículas preparadas a partir de trimiristina y TCC tengan una baja relación de proporcionalidad D/h .

Puesto que en la mayoría de los estudios consultados los análisis de difracción de rayos X se llevan a cabo sobre muestras liofilizadas, para fines comparativos es importante considerar el efecto del proceso de liofilización sobre las nanopartículas. En la Figura 4-22 se presentan los difractogramas de las dispersiones enfriadas a 4 °C y posteriormente liofilizadas.

El patrón de difracción del P188 presenta dos señales intensas, una más fina hacia 0.4649 nm y otra un poco más intensa pero también más ancha hacia 0.3816 nm, que se solapan con las señales hacia 0.45–0.46 nm y 0.37–0.38 nm del patrón de difracción de trimiristina característicos del polimorfo β . Sin embargo, la señal hacia 0.36–0.37 nm en el difractograma de la trimiristina (marcada con un asterisco en la Figura 4-22) es claramente identificable en las dispersiones con hasta un 90 % del lípido sólido. Nuevamente, la ausencia de una señal intensa hacia 0.41–0.43 nm indica que los polimorfos α y β' no están presentes en las dispersiones en ninguna de las proporciones MMM/TCC analizadas.

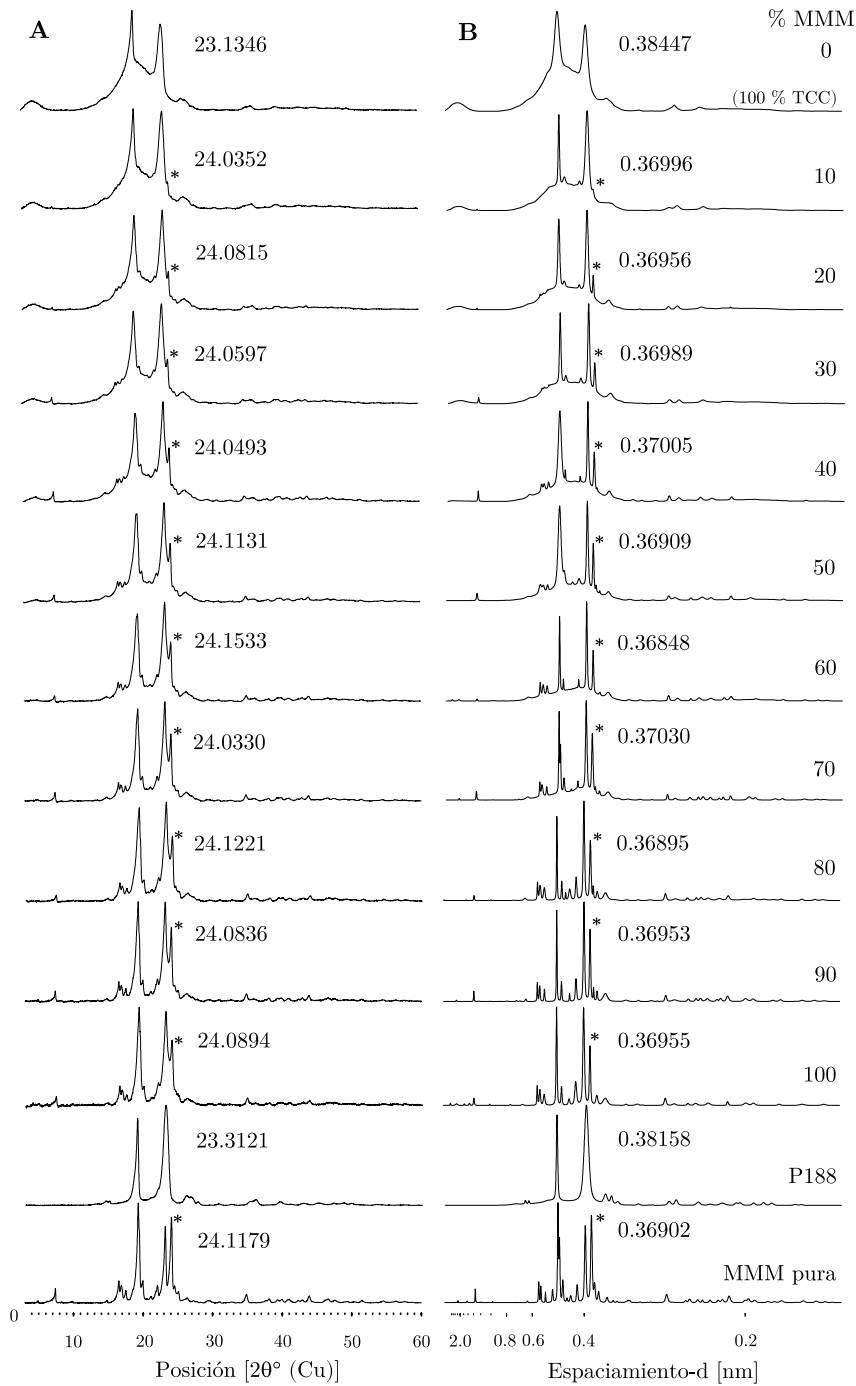


Figura 4-22. Patrones de difracción de las dispersiones enfriadas a 4 °C y posteriormente liofilizadas. La intensidad de todos los difractogramas esta normalizada. En A se muestran los difractogramas crudos en función de la posición 2θ y en B se muestran los difractogramas procesados con el software HighScore Plus 3.0e usado para identificar cada una de las señales de difracción en función del espaciamiento corto.

Teniendo en cuenta que la intensidad de las señales depende entre otras cosas, de la cantidad de muestra capaz de difractar los rayos X, la reducción de la intensidad de la señales características del polimorfo β en la Figura 4-22, no puede asociarse directamente con la reducción en el grado de cristalinidad calculado a partir de la intensidad de los patrones de difracción, como se ha sugerido por ejemplo, para explicar reducción del índice de cristalinidad en nanopartículas liofilizadas de trimiristina estabilizadas con P188 (Venkateswarlu y Manjunath, 2004). En tal caso, es mejor comparar la intensidad relativa de las señales normalizadas dado que permite determinar si las señales características de un polimorfo predominan sobre las señales características de otro polimorfo. Sobre esta base, la reducción en la intensidad de la señal hacia 0.36–0.37 nm que se observa en la Figura 4-22, podría ser atribuida a una reducción de la cantidad de muestra que difracta los rayos X. Es de esperar que durante la liofilización, las moléculas libres de P188 en solución, es decir el P188 en exceso, solidifican de modo que la intensidad de las señales características del P188 aumenta a medida que disminuye la proporción de trimiristina en la mezcla binaria de las dispersiones. Por el contrario, en los difractogramas de la Figura 4-21 no se observa ninguna señal del P188 lo que indica que una fracción de éste se encuentra en un estado totalmente solubilizado sobre la superficie de las nanopartículas y la otra se encuentra libre en la fase acuosa.

Llama la atención que incluso en la dispersión con apenas un 10 % de trimiristina, aún se observe con claridad el patrón de difracción WAXS característico de una configuración polimórfica de tipo β para la trimiristina. Este resultado confirma las observaciones realizadas previamente con DSC en las que las mezclas binarias MMM/TCC deben formar una mezcla eutéctica en todas las proporciones. Así, durante el proceso de liofilización en el que la muestra se congela usando nitrógeno líquido, se alcanza la temperatura suficiente para producir la cristalización de la trimiristina en una fase sólida separada de una fase líquida enriquecida con TCC, formando lo que sería una partícula bifásica o en un arreglo del tipo bifásico en donde, una parte de la trimiristina cristaliza en el polimorfo tipo β y otra permanece formando la fase líquida. En este arreglo estructural es probable que los límites de los bordes del cristal de trimiristina adopten una configuración amorfa que permita la integración de las moléculas de la trimiristina con los segmentos PPO del P188 y las

moléculas de TCC en las nanopartículas preparadas con 0 % a 60 % (grupos I y II de las Figuras 4-8 y 4-18) y eventualmente, a proporciones mayores al 60 % de TCC (grupo III de las Figuras 4-8 y 4-18), se facilite la interacción entre los segmentos PPO del P188 con las moléculas de TCC ubicadas en los bordes amorfos de la trimiristina.

Sin embargo, la elucidación estructural a partir de difracción de rayos X no proporciona información estructural inequívoca sobre el estado líquido de los triglicéridos. En adición, debido a que DSC depende estrictamente del comportamiento térmico, es imposible confirmar los polimorfos presentes basándose en los eventos térmicos y en la entalpía asociada a ellos. Además, los protocolos experimentales (es decir, los ajustes de temperatura y los regímenes de las rampas), así como los pasos de preparación de las muestras pueden inducir artefactos significativos (distorsiones de las señales de interés consideradas artificiales, es decir, entidades no reales (Rasmussen, 1993)). En este sentido, la espectroscopía Raman es una técnica espectroscópica vibracional complementaria que puede proporcionar un medio sensible, relativamente rápido y no destructivo, para estudiar la estructura molecular de los triglicéridos sólidos y líquidos (Da Silva y Rousseau, 2010; Hernqvist, 1984).

4.2.4 Espectroscopía Raman

Los rasgos más distintivos de los espectros Raman de lípidos están relacionados con la presencia de las cadenas alquílicas que se observan en la región de la huella digital hacia $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$, $1300\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ y $1200\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$. Las bandas hacia $1500\text{--}1400\text{ cm}^{-1}$ corresponden a vibraciones de tijera y de torsión de los grupos CH_2 y CH_3 , respectivamente, mientras que las bandas en la región de $1200\text{--}1050\text{ cm}^{-1}$ se atribuyen a las vibraciones de estiramiento C-C y las bandas hacia $1300\text{--}1250\text{ cm}^{-1}$ pueden ser identificadas con la vibración de meneo CH_2 o con el modo de balanceo CH_2 . Adicionalmente, un grupo muy intenso de bandas en el rango de $3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$, correspondientes a los modos de estiramiento C-H (grupos metileno), son también característicos de los espectros Raman de lípidos (Bresson et al., 2005; Czamara et al., 2015). En particular, la región de vibración de estiramiento C-C es particularmente

útil para identificar si las cadenas alquílicas son cristalinas o líquidas. Los lípidos con cadenas cristalinas muestran dos señales agudas cerca de 1065 cm^{-1} y 1130 cm^{-1} , mientras que estas señales se reemplazan por una banda ancha cerca de 1090 cm^{-1} cuando las cadenas están en fase líquida (Hernqvist, 1984), ver por ejemplo las regiones V y II de la Figura 4-23. De hecho, en la región VI de los espectros de la Figura 4-23, es posible identificar una banda hacia 412 cm^{-1} que se intensifica a medida que aumenta la proporción del lípido líquido en las dispersiones.

El grupo carbonilo (C=O) de los triglicéridos muestra poca polarización y es un enlace poco flexible. En el espectro de la trimiristina pura en estado sólido de la Figura 4-23 se observan dos bandas, una más intensa hacia 1745 cm^{-1} (zona III) correspondiente al modo de estiramiento de las cadenas alquílicas en las posiciones $sn-1$ y $sn-2$ y otra menos intensa hacia 1731 cm^{-1} correspondiente al modo de estiramiento de la cadena doblada en la posición $sn-3$ (Lawler y Dimick, 2008; Marangoni et al., 2012). Adicionalmente, también se ha identificado un tercer modo de estiramiento entre estas dos bandas que implicaría diferencias conformacionales entre los tres grupos carbonilos de los triglicéridos, que no es fácilmente identificable en el espectro de la Figura 4-23.

Estos tres modos de estiramiento en la región de 1741 cm^{-1} a 1731 cm^{-1} son característicos del polimorfo β (Da Silva y Rousseau, 2008). Sin embargo, durante la transición del estado sólido hacia el estado líquido, pasando por los polimorfos $\beta \rightarrow \beta' \rightarrow \alpha$, estas bandas de vibración van desapareciendo y en cambio se sustituyen por la banda más ancha e intensa hacia 1776 cm^{-1} de la región III característica del estado líquido, indicando que la región de estiramiento de carbonilo se desplaza hacia una energía más alta resultado de la pérdida de la estructura. No obstante, debido a la presencia del TCC en la matriz lipídica no es posible asociar los cambios observados en estas regiones con la presencia de polimorfos diferentes al polimorfo β .

Los modos de estiramiento simétricos de tijera (*scissoring*) y meneo (*wagging*) y antisimétrico de balanceo (*rocking*) en la región de 1500 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} (región IV de la Figura 4-23) también muestran dependencia con respecto al estado polimórfico de los lípidos. En esta región se observa una disminución en la definición de las bandas a medida que disminuye el orden cristalino debido a la presencia de numerosos modos de deformación superpuestos que pueden asignarse al modo de vibración de tijera CH_2

(Czamara et al., 2015; Da Silva et al., 2009), que para el caso de las nanoemulsiones preparadas con 100 % de TCC se observa como una banda ancha entre 1496 cm^{-1} a 1403 cm^{-1} centrada en 1438 cm^{-1} . Por el contrario, para el caso de la trimiristina en esta misma región se pueden identificar por lo menos dos bandas bien definidas, una hacia 1439 cm^{-1} y la otra hacia 1462 cm^{-1} . Igualmente, la trimiristina también muestra una banda característica del estado sólido muy intensa y aguda hacia 1296 cm^{-1} correspondiente al modo de torsión de los grupos metileno que es reemplazada por una banda ancha entre 1322 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} en el TCC en estado líquido. Lo mismo ocurre con la banda hacia 1895 cm^{-1} de la región II y la banda hacia 1776 cm^{-1} de la región III (región de estiramiento del éster carbonilo), las que son características de los lípidos en estado líquido y por ello se intensifican a medida que aumenta la proporción de TCC en las partículas.

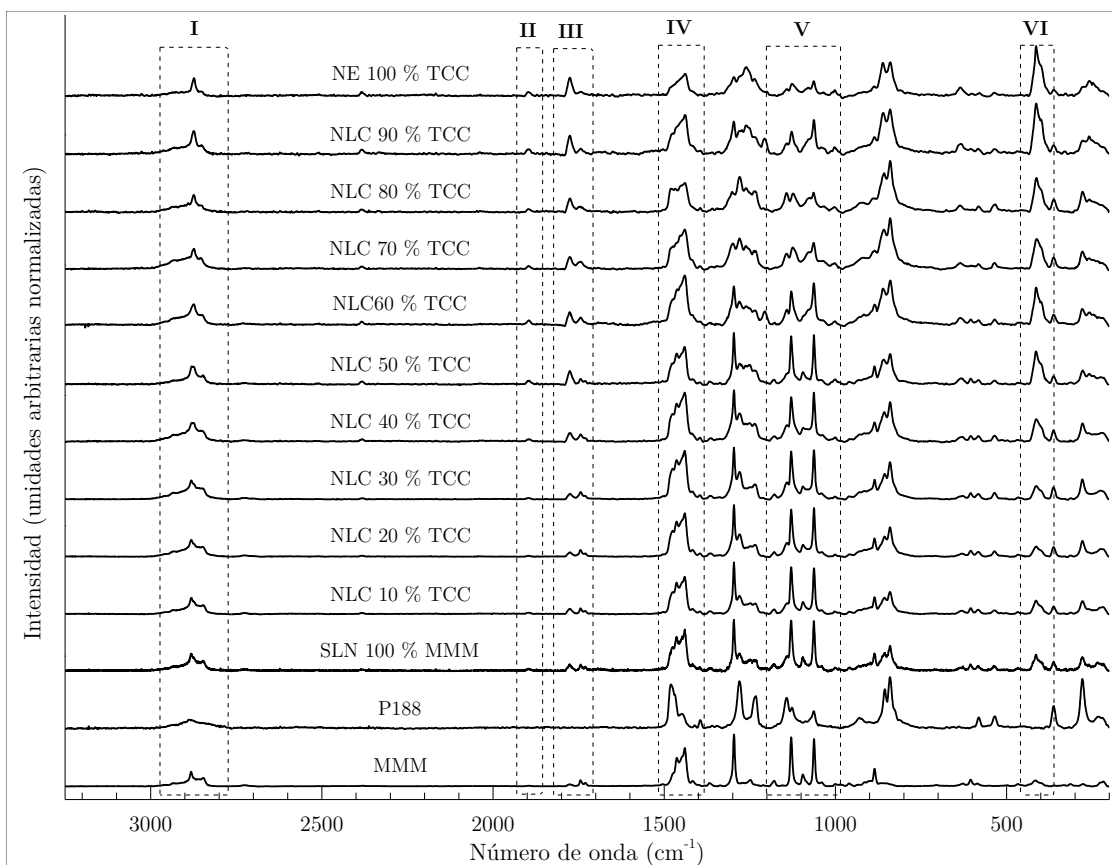


Figura 4-23. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm para las nanopartículas lipídicas. Los espectros corresponden a las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h y posteriormente liofilizadas. En porcentaje, cantidad de TCC.

La intensidad relativa entre la proporción *trans/gauche* de las dos bandas agudas cerca de 1065 cm^{-1} y 1130 cm^{-1} (región V) ofrece una medida de la movilidad intermolecular de las cadenas alifáticas (región de estiramiento C–C), es decir, del grado de orden cristalino en los lípidos (Hernqvist, 1984). Para la trimiristina en estado sólido independientemente del tipo de polimorfo presente, no se observa ningún cambio en la relación $trans/gauche = I_{\sim 1065}/I_{\sim 1130}$, tal como se aprecia en la Tabla 4-3. Sin embargo, en el estado líquido estas dos bandas se hacen más anchas debido al aumento energético de los modos de vibración del esqueleto hidrocarbonado (Da Silva et al., 2009; Hernqvist, 1984).

Tabla 4-3. Proporción $I_{\sim 1062}/I_{\sim 1130}$ para los modos de estiramiento C–C de las dispersiones de lípidos.

	Modo de estiramiento CH ₂				$I_{\sim 1062}/I_{\sim 1130}$
	<i>trans</i>		<i>gauche</i>		
	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Intensidad (I)	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Intensidad (I)	
*MMM	1062.40	0.91235	1129.11	0.94531	0.97
SLN	1063.09	0.97465	1129.11	0.98179	0.99
NLC10%	1062.40	0.88633	1129.11	0.90601	0.98
NLC20%	1062.40	0.94159	1129.11	0.91137	1.03
NLC30%	1063.09	0.94966	1129.11	0.92687	1.02
NLC40%	1063.09	0.95527	1129.11	0.86852	1.10
NLC50%	1063.09	0.95954	1129.11	0.93617	1.02
NLC60%	1063.09	0.85457	1128.43	0.6977	1.22
NLC70%	1063.09	0.52963	1124.34	0.44055	1.20
NLC80%	1063.09	0.39055	1123.66	0.37463	1.04
NLC90%	1063.09	0.54307	1127.75	0.45984	1.18
NE	1063.09	0.32943	1126.39	0.27755	1.19

*En porcentaje, cantidad de TCC.

Finalmente, en la región I ($3100\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$) de los espectros de la Figura 4-23 se presentan dos bandas principales intensas que se atribuyen a los estiramientos simétrico v_s hacia 2846 cm^{-1} y asimétrico v_{as} hacia 2882 cm^{-1} del metileno CH₂, respectivamente. Adicionalmente, también se presenta una banda más débil hacia 1933 cm^{-1} (zona II) que corresponde al modo de estiramiento simétrico v_s del metilo, CH₃ (Czamara et al., 2015). La proporción relativa de las dos bandas principales, $\eta = I_{\sim 2846}/I_{\sim 2882}$, se puede usar para identificar la simetría de las subceldas polimórficas de los lípidos de la matriz de las dispersiones de nanopartículas en donde una disminución en el valor de η se asocia con un incremento en la estabilidad

termodinámica, lo cual indica que si dominan las vibraciones asimétricas de los grupos C–H, la red cristalina del lípido se encuentra altamente ordenada. Por el contrario, un aumento en el valor numérico de η , significa un aumento de libertad de movimiento de los grupos metileno y en consecuencia un arreglo cristalino menos organizado (Bresson et al., 2006; Da Silva et al., 2009; Da Silva y Rousseau, 2008).

Los valores para η de la trimiristina en polvo con respecto al valor calculado para cada una de las dispersiones lipídicas liofilizadas se mantienen constantes en aproximadamente 0.58 hasta una proporción de TCC del 60 % (Tabla 4-4), lo que sugiere que el estado cristalino de la trimiristina en las dispersiones lipídicas es esencialmente el mismo que el de la trimiristina a granel, independientemente de la presencia de TCC en la matriz.

Tabla 4-4. Proporción $\eta = I_{\sim 2846} / I_{\sim 2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de lípidos.

	Modo de estiramiento CH ₂				η
	ν_s		ν_{as}		
	λ (cm ⁻¹)	Intensidad (I)	λ (cm ⁻¹)	Intensidad (I)	
*MMM	2846.39	0.16468	2881.82	0.28340	0.58
SLN	2846.82	0.20401	2881.39	0.35054	0.58
NLC10%	2847.69	0.20835	2881.12	0.36111	0.58
NLC20%	2847.25	0.18357	2880.97	0.31816	0.58
NLC30%	2848.12	0.19376	2881.39	0.33030	0.59
NLC40%	2848.98	0.21408	2881.39	0.37074	0.58
NLC50%	2848.55	0.21838	2880.12	0.37554	0.58
NLC60%	2849.84	0.23550	2874.76	0.41531	0.57
NLC70%	2851.98	0.24391	2874.18	0.45165	0.54
NLC80%	2852.84	0.19731	2874.18	0.40228	0.49
NLC90%	2853.27	0.14328	2874.18	0.34589	0.41
NE	2854.13	0.13063	2874.33	0.38638	0.34

*Los valores reportados para η son 0.66 (Da Silva y Rousseau, 2010), 0.42 (Bresson et al., 2006) y 0.52 (Bresson et al., 2005).

**En porcentaje, cantidad de TCC.

A proporciones mayores al 60 % de TCC el valor de η se hace cada vez menor. No obstante, el número de onda del estiramiento simétrico se desplaza hacia 2874 cm⁻¹ mientras que el número de onda del estiramiento asimétrico se desplaza hacia 2854 cm⁻¹, es decir, que las bandas correspondientes al TCC predominan sobre las bandas de la trimiristina.

En general, el polimorfo β se caracteriza porque la intensidad de la banda correspondiente al estiramiento asimétrico es mucho mayor que la intensidad de la banda correspondiente al estiramiento simétrico. A medida que ocurre la transición desde la forma polimórfica β a la forma polimórfica α , pasando a través de la forma polimórfica β' , la diferencia entre la intensidad de las dos bandas se va reduciendo, es decir, disminuye la intensidad de la banda hacia 2880 cm^{-1} y aumenta la intensidad de la banda hacia 2845 cm^{-1} . Finalmente, en el estado líquido, la banda correspondiente al estiramiento asimétrico se hace prácticamente indistinguible mientras que la banda correspondiente al estiramiento simétrico es sustituida por una banda a hacia 2850 cm^{-1} (Da Silva y Rousseau, 2010).

Aunque para la trimiristina se han reportado varios valores para η muy diferentes entre sí (Bresson et al., 2006, 2005; Da Silva y Rousseau, 2010), en todos los casos la intensidad del estiramiento asimétrico fue mayor que la intensidad del estiramiento simétrico correspondiente al polimorfo β (Da Silva y Rousseau, 2008). En este caso, dado que el valor η para las dispersiones fue el mismo que el de la trimiristina a granel, es posible suponer que la trimiristina en las dispersiones también está presente en el polimorfo β confirmando los resultados de DSC y XRD obtenidos.

En estudios previos usando espectroscopía Raman para obtener información acerca de la estructura interna de las nanopartículas lipídicas se reportaron resultados similares a los del presente estudio. Por ejemplo, se determinó que los modos vibracionales de la trimiristina en estado sólido presentan bandas intensas y agudas, mientras que en la trimiristina en estado de líquido subenfriado las bandas son anchas y de menor intensidad, lo que es característico del solapamiento de varios modos vibracionales ocasionado por el aumento de la libertad de movimiento de las moléculas de trimiristina (Noack et al., 2012). Adicionalmente, en un estudio comparativo entre nanopartículas lipídicas (SLN y NLC) y nanoemulsiones (NE) preparados a partir de cetil palmitato como lípido sólido y TCC como lípido líquido, se encontró que las SLN comparten esencialmente los mismos modos vibracionales del cetil palmitato puro y las NE los mismos modos vibracionales del TCC a granel. Para los NLC el análisis mediante espectroscopía Raman reveló que la presencia del TCC en las nanopartículas no produce cambios en el arreglo de las cadenas lipídicas del cetil palmitato, por lo tanto, es probable que el TCC se encuentre en una fase separada del cetil palmitato

cristalino de la matriz de las nanopartículas (Anantachaisilp et al., 2010; Saupe et al., 2006). No obstante, en ninguno de estos estudios los espectros Raman obtenidos fueron empleados para identificar la presencia de los posibles polimorfos presentes en las nanopartículas. De hecho, a pesar de la evidente separación de fases observada a través de los modos vibracionales observados por espectroscopía Raman, uno de estos estudios señala que el incremento en el contenido del lípido líquido conduce a una disminución del tamaño de partícula y a una estructura menos organizada de la matriz de acuerdo con los resultados obtenidos mediante DSC y XRD (Anantachaisilp et al., 2010).

Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en esta investigación mediante DLS, DSC, XRD y Raman es posible concluir que la mezcla de TCC y trimiristina conduce a un sistema bifásico formado por una fase sólida de cristales de trimiristina en el polimorfo β y una fase líquida separada de una solución eutéctica de TCC y trimiristina.

4.2.5 Incorporación de moléculas modelo en nanopartículas lipídicas

La localización más probable del principio activo en sistemas de entrega basados en lípidos coloidales ofrece información acerca de la cantidad del fármaco que está realmente asociado con las nanopartículas y del tipo de interacción que se presenta entre ambos. Tal información puede ser importante para entender el desempeño *in vitro* e *in vivo* de las dispersiones con respecto a la estabilidad y el comportamiento de liberación del fármaco (Bunjes, 2010, 2004). Sin embargo, el estudio de estas nanoestructuras es un verdadero desafío y hasta ahora, la determinación detallada de la distribución del fármaco en las SLN y los NLC no ha sido del todo posible (Boreham et al., 2017). Una razón es que el tipo de interacción para cada combinación de fármaco/nanopartícula es demasiado específica y depende, entre otras cosas, de la composición general de la dispersión y del método de preparación (Bunjes, 2004).

En este trabajo se emplearon el metilparabeno (MP) y el propilparabeno (PP) como moléculas modelo para estudiar el efecto de la incorporación de moléculas activas en la estructura de las partículas lipídicas y, en consecuencia, de la localización probable

de dichas moléculas. Los parabenos son una familia de compuestos químicos derivados del éster del ácido 4-hidroxibenzoico o *para*-hidroxibenzoatos (Figura 4-24). Como grupo, los parabenos son efectivos a diferentes valores de pH y tienen un amplio espectro de actividad antimicrobiana, aunque son más eficaces contra levaduras y mohos. Así mismo, su actividad se incrementa cuando incrementa la longitud de la cadena alquílica; sin embargo, disminuye su solubilidad en agua, lo que se ve reflejado en los valores del $\text{Log}K_{ow}$ de 1.96 y 3.04 para el MP y el PP, respectivamente (Rowe et al., 2009).

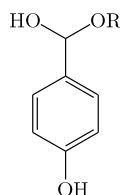


Figura 4-24. Estructura general de los parabenos.

R es un grupo alquilo seleccionado, por ejemplo, del metil, etil, propil o butil.

Los parabenos tales como el metilparabeno y el propilparabeno son usados como agentes preservantes en concentraciones de 0.01 % a 0.3 % en formulaciones farmacéuticas y en concentraciones de 0.01 % a 0.6 % en cosméticos. En tales concentraciones carecen de efectos tóxicos sistémicos, a pesar de que se han reportado algunas reacciones alérgicas (Aronson, 2015). La solubilidad de los parabenos en agua es bastante baja y aunque se ha estudiado el equilibrio de solubilidad de algunos parabenos en diferentes mezclas de solventes, los datos de solubilidad en medios acuosos y orgánicos son todavía escasos (Cárdenas et al., 2017). La solubilidad en agua normalmente aceptada para el metilparabeno (metil 4-hidroxibenzoato, MP) es de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y para el propilparabeno (propil 4-hidroxibenzoato, PP) es de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Rowe et al., 2009; Sweetman, 2009).

La disminución de la solubilidad a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica viene acompañada también por una disminución en el punto de fusión (Forster et al., 1991). Para el metilparabeno la temperatura de fusión es de $126.0 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.4 \text{ }^\circ\text{C}$ y para el propilparabeno es de $96.1 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$. Los valores de densidad son de $1.361 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ y de $1.287 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ para el metilparabeno y el propilparabeno, respectivamente (Giordano et al., 1999). Así, las propiedades fisicoquímicas del metilparabeno y del propilparabeno permiten estudiar el efecto de la hidrofobicidad,

el punto de fusión y la solubilidad de las moléculas activas sobre la estructura de las partículas lipídicas.

- Comportamiento del tamaño de los sistemas lipídicos conteniendo parabenos

Puesto que el comportamiento cristalino de la trimiristina determina la forma final de las nanopartículas, es posible suponer que la incorporación de moléculas activas en nanopartículas lipídicas puede modificar dicho patrón de cristalización y, por consiguiente, el tamaño medio y la forma de las nanopartículas. El tamaño medio de las dispersiones lipídicas incorporando metil y propilparabeno se muestra en las Figuras 4-25 y 4-26. Como se observa, la adición de parabenos a la matriz de lípidos no afecta significativamente el tamaño medio de partícula ($Z-Ave$) ni el índice de polidispersidad (PI) respecto a la tendencia observada en las partículas vacías (Figuras 4-1 y 4-2). El tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad se mantienen en valores de aproximadamente 200 nm y 220 nm en las dispersiones enfriadas a 20 °C diluidas en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente, con índices de polidispersidad inferiores a 0.15.

En las dispersiones enfriadas a 4 °C el comportamiento del tamaño medio de partícula sigue la misma tendencia que el observado en la Figura 4-2, en donde la dispersión preparada con 100 % de trimiristina en la fase lipídica presenta un tamaño medio de partícula ligeramente mayor que el determinado para en las dispersiones preparadas con mezclas binarias de lípido sólido y lípido líquido. No obstante, el $Z-Ave$ y el PI en estas dispersiones tienen valores ligeramente menores que los de las dispersiones sin moléculas modelo, lo que podría indicar que la adición de parabenos tiene algún efecto en la modulación del proceso de cristalización de las gotas fundidas. En este caso, el $Z-Ave$ fue de aproximadamente 230 nm tanto para el metil como para el propilparabeno, frente a 242 nm para las dispersiones vacías. De otro lado, el PI para las dispersiones con parabenos fue de aproximadamente 0.120 comparado con un valor de 0.150 aproximadamente, observado en las dispersiones vacías. Es decir, la relación de proporcionalidad entre el diámetro y el espesor de las nanopartículas es menor y, en consecuencia, la incorporación de parabenos a la matriz lipídica probablemente

favorece la formación de estructuras con menor asimetría que en las dispersiones vacías.

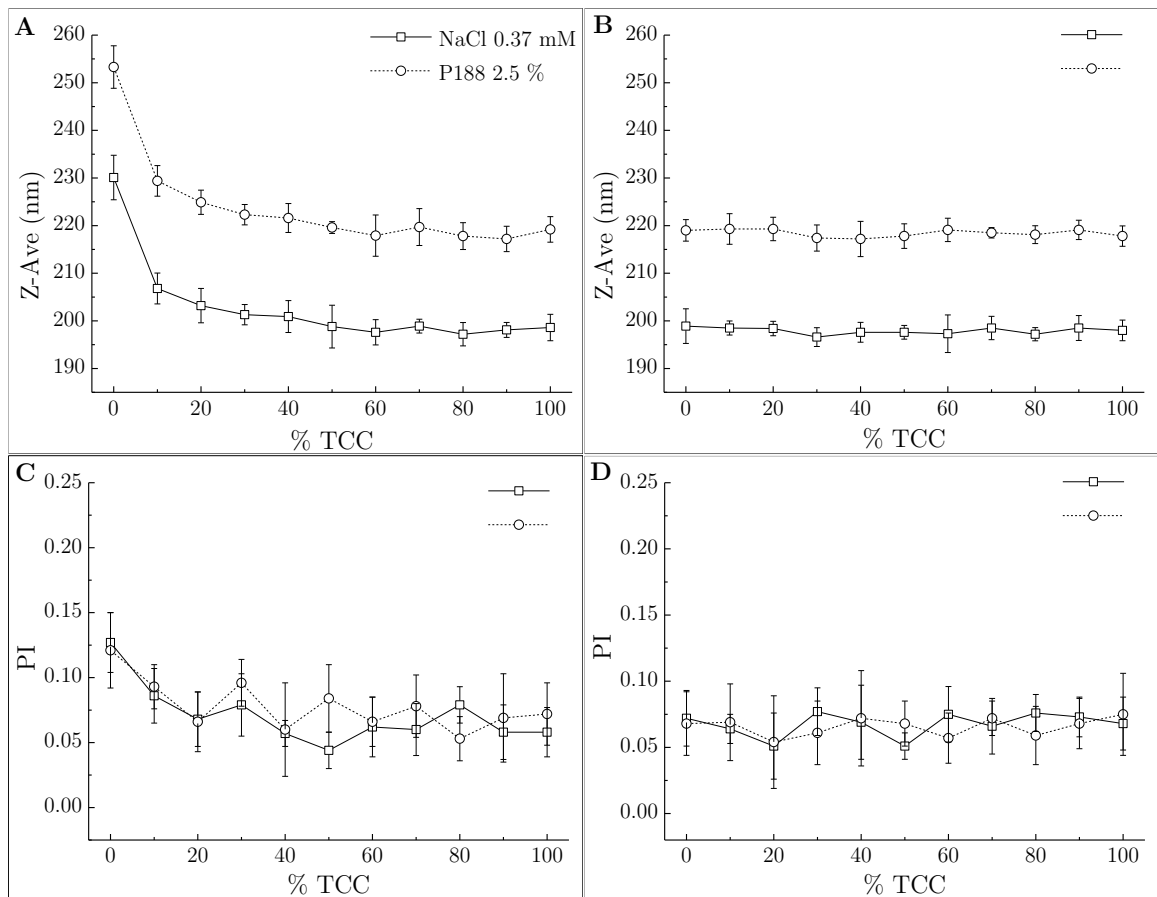


Figura 4–25. Tamaño medio de partícula y polidispersidad de los sistemas lipídicos con MP.

En A y C se muestran los valores para las dispersiones enfriadas a 4 °C durante 24 h y en B y D se presentan los comportamientos para las muestras enfriadas a 20 °C.

No obstante, en estudios previos se ha reportado que la adición de diversas moléculas activas, incluyendo ácido mefenámico, dibucaína, curcumina, anfotericina B, fenofibrato y tiomersal, a dispersiones (nanoemulsiones y nanosuspensiones) de trimiristina estabilizadas con P188 al 4 % no altera ni el tamaño de partícula (Z–Ave) ni el PI, excepto para el propofol el que, excepcionalmente, mostró una elevada capacidad de carga en comparación con las otras moléculas estudiadas (Kupetz y Bunjes, 2014). En dispersiones cargadas con simvastatina el tamaño medio de partícula y el PI permanecieron prácticamente constantes (aproximadamente 210 nm y 0.20, respectivamente) a concentraciones de fármaco entre 0 mg y 10 mg. Concentraciones mayores de 10 mg de este activo condujeron a un incremento

progresivo en el tamaño medio de partícula y en el PI, lo que fue atribuido a la saturación de la matriz lipídica y a la acumulación del fármaco en la superficie de la partícula (Vitorino et al., 2011). De modo similar, el aumento en el tamaño medio de partícula con la concentración del fármaco (coenzima Q10) se atribuyó a la incorporación de la molécula activa en la superficie de la matriz lipídica de NLC preparados a partir de palmitato de cetilo y triglicéridos de cadena media (Keck et al., 2014a).

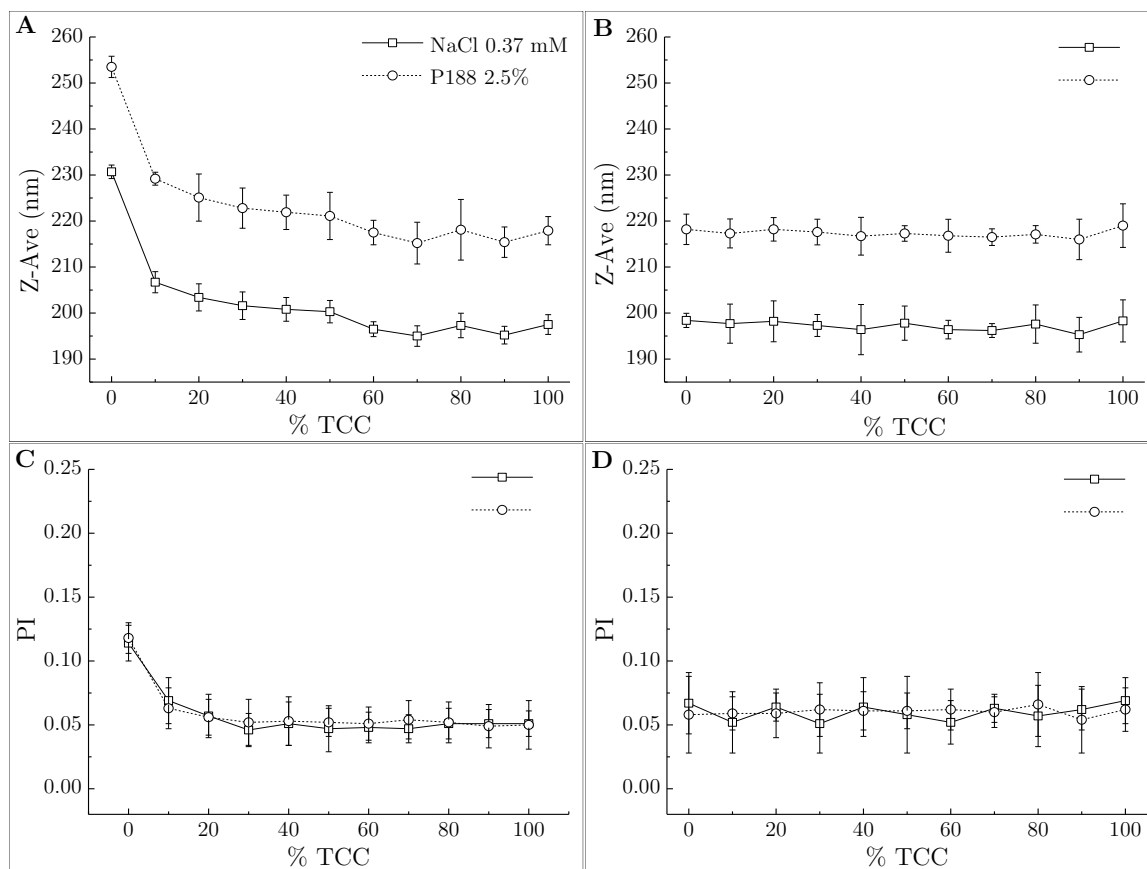


Figura 4–26. Tamaño medio de partícula y polidispersidad de los sistemas lipídicos con PP.

En A y C se muestran los valores para las dispersiones enfriadas a 4 °C durante 24 h y en B y D se presentan los comportamientos para las muestras enfriadas a 20 °C.

En otros estudios no se observó una relación directa entre el tamaño de las nanopartículas con o sin activo. Por ejemplo, en SLN preparadas a partir de Gelucire® (macrogolglucéridos de lauroilo) y ciclosporina en concentraciones desde 20 mg a 200 mg no se observó una tendencia definida en cuanto al tamaño de partícula de las dispersiones recién preparadas. Así, para una concentración de 25 mg de ciclosporina

el tamaño fue de $346 \text{ nm} \pm 3 \text{ nm}$ con un PI de 0.28 mientras que para una concentración de 40 mg el tamaño medio fue de $248 \text{ nm} \pm 5 \text{ nm}$ con un PI de 0.15 (Urbán-Morlán et al., 2010). Resultados similares se han reportado en nanopartículas preparadas con palmitato de cetilo y tres agentes tensioactivos diferentes, uno lineal (ceteth-20, polioxietilen-20-cetiléter), uno ramificado (isoceteth-20, polioxietilen-20-isohexadeciléter) y uno insaturado (oleth-20, polioxietilen-20-oleil éter), cargadas con cantidades crecientes de idebenona. En este caso, no se observó relación entre el tamaño medio de las nanopartículas y la cantidad de fármaco incorporado. Así, para el isoceteth-20, el aumento de la cantidad de fármaco condujo aparentemente a un aumento del tamaño de partícula; por el contrario, para el ceteth-20, el aumento de la cantidad del fármaco causó a una aparente reducción del tamaño de partícula, mientras que para el oleth-20, no se observa un cambio significativo en el tamaño de partícula con el aumento de la cantidad de fármaco (Sarpietro et al., 2014).

No obstante, en nanopartículas lipídicas cargadas con haloperidol se observó una disminución del tamaño medio de partícula a concentraciones mayores de fármaco pasando de $146.3 \text{ nm} \pm 3.6 \text{ nm}$ a $207.7 \text{ nm} \pm 4.3 \text{ nm}$, a una de proporción fármaco : lípidos de 1:2 y de 1:4, respectivamente, utilizando 1.5 % de agente tensoactivo (Yasir y Sara, 2013).

Debe tenerse en cuenta, que la comparación del tamaño entre diversos estudios y los resultados del presente trabajo no se puede llevar a cabo de forma directa debido a que el tamaño de medio de partícula es influenciado por factores como el comportamiento cristalino de los lípidos de la matriz, los agentes estabilizantes, la naturaleza de las moléculas activas, la proporción entre los componentes y el método de preparación, incluyendo cualquier tratamiento térmico (Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018).

Todos estos factores modifican la densidad, viscosidad, tensión interfacial, composición y volumen de las nanogotas de la fase orgánica durante el proceso de formación de las nanopartículas. Adicionalmente, las condiciones experimentales para la estimación del tamaño medio de partícula también afectan su valor. Por lo tanto, de acuerdo con la evidencia obtenida en esta investigación y los datos reportados por

otros autores, no hay necesariamente una razón para esperar una relación directa entre el tamaño de partícula y la concentración de fármaco. En nuestro caso, la aparente reducción del tamaño medio de partícula observado para los sistemas lipídicos enfriados a 4 °C durante 24 h puede ser causada por la formación de una mezcla eutéctica de baja viscosidad y tensión interfacial reducida, que facilitan la formación de gotas de menor tamaño que aquellas que se forman sin la incorporación de parabenos. Igualmente, como se mencionó previamente, la adición parabenos podría influenciar el fenómeno de cristalización de las gotas de lípido.

En adición, el espesor de la capa de P188 adsorbida en las dispersiones para ambos parabenos es de aproximadamente 20 nm (valor estimado a partir de las Figuras 4-25 y 4-26 considerando la diferencia de $Z-Ave$ cuando se emplea $NaCl\ 0.37 \times 10^{-3}\ mol \cdot L^{-1}$ y P188 p/v al 2.5 % + $NaCl\ 0.1 \times 10^{-3}\ mol \cdot L^{-1}$, el mismo valor observado en las dispersiones vacías de las Figuras 4-1A y 4-2A, por lo que, la incorporación de parabenos en la matriz lipídica no parece tener un efecto significativo en el tamaño medio ni en el PI de las nanopartículas.

- Comportamiento térmico de los sistemas lipídicos investigados conteniendo parabenos

De otro lado, en la Figura 4-27 se muestra el comportamiento térmico de las dispersiones lipídicas cargadas con metilparabeno, NP-MP (A y B) y de las dispersiones de nanopartículas cargadas con propilparabeno NP-PP (C y D). Durante el calentamiento (Figuras 4-27A y 4-27C), solo se observan señales endotérmicas de fusión hasta proporciones de TCC de 40 %, es decir, la incorporación de los parabenos a las partículas disminuye la velocidad de cristalización, J , de las moléculas de trimiristina. Esto se deduce a partir de las temperaturas de inicio y de máxima velocidad de los eventos térmicos durante el calentamiento y el enfriamiento de las dispersiones (onset y peak, respectivamente, en los insertos de las Figuras 4-27A y 4-27C) cuyos valores son ligeramente menores a los observados para las dispersiones sin la incorporación de parabenos (Figura 4-12). En adición, como se observa en las Figuras 4-27B y 4-27D, el enfriamiento de las dispersiones con 60 % de trimiristina presenta dos eventos exotérmicos. Esto confirma que la historia térmica inducida en las dispersiones (4 °C y 24 h) no fue suficiente para cristalizar toda la trimiristina

disponible en esa proporción, tal y como se demostró para la dispersión al 50 % de trimiristina de la Figura 4–16. Además, el propilparabeno parece disminuir la velocidad de cristalización en mayor medida que el metilparabeno.

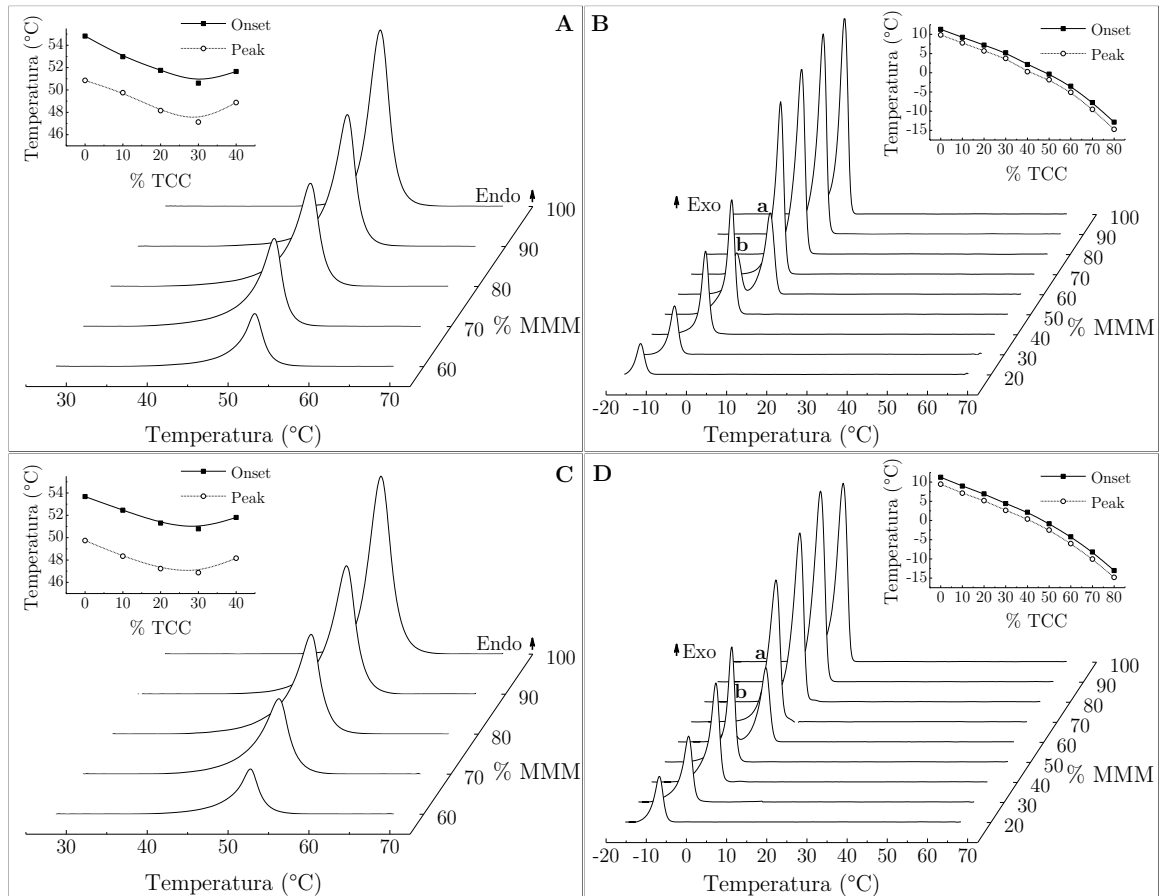


Figura 4–27. Transiciones térmicas de los sistemas lipídicos enfriados a 4 °C cargados con MP y PP. En (A y C) calentamiento y en (B y D) enfriamiento para las dispersiones con MP y PP, respectivamente. En los termogramas de calentamiento se evidencia que las dispersiones con más del 50 % de TCC no solidifican bajo la historia térmica introducida.

La diferencia entre la temperatura de fusión y la temperatura de cristalización, es decir, la zona metaestable de sobresaturación (Figura 4–28) aumenta ligeramente con la incorporación de los parabenos a las nanopartículas con respecto a las dispersiones vacías (Figura 4–13), y es de hecho un poco más pronunciada para las NP–MP que para las NP–PP, en donde la diferencia de temperaturas es de poco más de 1 °C. Esto sugiere que a mayor hidrofobicidad de la molécula incorporada parece existir mayor interacción con las moléculas del TCC y de la trimiristina en el estado líquido, lo que redunda en una disminución en la velocidad de cristalización de la molécula y

eventualmente, en una mayor cantidad de carga del activo. Por lo tanto, la incorporación de parabeno podría conducir a la formación de una mezcla eutéctica de los tres componentes.

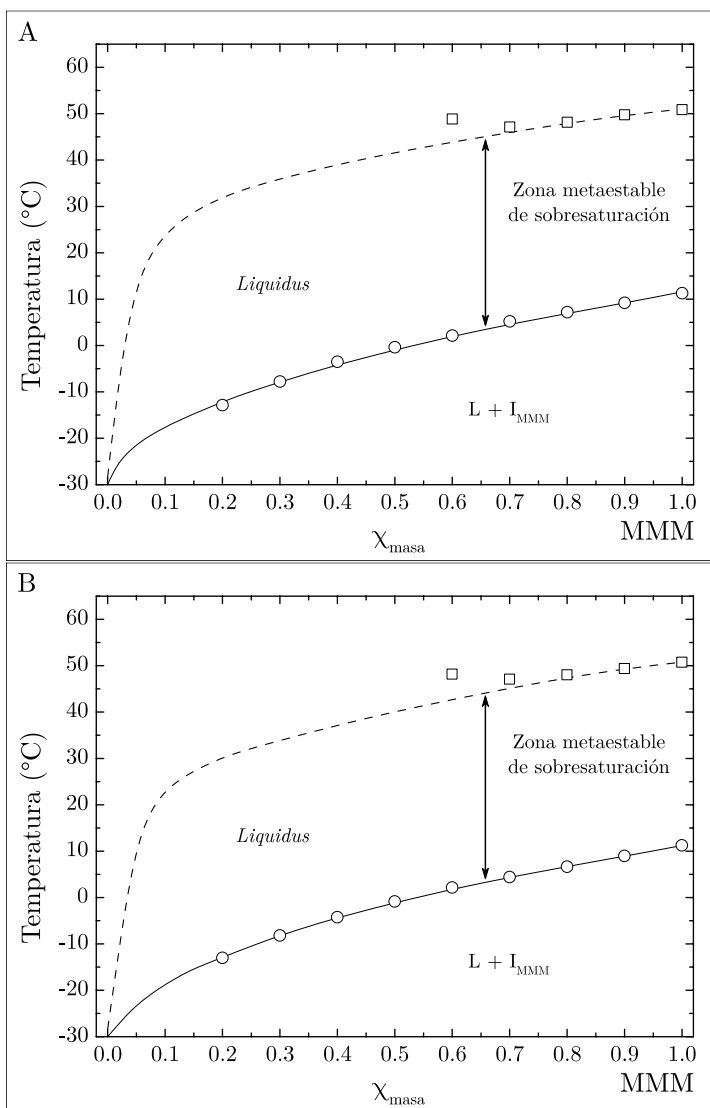


Figura 4–28. Zona metaestable de sobresaturación para las dispersiones de lípidos incorporadas con (A) MP y (B) PP.

Al parecer, las interacciones de las moléculas de los parabenos y las moléculas de trimiristina también aumentan con la proporción de TCC en la mezcla, así como se observa en la línea *liquidus* de la Figura 4–28 cuya curva es más inclinada que la observada para las dispersiones vacías. Adicionalmente, las entalpías de fusión y de cristalización de las dispersiones con parabenos presentan el mismo comportamiento previamente observado en las dispersiones vacías. Sin embargo, el efecto de la

incorporación de los parabenos y la diferencia entre las dispersiones de nanopartículas cargadas con metilparabeno y propilparabeno sobre la estructura de la partícula es notorio.

La entalpía de fusión permanece prácticamente constante en valores de $120 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ hasta el 30 % de TCC para las partículas conteniendo metilparabeno (Figura 4–29A) y hasta el 20 % de TCC cuando se incorpora propilparabeno dentro del sistema lipídico (Figura 4–29C).

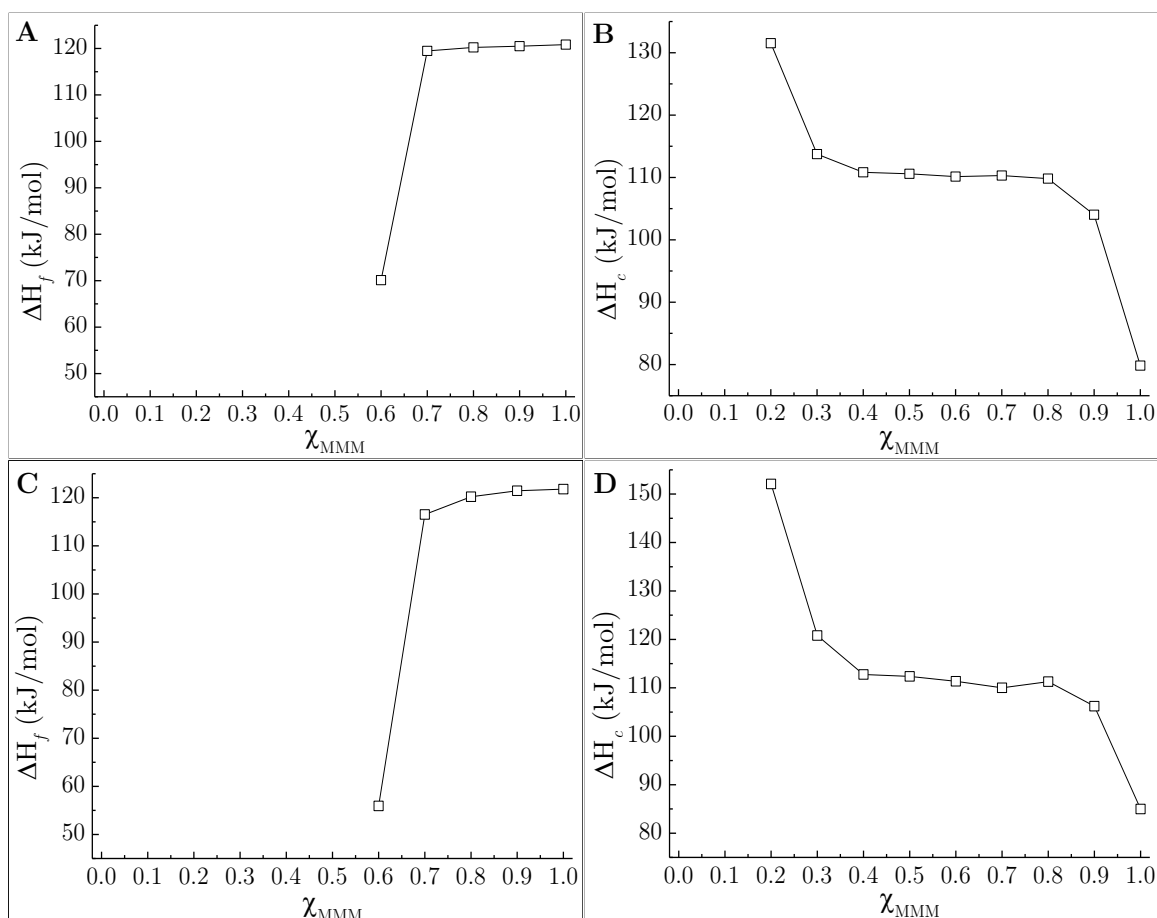


Figura 4–29. Entalpía de fusión (A y C) y de cristalización (B y D) para las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ conteniendo MP (arriba) y PP (abajo).

A partir de estos valores, las entalpías de fusión se van reduciendo hasta aproximadamente $70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ y $50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ para las partículas conteniendo metilparabeno y propilparabeno, respectivamente. Este comportamiento indica que la velocidad de cristalización de las dispersiones se ve más afectada por el propilparabeno que por el metilparabeno, lo que se corrobora con las entalpías de cristalización de las

Figuras 4–29B y 4–29D para las nanopartículas conteniendo metilparabeno y propilparabeno, respectivamente. En estos casos, las entalpías de cristalización para las dispersiones con 70 % y 80 % de TCC son mayores para las dispersiones que contienen propilparabeno debido a que hay una mayor cantidad de gotas subenfriadas por solidificar, es decir, hay una mayor cantidad de moléculas de trimiristina que se deben reacomodar durante la cristalización, lo que conduce a una mayor cantidad de energía liberada en el proceso en comparación con las mismas dispersiones conteniendo metilparabeno, en las que el valor de la fracción de gotas que no contienen cristales es menor.

El índice de cristalinidad de las dispersiones con metilparabeno y propilparabeno es cercano al 80 % para las dispersiones con alto contenido de trimiristina independientemente del parabeno incorporado (Figura 4–30), es decir, de las dispersiones en las que la solidificación de la matriz lipídica se asume completa. Esto sugiere que la incorporación de los parabenos no afecta el patrón de cristalización de la trimiristina observado en las dispersiones vacías. Por lo tanto, la incorporación de las moléculas de parabenos dentro de la estructura cristalina de la trimiristina, al igual que ocurre con las moléculas del TCC, es poco probable. De acuerdo con esto, los parabenos en la partícula lipídica podrían estar localizados principalmente en una fase separada de los cristales de trimiristina.

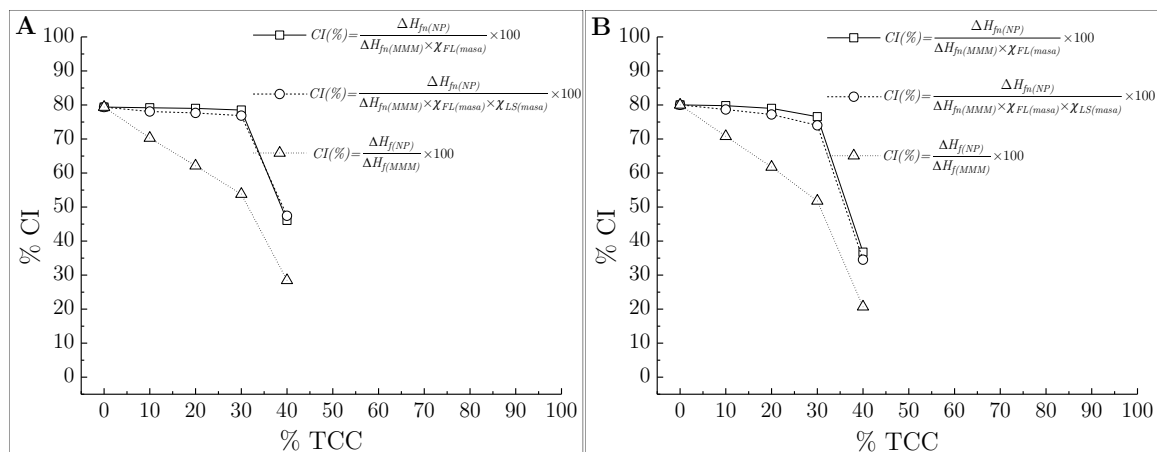


Figura 4–30. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas enfriadas a 4 °C conteniendo (A) MP y (B) PP.

Este mismo comportamiento ha sido reportado para nanopartículas preparadas con palmitato de cetilo y ceteth–20, isoceteth–20 u oleth–20, cargadas con diferentes

cantidades de idebenona, donde no se observó relación entre la cantidad de idebenona incorporada y el índice de recristalización de la matriz lipídica de las nanopartículas. Independientemente del agente estabilizante empleado, el índice de recristalización fue aproximadamente del 60 %, con una entalpía de fusión cercana $10 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$. Por lo tanto, podrían ocurrir diferentes interacciones entre el fármaco y los diferentes componentes de las nanopartículas, es decir, diferentes arreglos de la idebenona dependiendo de su concentración y de la forma como interactúa con los lípidos y con la capa del agente estabilizante sobre la partícula (Sarpietro et al., 2014).

En las partículas que contienen TCC investigadas en el presente estudio, es posible suponer la formación de una fase líquida conteniendo moléculas de parabenos, moléculas de TCC y moléculas de trimiristina, la que se encuentra en equilibrio con una fase cristalina de trimiristina. No obstante, así como la incorporación de lípido líquido a la matriz sólida ha sido relacionada con una reducción en el índice de recristalización, para la incorporación de las moléculas de parabenos en las nanopartículas podría suponerse el mismo comportamiento. La reducción en la entalpía de fusión y en el índice de recristalización se atribuiría a la reducida cristalinidad de los lípidos sólidos en las nanopartículas lipídicas en comparación con sus homólogos a granel, sumado a la reducción de la cristalinidad aportado por el atrapamiento de moléculas del fármaco dentro del lípido (Shah et al., 2016).

De hecho, en varios estudios esta reducción en el índice de recristalización y la ausencia de señales térmicas correspondientes a la molécula atrapada se ha atribuido a la incorporación de dicha molécula en un estado amorfo en la nanopartícula. Tal es el caso, por ejemplo de la Coenzima Q10 incorporada en SLN de ácido esteárico y polisorbato 80 como agente estabilizante (Farboud et al., 2011) o del γ -orizanol incorporado en NLC preparados a partir de palmitato de cetilo como lípido sólido y Miglyol 812® como lípido líquido (Anantachaisilp et al., 2010).

En otros casos, la adición del fármaco condujo a un aumento en el índice de recristalización en comparación con las nanopartículas vacías, incluso a pesar de ser preparadas utilizando dos metodologías diferentes (homogenización a alta presión y ultrasonido). Además, se sugiere que la ausencia de eventos térmicos o señales de

difracción que puedan atribuirse al fármaco indican que éste se encuentra en un estado disperso en la fase lipídica (Silva et al., 2011).

- Comportamiento cristalográfico de los sistemas lipídicos investigados conteniendo parabenos

Los patrones de difracción de las dispersiones lipídicas cargadas con parabenos no evidencian señales de difracción características del metilparabeno o del propilparabeno (Figura 4–31). En particular, para el metilparabeno, la señal de mayor intensidad se presenta en 0.2452 nm y para el propilparabeno en 0.3489 nm, es decir, dichas señales no se solapan con las de los demás componentes de las nanopartículas.

De otro lado, el patrón de difracción de las dispersiones de nanopartículas conteniendo parabenos presenta el mismo comportamiento que el de las dispersiones vacías (Figura 4–22). Esto es, las señales de difracción detectadas para la trimiristina corresponden al polimorfo β . Además, la ausencia de señales características de los polimorfos β' y α indicaría que la incorporación de los parabenos a las nanopartículas no afecta el comportamiento cristalino de la trimiristina, lo que resultaría consecuente con el comportamiento térmico previamente descrito.

El que no se detecten los patrones característicos de difracción de la molécula atrapada en las nanopartículas (Venkateswarlu y Manjunath, 2004), no necesariamente implica que dichas moléculas sean incorporadas dentro de la partícula en estado amorfo. En general, la proporción de la molécula activa respecto a la matriz lipídica es muy baja y la ausencia de patrones de difracción asociados a dichas moléculas puede ser producto de la dilución o incluso, de falta de sensibilidad del equipo para detectar dichas señales.

De acuerdo con los resultados obtenidos, no se espera que las moléculas de parabeno se estructuren en la red cristalina de la trimiristina, es decir, la exclusión de las moléculas foráneas de la matriz lipídica podría ser una característica de las nanopartículas lipídicas que se produciría conforme transcurre la cristalización de los lípidos. Así, las moléculas de un principio activo deberían localizarse en otras regiones de la partícula, por ejemplo, en la superficie del cristal de trimiristina.

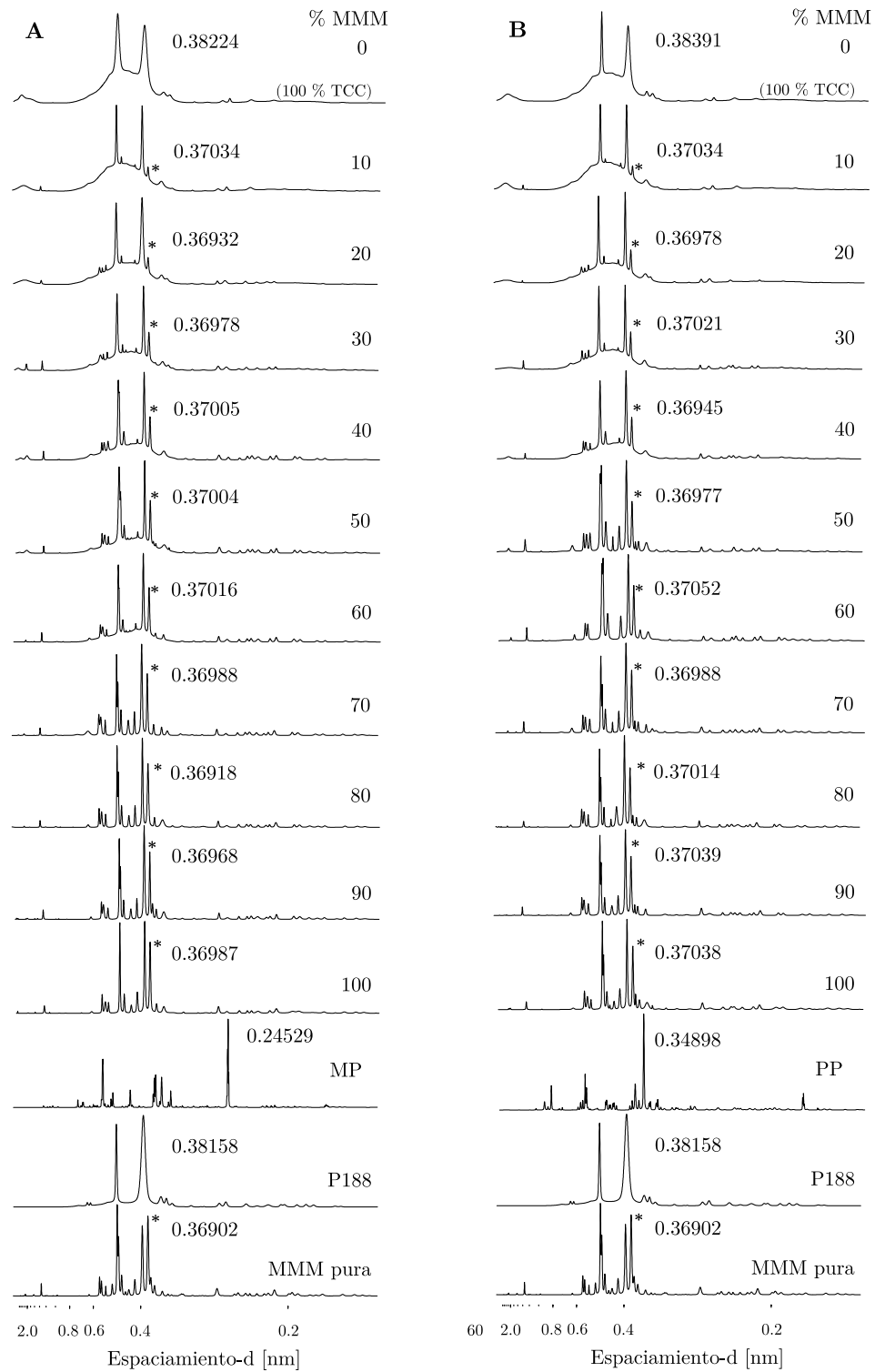


Figura 4-31. Patrones de difracción de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C cargadas con (A) MP y (B) PP y posteriormente liofilizadas.

Existe también la posibilidad de que las moléculas activas se encuentren en un estado solubilizado en la interfase entre el núcleo de la partícula y la capa de agente estabilizante. Además, es posible suponer que parte de los parabenos se encuentra disuelta en la fase acuosa en función de la solubilidad que presenten en dicho medio dispersante.

- Espectroscopía Raman de los sistemas lipídicos investigados conteniendo parabenos

En esta investigación, dado que las señales características de los parabenos no pudieron ser detectadas en los difractogramas para ninguna de las dispersiones estudiadas, a pesar de que las muestras fueron liofilizadas para ser analizadas, vale la pena preguntarse si en realidad las moléculas de parabenos están en un estado amorfo en alguna parte de las partículas o si, por el contrario, mediante difracción de rayos X no es posible detectar las señales de los cristales de los parabenos a las concentraciones incorporadas en las dispersiones.

Si bien es cierto que las moléculas de los parabenos pueden estar asociadas a las partículas lipídicas en un estado amorfo o solubilizado en la interfase de P188, también es cierto que las moléculas de parabenos no incorporadas o no asociadas a las partículas y que se encuentran disueltas en el medio dispersante deberían cristalizar durante la liofilización y eventualmente, la señal de difracción principal para cada parabeno podría ser claramente observada.

Por lo tanto, para confirmar la presencia de parabenos en las dispersiones y para tratar de elucidar las posibles interacciones entre las moléculas de los parabenos y las nanopartículas, las dispersiones liofilizadas fueron analizadas mediante espectroscopía Raman.

Como se observa en la Figura 4-32, las bandas correspondientes a la trimiristina se mantuvieron esencialmente sin ningún cambio importante respecto a aquellas observadas en las dispersiones sin la presencia de metilparabeno. Sin embargo, la proporción relativa de las dos bandas principales $\eta = I_{\sim 2846} / I_{\sim 2882}$, ubicadas en la región I de los espectros y que corresponden al estiramiento simétrico ν_s hacia 2846 cm^{-1} y

asimétrico ν_{as} hacia 2881 cm^{-1} del metileno CH_2 , respectivamente, sugieren que la trimiristina en las dispersiones cristaliza en el mismo polimorfo que el de la trimiristina pura, por consiguiente, la posible incorporación del metilparabeno no parece influir significativamente en el orden cristalino de la matriz lipídica.

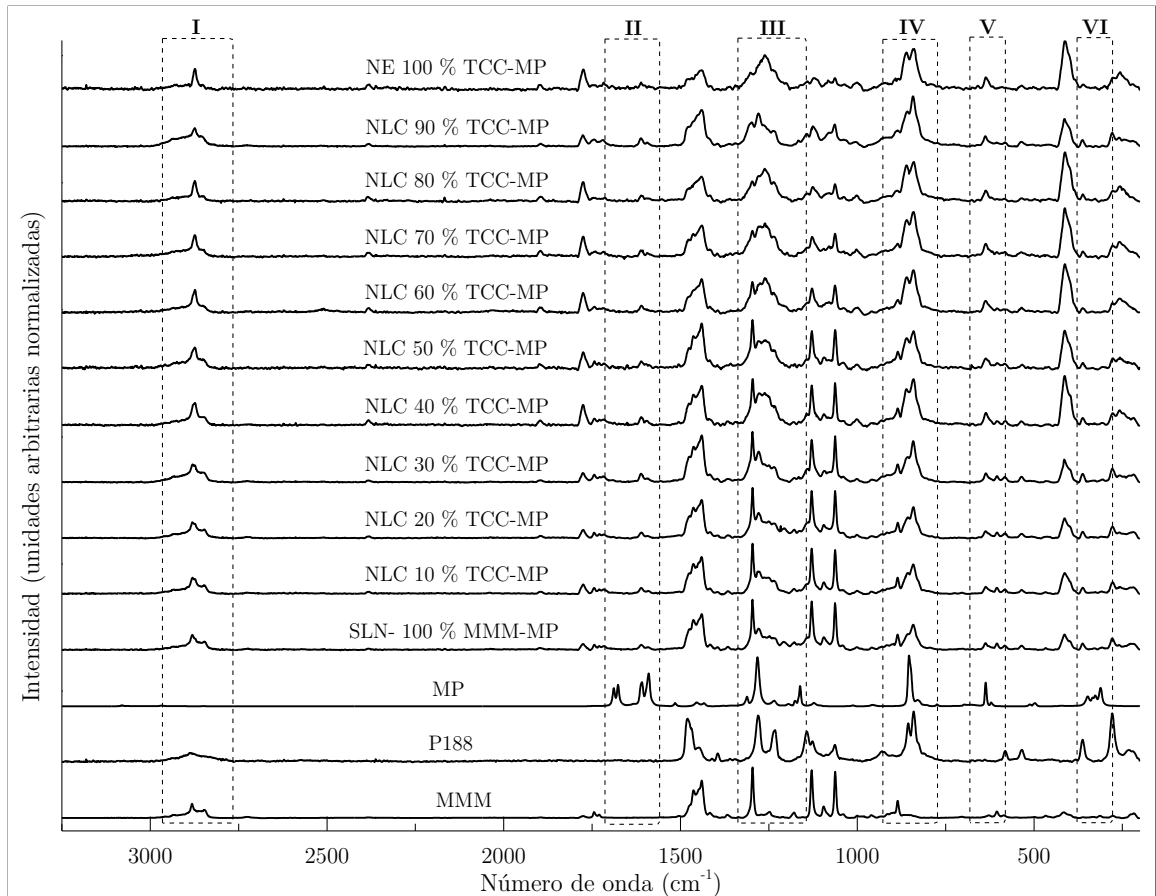


Figura 4–32. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4\text{ }^\circ\text{C}$ cargadas con metilparabeno.

En porcentaje, cantidad de TCC.

No obstante, los valores para η de la trimiristina en polvo con respecto al valor calculado para cada una de las dispersiones lipídicas cargadas con metilparabeno se mantienen constantes en aproximadamente 0.56 hasta una proporción de TCC del 40% . A proporciones mayores de TCC, el valor de η se hace cada vez menor (Tabla 4-5) y como ocurre en las dispersiones vacías, el número de onda del estiramiento simétrico se desplaza hacia 2873 cm^{-1} mientras que el número de onda del estiramiento asimétrico se desplaza hacia 2854 cm^{-1} , por lo que las bandas correspondientes al TCC predominan sobre las bandas de la trimiristina. Adicionalmente, también se aprecia

que la incorporación del metilparabeno en las dispersiones genera una disminución de la velocidad de cristalización, J , de las moléculas de trimiristina en las dispersiones, acorde con lo que se había observado previamente a partir de los comportamientos obtenidos por DSC y XRD.

Tabla 4-5. Proporción $\eta = I_{\sim 2846} / I_{\sim 2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de lípidos incorporadas con metilparabeno.

	Modo de estiramiento CH ₂				η
	ν_s		ν_{as}		
	λ (cm ⁻¹)	Intensidad (I)	λ (cm ⁻¹)	Intensidad (I)	
MMM	2846.39	0.17448	2881.82	0.30561	0.58
SLN	2846.82	0.18339	2881.39	0.33257	0.57
NLC10%	2848.12	0.17841	2880.55	0.31901	0.55
NLC20%	2847.69	0.20018	2880.55	0.36030	0.56
NLC30%	2847.69	0.21091	2880.12	0.37894	0.56
NLC40%	2847.69	0.22446	2873.33	0.46029	0.56
NLC50%	2849.83	0.18426	2873.76	0.49463	0.49
NLC60%	2851.55	0.16169	2873.33	0.47056	0.37
NLC70%	2847.69	0.13671	2873.76	0.43675	0.34
NLC80%	2848.55	0.14546	2873.76	0.43444	0.31
NLC90%	2856.27	0.14703	2874.18	0.44165	0.33
NE-MP	2851.12	0.17448	2873.60	0.30561	0.33

En porcentaje, cantidad de TCC.

El espectro Raman del metilparabeno tiene varias bandas características, agrupadas de la región II a la VI de la Figura 4–32. En la región II se ubican las vibraciones correspondientes a los modos de estiramiento C=O. Normalmente, estos modos de vibración se localizan a números de onda entre 1750 cm⁻¹ y 1725 cm⁻¹. Sin embargo, debido a que la constante de fuerza del estiramiento C=O disminuye por la conjugación C=C con el anillo bencénico y por la presencia de grupos donadores de electrones sobre dicho anillo, en este caso el grupo OH, la banda se desplaza hacia números de onda más bajos (Lin-Vien et al., 1991a) permitiendo su clara identificación con respecto a los modos de vibración del grupo carbonilo presente en los lípidos de la matriz. En este caso, aparecen dos dobletes uno en 1689 cm⁻¹ y 1678 cm⁻¹ y el otro en 1609 cm⁻¹ y 1590 cm⁻¹ debido a diferentes interacciones en la red cristalina (Vijayan et al., 2003). En la región III aparecen los modos de estiramiento COO como una serie de bandas entre 1370 cm⁻¹ y 1080 cm⁻¹ y en particular, una señal aguda e intensa en

1282 cm^{-1} y otra menos intensa pero igualmente aguda en 1162 cm^{-1} , característica de los ésteres conjugados con un grupo C=O.

El grupo metilo sobre el oxígeno del éster (O-CH₃) en el metilparabeno, tiene una banda débil pero bien definida en 2968 cm^{-1} que corresponde al estiramiento antisimétrico del CH₃. Igualmente, aparecen dos bandas en 1433 cm^{-1} y 1454 cm^{-1} , correspondientes a la deformación simétrica y antisimétrica del CH₃, respectivamente.

La banda intensa en la región IV hacia 854 cm^{-1} corresponde a las vibraciones ondulatorias de los carbonos CH del bencilo en la molécula del metilparabeno para los dos hidrógenos adyacentes *para* sustituidos, mientras que la banda hacia 637 cm^{-1} de la región V se atribuye a los modos de deformación del anillo bencénico. Finalmente, las bandas en la región VI entre 400 cm^{-1} y 300 cm^{-1} corresponden a los modos de vibración fuera del plano del anillo doblado en fenilos *para* sustituidos (Lin-Vien et al., 1991b).

Las vibraciones características que involucran el grupo OH de los fenoles sustituidos son los modos de estiramiento y flexión de los restos de O-H y C-O. Sin embargo, el estiramiento O-H muestra una dispersión muy débil en el espectro Raman (Lin-Vien et al., 1991c). De hecho, el estiramiento -OH para el metilparabeno está completamente ausente debido al cambio en la polarización como resultado de la centrosimetría en el cristal (Vijayan et al., 2003). No obstante, las vibraciones de estiramiento O-H del metilparabeno se presentan como dos bandas bien definidas, pero de poca intensidad hacia 3080 cm^{-1} y 3064 cm^{-1} .

Respecto a los espectros Raman del metilparabeno en las dispersiones de lípidos, son de particular interés las regiones II y V de la Figura 4-32. En la región II, las bandas del doblete en 1689 cm^{-1} y 1678 cm^{-1} están ausentes en todas las dispersiones de lípidos lo que indica que las interacciones del grupo C=O en la red cristalina ya no están presentes. Esto sugiere que el metilparabeno podría encontrarse asociado a las nanopartículas en un estado no cristalino. Además, la proporción de la intensidad de las bandas del doblete en 1609 cm^{-1} y 1590 cm^{-1} se invierten completamente en todas las dispersiones (Tabla 4-6).

Tabla 4-6. Proporción $I_{\sim 1609}/I_{\sim 1590}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C incorporadas con metilparabeno.

	Modo de estiramiento C=O				$I_{\sim 1609}/I_{\sim 1590}$
	λ (cm ⁻¹)	$I_{\sim 1609}$	λ (cm ⁻¹)	$I_{\sim 1590}$	
MP	1609.05	0.47665	1589.89	0.64973	0.73
SLN-MP	1610.90	0.07120	1591.75	0.03411	2.09
NLC10%-MP	1611.51	0.09091	1591.13	0.05074	1.79
NLC20%-MP	1610.90	0.11921	1594.23	0.07251	1.64
NLC30%-MP	1611.51	0.14640	1594.23	0.09234	1.59
NLC40%-MP	1610.90	0.16895	1594.23	0.10648	1.59
NLC50%-MP	1610.90	0.17798	1596.08	0.11340	1.57
NLC60%-MP	1610.90	0.18137	1596.08	0.11258	1.61
NLC70%-MP	1611.51	0.17917	1594.23	0.11121	1.61
NLC80%-MP	1610.90	0.17902	1595.46	0.11388	1.57
NLC90%-MP	1611.51	0.17548	1593.61	0.11111	1.58
NE-MP	1611.51	0.17224	1591.13	0.11293	1.53

En porcentaje, cantidad de TCC.

Las bandas de estiramiento del carbonilo se han usado en estudios previos para identificar las fases polimórficas en triglicéridos (Bresson et al., 2006). Por ejemplo, en la triestearina, ocurre una inversión de la intensidad de las bandas del grupo C=O al pasar del polimorfo β al polimorfo α (Da Silva et al., 2009). Por consiguiente, es posible suponer que para el caso del metilparabeno, la inversión de la intensidad de las bandas del carbonilo también sería un indicador de un cambio de fase desde una estructura altamente cristalina a una estructura amorfa. Esto, además, podría indicar que el metilparabeno se integra de algún modo en las nanopartículas sin afectar el patrón de cristalización de la trimiristina. Este hecho también se refleja en la región V de los espectros Raman de las dispersiones lipídicas conteniendo metilparabeno, en donde la banda hacia 636 cm⁻¹ de los modos de deformación del anillo bencénico se incrementan en intensidad en función de la concentración de TCC en la matriz lipídica, debido probablemente al incremento en los modos de deformación del anillo aromático a medida que aumenta la cantidad de TCC en la que se disuelven las moléculas del metilparabeno.

Resultados similares fueron previamente descritos para el γ -orizanol incorporado en SLN, NLC y NE, en donde la menor intensidad de las bandas características del γ -orizanol en las dispersiones de SLN sugiere que dicha molécula es más soluble en el lípido líquido que en el lípido sólido. En línea con lo anterior, la intensidad de las

bandas características de activo incrementan con la presencia del lípido líquido en los NLC (Anantachaisilp et al., 2010).

Para el caso del propilparabeno, los espectros Raman de las dispersiones se presentan en la Figura 4–33. Las vibraciones correspondientes a los estiramientos simétrico v_s y asimétrico v_{as} del metileno CH_2 , características de la trimiristina, se presentan en la región I hacia 2846 cm^{-1} y hacia 2881 cm^{-1} , respectivamente. En las dispersiones de nanopartículas con propilparabeno, la predominancia de las bandas del TCC se hace más evidente que en las dispersiones con metilparabeno o que en las dispersiones vacías. Esto podría indicar que la incorporación del propilparabeno en las nanopartículas tendría un mayor efecto sobre los modos vibracionales de la trimiristina, probablemente debido a una mayor interacción con los componentes de la matriz.

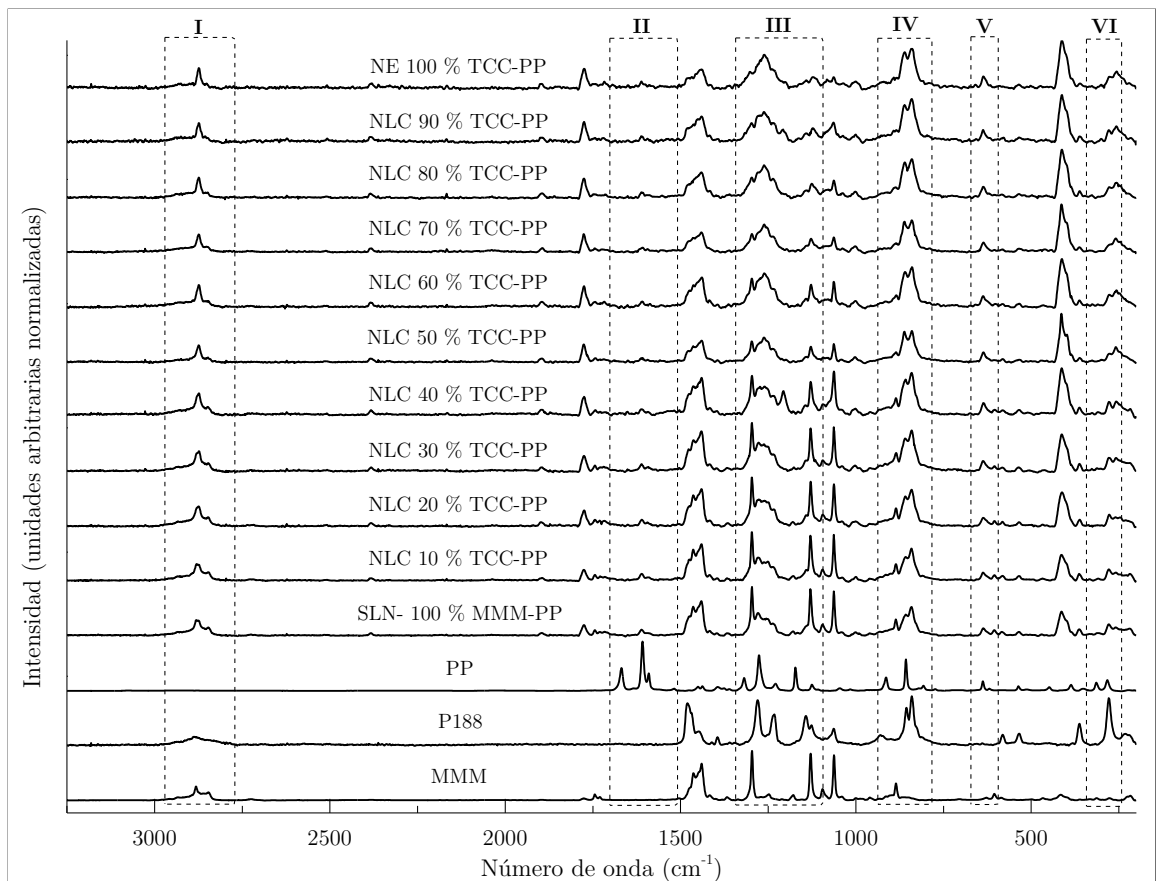


Figura 4–33. Espectros Raman obtenidos por excitación a 785 nm de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ cargadas con propilparabeno.

En porcentaje, cantidad de TCC.

De hecho, los valores para η de las dispersiones con propilparabeno se hacen mucho más pequeños con el incremento de la cantidad de TCC en las dispersiones (Tabla 4-7). Lo mismo ocurre con las bandas hacia 1776 cm^{-1} y 415 cm^{-1} propias de la presencia del TCC en las nanopartículas. Similar al espectro Raman del metilparabeno, el espectro del propilparabeno también presenta ciertos rasgos característicos que lo diferencian de los espectros Raman de los componentes de la matriz de las nanopartículas.

En la región II de la Figura 4-33, se ubican las vibraciones del estiramiento C=O. A diferencia de los dobles dobletes presentes en el espectro Raman del metilparabeno, en el propilparabeno solo están presentes un doblete con bandas en 1608 cm^{-1} y 1590 cm^{-1} y una banda individual en 1668 cm^{-1} .

Tabla 4-7. Proporción $\eta = I_{\sim 2846} / I_{\sim 2882}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ incorporadas con propilparabeno.

	Modo de estiramiento CH ₂				η
	ν_s		ν_{as}		
	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Intensidad (I)	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Intensidad (I)	
MMM	2846.39	0.18475	2881.39	0.33136	0.58
SLN	2846.82	0.19595	2880.12	0.35994	0.56
NLC10%	2847.25	0.20273	2880.12	0.38495	0.54
NLC20%	2847.25	0.19132	2878.85	0.39203	0.53
NLC30%	2847.25	0.22282	2873.33	0.49501	0.49
NLC40%	2848.55	0.11684	2874.18	0.36300	0.45
NLC50%	2848.12	0.15277	2873.76	0.47561	0.32
NLC60%	2850.26	0.14690	2873.76	0.39220	0.32
NLC70%	2851.55	0.13607	2873.76	0.44037	0.37
NLC80%	2848.55	0.16898	2873.33	0.43532	0.31
NLC90%	2855.84	0.12719	2873.76	0.44165	0.39
NE	2852.84	0.18475	2881.39	0.33136	0.29

En porcentaje, cantidad de TCC.

La ausencia del doblete en el propilparabeno podría ser causada por las diferencias en el arreglo de las moléculas en la red cristalina de cada uno de estos parabenos lo que podría modificar las interacciones entre los grupos carbonilo de ambas moléculas. En el propilparabeno dos moléculas cristalográficamente independientes (A, B) forman cadenas infinitas separadas, pero estructuralmente análogas, mediante enlaces de hidrógeno de cabeza a cola que involucran al grupo OH

como donante y al átomo de O del carbonilo como aceptor. De esta forma las moléculas A y B son coplanares y en consecuencia, la estructura cristalina es laminar (Giordano et al., 1999).

De otro lado, en la estructura cristalina del metilparabeno hay tres moléculas de metilparabeno de simetría independiente, en donde dos de las superficies de los anillos aromáticos son casi paralelas entre sí (con los grupos carbonilos casi superpuestos), pero muestran un ángulo significativo con el tercer anillo. Al considerar los enlaces de hidrógeno que conectan las moléculas en tres dimensiones, las moléculas del metilparabeno formarían una red tridimensional en la red cristalina con enlaces de hidrógeno en las direcciones de los tres ejes. La red del metilparabeno se ve reforzada por los enlaces de hidrógeno tridimensionales y, por lo tanto, los cristales de metilparabeno no tienen planos de deslizamiento en su red cristalina (Feng y Grant, 2006). Estas diferencias en el orden tridimensional de las moléculas del metil y el propilparabeno modifica las interacciones presentes entre los grupos carbonilo de ambas moléculas.

En la región III de la Figura 4-33, aparecen los modos de estiramiento COO como una serie de bandas entre 1345 cm^{-1} y 1090 cm^{-1} . En esta zona se presenta una banda aguda e intensa en 1276 cm^{-1} y otra menos intensa pero igualmente aguda en 1172 cm^{-1} , la que como se ha mencionado, es característica de los ésteres conjugados con un grupo C=O.

El grupo propilo sobre el oxígeno del éster $\text{O}-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ presenta bandas entre 1340 cm^{-1} y 1490 cm^{-1} . Las bandas en 1476 cm^{-1} y 1438 cm^{-1} corresponden al modo de deformación CH_2-CH_2 y las bandas en 1376 cm^{-1} y 1450 cm^{-1} se atribuyen a los estiramientos simétrico y asimétrico del CH_3 , respectivamente. Por su parte, las bandas en 1394 cm^{-1} y 1361 cm^{-1} corresponden al modo de ondulación del $\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$.

De otro lado, las bandas en la región IV en 857 cm^{-1} y 913 cm^{-1} corresponden a las vibraciones ondulatorias de los carbonos CH del fenilo y a los dos hidrógenos adyacentes de bencilo *para* sustituidos fuera del plano en la molécula del propilparabeno. En la región V, la banda en 638 cm^{-1} se puede atribuir a los modos

de deformación del anillo bencénico. Finalmente, como se describió para el metilparabeno, las bandas en la región VI entre 400 cm^{-1} y 300 cm^{-1} corresponderían a los modos de vibración fuera del plano del anillo doblado en fenilos *para* sustituidos.

Como se observa en la Figura 4-33, los espectros Raman de las dispersiones de lípidos incorporando propilparabeno, se caracterizan por la ausencia de la banda en 1668 cm^{-1} en todas las dispersiones lipídicas, independientemente de la presencia de TCC en la matriz, tal y como ocurre con el doblete del metilparabeno en 1689 cm^{-1} y 1678 cm^{-1} . Sin embargo, a diferencia de lo que se presenta con el metilparabeno, las bandas correspondientes al estiramiento del carbonilo del propilparabeno de la región II no se invierten en las dispersiones lipídicas, aunque también se observa una reducción en la proporción relativa de la intensidad de las bandas con el incremento de la cantidad de TCC en las nanopartículas (Tabla 4-8). Sobre esta base, es válido suponer que las moléculas del propilparabeno están asociadas a las nanopartículas en un estado solubilizado no cristalino.

Tabla 4-8. Proporción $I_{\sim 1608}/I_{\sim 1591}$ para los modos de estiramiento de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ incorporadas con propilparabeno.

	Modo de estiramiento C=O				$I_{\sim 1608}/I_{\sim 1591}$
	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$I_{\sim 1608}$	$\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	$I_{\sim 1591}$	
PP	1608.43	1.00000	1590.51	0.35853	2.79
SLN-PP	1610.90	0.13699	1592.99	0.06989	1.96
NLC10%-PP	1610.90	0.16247	1590.51	0.09078	1.79
NLC20%-PP	1610.28	0.15235	1594.84	0.09746	1.56
NLC30%-PP	1610.90	0.17126	1592.99	0.11122	1.54
NLC40%-PP	1610.28	0.17278	1592.99	0.12209	1.42
NLC50%-PP	1611.51	0.10477	1593.61	0.07122	1.47
NLC60%-PP	1610.28	0.14119	1588.03	0.09596	1.47
NLC70%-PP	1609.05	0.12561	1594.23	0.09817	1.28
NLC80%-PP	1610.09	0.10128	1594.23	0.07408	1.37
NLC90%-PP	1610.09	0.15569	1594.23	0.11972	1.30
NE-PP	1611.51	0.17224	nd	nd	nd

nd: No detectado. En porcentaje, cantidad de TCC.

Las características de los espectros Raman para las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo metil o propilparabeno son similares a las descritas previamente para la incorporación de curcuminoides en nanoemulsiones y nanosuspensiones de trimiristina. En dichos estudios también se encontró una relación entre las bandas

características de los curcuminoides en función de su estado físico. Cuando las bandas de los curcuminoides incorporados en las nanopartículas se compararon con los espectros de los curcuminoides libres, se encontró que éstos eran más parecidos al espectro de los curcuminoides no cristalinos sugiriendo que la mayoría del fármaco se incorpora en las nanopartículas en un estado amorfo o solubilizado. Por lo tanto, la incorporación de los curcuminoides en una matriz lipídica altamente ordenada es bastante improbable (Noack et al., 2012).

En un modelo de partícula previo basado en la información de la literatura reportada, se propuso la formación de una especie de degradado cristalino en donde el interior de la partícula estaría formado por un polimorfo del lípido sólido del tipo β y a medida que se acerca a la superficie, la cristalinidad se va reduciendo, pasando primero por el polimorfo tipo β' hasta el polimorfo α en la superficie (Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018). Sin embargo, las mezclas binarias de un lípido sólido y un lípido líquido usadas para preparar NLC no siempre conducen a la formación de soluciones sólidas dado que en la mayoría de los casos se obtienen mezclas eutécticas.

La formación de reservorios líquidos al interior de la nanopartícula es poco probable debido a la estructura laminar de los cristales de los triglicéridos. En cambio, sería más probable que la fase líquida se ubique hacia la superficie de las partículas para mantener el equilibrio de la mezcla eutéctica. A muy bajas proporciones de aceite, las moléculas del lípido líquido estarían solubilizadas en la interfase del agente tensioactivo. No obstante, a elevadas proporciones, las moléculas de aceite formarían fases separadas ubicadas entre los bordes y la superficie de los cristales del lípido sólido y la interfase del agente estabilizante, en donde se localizarían las moléculas del activo en un estado amorfo o solubilizado. Incluso, es posible suponer que cuando la proporción de TCC en la mezcla binaria supera la proporción de trimiristina se forme una estructura en la que cada cristal de trimiristina esté dentro de una gota de TCC (Figura 4-34).

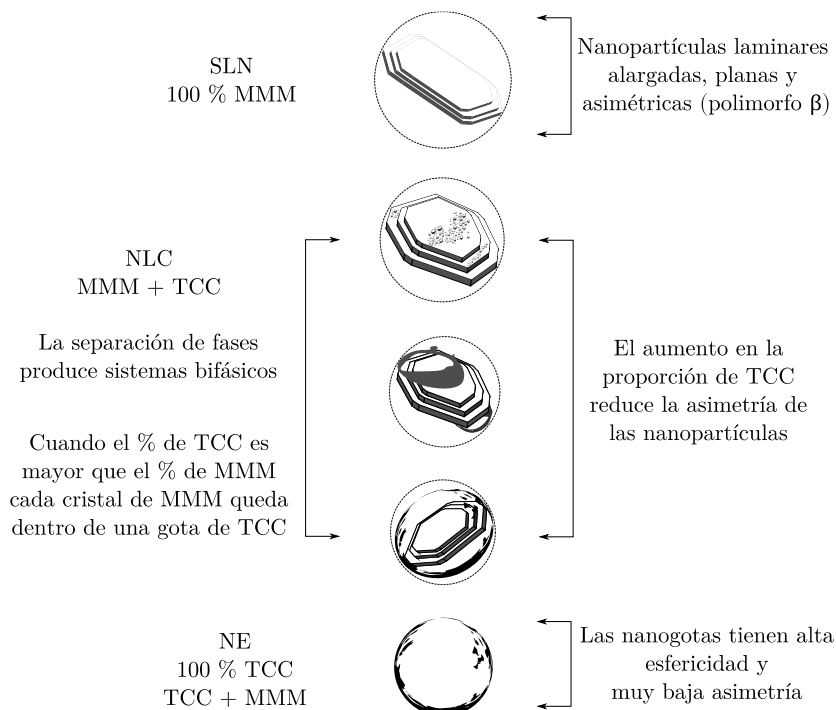


Figura 4–34. Representación esquemática de las posibles estructuras de las SLN y los NLC.

Por lo tanto, nuestros resultados se corresponden con estructuras en las que el lípido líquido se ubica sobre una superficie de un cristal tipo β y en donde se solubilizarían las moléculas del activo (Bunjés et al., 2001; Jores et al., 2004; Kupetz y Bunjes, 2014; Noack et al., 2012; Westesen et al., 1997).

Las diferentes estructuras de la Figura 4–34 permiten explicar la reducción en el tamaño de las partículas y en el índice de polidispersidad a medida que aumenta la proporción de TCC en la dispersión debido al aumento en la asimetría de las partículas. Además, son consistentes con la reducción de la velocidad de nucleación observada si se asume que las moléculas de trimiristina cristalizan dentro de las gotas de TCC, lo que también permite explicar las desviaciones observadas en las entalpías de fusión de la trimiristina debido a las diferencias en la capacidad calorífica del crisol de muestra y el crisol de referencia. Los cristales de trimiristina en el crisol de referencia se funden en un medio que puede ser la fase dispersante o las gotas de TCC en las que los cristales están inmersos.

4.3 Características de superficie

La presencia del agente estabilizante en los sistemas coloidales influencia no solo la formación de las nanopartículas sino que tiene efectos indirectos sobre el tamaño y la carga e impacta el proceso de cristalización y el comportamiento polimórfico de la matriz lipídica (Helgason et al., 2009b; Keck et al., 2014b; Nik et al., 2012; Salminen et al., 2016; Zhao et al., 2014). Varios estudios han sugerido que la interacción entre la interfase y el núcleo lipídico afecta la eficiencia de atrapamiento, la resistencia a la oxidación y la liberación de compuestos encapsulados (Helgason et al., 2009a; Tan et al., 2010; Yang y Alexandridis, 2000). Respecto a este último punto, entender cómo una molécula activa es liberada a partir de sistemas coloidales basados en lípidos requiere el conocimiento detallado del núcleo lipídico y sus propiedades de superficie. En este sentido, algunos estudios ofrecen evidencia indirecta de las interacciones entre la interfase formada por el agente estabilizante y la matriz lipídica a través de la investigación del comportamiento cristalino de los lípidos de la matriz, de su estabilidad química, de la habilidad para incorporar moléculas activas en su estructura o de la cinética de entrega de dichas moléculas. Otros estudios se han enfocado hacia el entendimiento de la influencia del núcleo lipídico sobre la organización molecular y la dinámica del agente estabilizante en la interfase (Bricarello et al., 2015). Como un aporte al estado del arte en este tema, la presente investigación abordó el estudio de la superficie de las nanopartículas lipídicas a partir de la estimación del potencial zeta, la cuantificación del agente estabilizante adsorbido, la agregación inducida por electrolitos y el análisis de la hidrofobicidad de la superficie.

4.3.1 Potencial zeta

La mayoría de las superficies sólidas adquieren una carga cuando están dentro de un sistema acuoso, la que es balanceada por contraiones de carga opuesta en la solución formando una capa eléctrica interfacial denominada doble capa eléctrica (Electric Double Layer, EDL). La imagen más simple de la EDL es un modelo físico en el que una capa se concibe como una carga firmemente unida a la superficie, mientras que la otra capa se distribuye de manera más o menos difusa dentro de la solución en contacto con la superficie. Esta capa contiene un exceso de contra-iones (iones

opuestos en signo a la carga fija) y tiene un déficit de co-iones (iones del mismo signo que la carga fija) (Delgado et al., 2005).

La formación de la EDL afecta marcadamente el comportamiento físico y químico de los sistemas heterogéneos. Por lo tanto, los métodos capaces de estimar el estado de carga de las superficies sólidas con respecto a variables importantes de la solución, como el pH, la fuerza iónica o la composición de la superficie de contacto, son de gran importancia en la caracterización de los sistemas dispersos (Předota et al., 2016). El potencial en el plano de corte donde se produce el deslizamiento de la EDL con respecto a la solución se identifica como el potencial electrocinético o potencial ζ (Delgado et al., 2005). Dicho potencial se usa a menudo para aproximar la carga macroscópica de superficies sólidas y de partículas coloidales en contacto con solventes y se ha convertido en parámetro de caracterización estándar para evaluar la superficie de las nanopartículas (Smith et al., 2017).

El potencial ζ para las dispersiones de la Tabla 3-1 fue estimado mediante microelectroforesis capilar y los resultados se muestran en las Figuras 4-35 y 4-36 para las dispersiones enfriadas a 4 °C y 20 °C, respectivamente. En todos los casos, el valor estimado del potencial ζ permaneció sin cambios durante los dos años de almacenamiento bajo las condiciones de ensayo previamente descritas e independientemente de la proporción de TCC y de la historia térmica inducida en cada dispersión. Además, tampoco se encontraron diferencias en el pH de las dispersiones ni se evidenció cambio alguno durante el almacenamiento (Anexo C, Figura C-1).

Para las dispersiones coloidales de lípidos, el valor de potencial ζ se distribuye en un amplio rango de valores resultado de las características propias de cada sistema estudiado y de las diversas condiciones de medida empleadas para estimar su valor (Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018). De modo general, se ha establecido que la elevada estabilidad de las dispersiones de lípidos puede ser atribuida al valor estimado del potencial ζ y que se requiere un valor de potencial zeta por lo menos de $|30|$ mV para conseguir una buena estabilidad física de las dispersiones y mayor a $|60|$ mV para dispersiones con excelente estabilidad (Freitas y Müller, 1998).

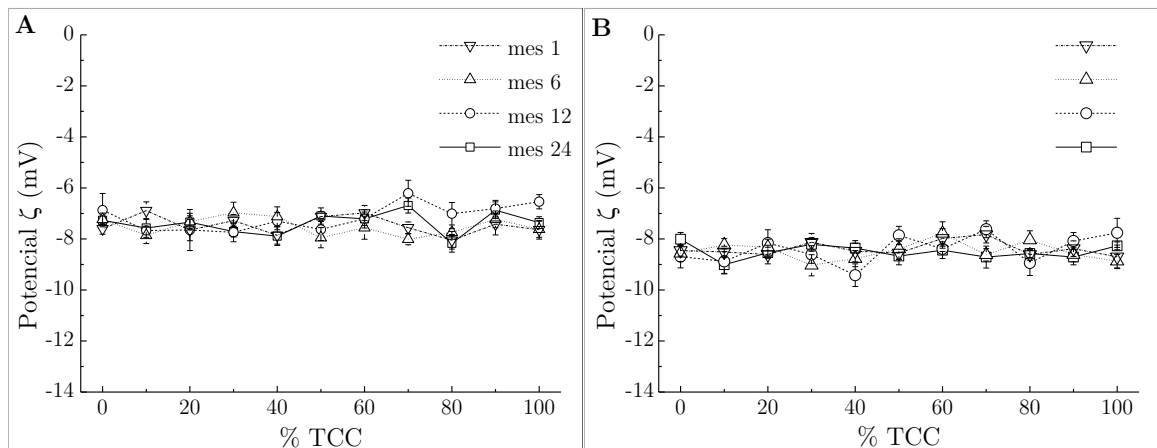


Figura 4-35. Comportamiento del potencial ζ durante el almacenamiento de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C durante 24 h.

El potencial fue estimado en A: NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en B: solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (promedio \pm S.D., $n = 5$). La concentración de la dispersión se ajustó en $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y la conductividad en $50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. El pH de las dispersiones diluidas fue 4.79 ± 0.22 y 6.18 ± 0.19 en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. El pH de las dispersiones originales fue de 4.18 ± 0.16 . Los valores de índice de refracción y de viscosidad para una solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ se muestran en el Anexo A, Tabla A-5.

Esto es válido cuando se emplean como estabilizantes moléculas de bajo peso molecular con un efecto de estabilización predominantemente electrostático. Sin embargo, para los estabilizantes poliméricos no iónicos de alto peso molecular, que actúan principalmente por estabilización estérica, un potencial ζ de $|20| \text{ mV}$ o mucho menor puede proporcionar suficiente estabilidad física (Kovačević et al., 2014). Además, si bien son útiles los valores de potencial ζ , éstos proporcionan conclusiones muy generales sobre el carácter de carga superficial que sin una comprensión profunda de los parámetros de medición y las limitaciones de la técnica pueden perder su significado (Smith et al., 2017).

Los valores de potencial ζ obtenidos para las dispersiones estudiadas en este trabajo, oscilando entre -6 mV y -10 mV , indican la presencia de una ligera carga superficial que podría ser generada por la disociación de los ácidos grasos presentes en la trimiristina y los TCC o, preferentemente, ser una consecuencia de la capa de P188 sobre la partícula. Así, estas partículas pueden clasificarse como débilmente ionogénicas en donde la estabilidad observada durante los dos años de almacenamiento

es debida principalmente a la repulsión y al espesor hidrodinámico de la capa de polímero no iónico adsorbido sobre la superficie de las partículas.

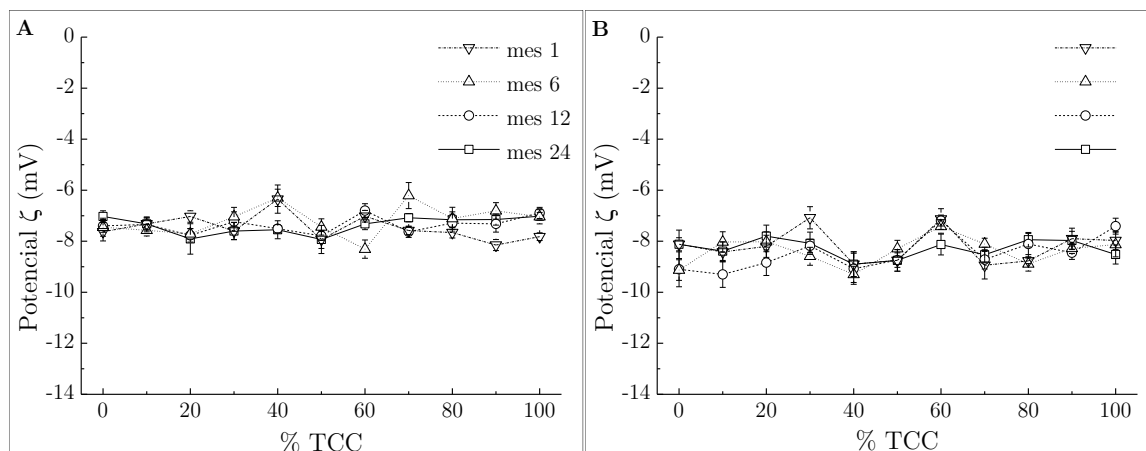


Figura 4-36. Comportamiento del potencial ζ durante el almacenamiento de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 20 °C durante 24 h.

El potencial fue estimado en A: NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en B: solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (promedio \pm S.D., $n = 5$). La concentración de la dispersión se ajustó en $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y la conductividad en $50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. El pH de las dispersiones diluidas fue 4.77 ± 0.33 y 6.16 ± 0.19 en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. El pH de las dispersiones originales fue de 4.20 ± 0.20 .

La capa de polímero sobre la superficie de la partícula hace que el plano de corte en el que se mide el potencial se aleje de la interfase de la partícula y consecuentemente, el potencial ζ determinado usando el medio dispersante original es menor que el potencial ζ determinado diluyendo la dispersión en un medio libre del agente estabilizante, aunque la carga superficial real de la partícula permanece sin cambios (Ohshima, 2002; Trzaskus et al., 2016). Además, las propiedades de la doble capa eléctrica de las superficies desnudas de las partículas lipídicas pueden ser completamente enmascaradas cuando están recubiertas con una capa del agente estabilizante. Por lo tanto, la influencia de un potencial que emana de la interfase desnuda de la partícula lipídica débilmente cargada sería despreciable (van Oss, 2008a).

Debido a la disminución lineal del potencial ζ con el logaritmo de la fuerza iónica, pequeños cambios en la concentración de electrolitos tienen un efecto significativo sobre el potencial ζ medido (Smith et al., 2017). Esto explicaría el por qué el potencial

ζ estimado en la solución de NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ es ligeramente menor que el potencial ζ estimado en P188 al 2.5 % p/v + $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl.

La disminución en el potencial ζ estimado en dispersiones de lípidos diluidas en el medio dispersante original fue descrita para SLN de cetil palmitato estabilizadas con tensioactivos polihidroxilados. Por ejemplo, el potencial ζ medido de las SLN en una dispersión al 1 % de caprilil/capril glucósido (agente estabilizante) fue de -27.4 mV mientras que cuando se empleó una dilución de NaCl ajustada en $50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ se alcanzaron valores de -52.4 mV , es decir, se presentó un aumento del potencial de aproximadamente 25 mV en el valor medido. No obstante, para las SLN estabilizadas con estearato de sacarosa, la reducción del potencial ζ fue de 8 mV (Kovačević et al., 2014).

La naturaleza del agente estabilizante también se ha asociado con cambios en el potencial ζ observado durante el almacenamiento. Por ejemplo, SLN de gliceril behenato estabilizadas con el tensioactivo no iónico diestearato de poligliceril 3–metil glucosa (Tego Care® 450), presentaron fenómenos de gelación en todas las muestras después de 60 días de almacenamiento a pesar de que los valores de potencial ζ estimados para las dispersiones de lípidos fueron superiores a -40 mV . De modo que los valores de potencial ζ estimados para estas dispersiones no se correlacionan con la estabilidad observada durante el almacenamiento (Seetapan et al., 2010).

De otro lado, se han reportado resultados contradictorios respecto a la relación del potencial zeta con la proporción de aceite empleado en las nanopartículas. Si bien algunos autores han encontrado que al aumentar la proporción de aceite aumenta el valor del potencial ζ estimado (Charoenputtakun et al., 2015; Kovačević et al., 2011; Teeranachaideekul et al., 2008), otros no evidenciaron ningún cambio apreciable en el valor del potencial (Aditya et al., 2014; Das et al., 2012; Hu et al., 2005) e incluso, algunos estudios reportaron una disminución del potencial a medida que aumenta la proporción del aceite en la partícula (Hu et al., 2006; Saupe et al., 2006). Por ejemplo, en nanopartículas lipídicas a base de cetil palmitato estabilizadas con poliglicerol 6–distearato, el potencial ζ varió de -32 mV en nanopartículas sin la adición de aceite a -50 mV con la adición de 60 % de aceite a la matriz, contrario a lo observado en nanopartículas estabilizadas con caprilil/capril glucósido en las que no se evidenció

ningún cambio en el potencial ζ . Tal incremento en el potencial fue asociado a cambios estructurales que se presentan en las partículas en los que se presume que el aceite migra a la superficie aumentando la proporción de ácidos grasos libres y consecuentemente la extensión de grupos cargados en la superficie (Kovačević et al., 2011; Teeranachaideekul et al., 2008). No obstante, el incremento del potencial ζ no se reflejó en una mayor estabilidad de las dispersiones dado que el aumento de la proporción de aceite condujo a una ligera inestabilidad (Kovačević et al., 2011).

Además, incluso las gotas de aceites considerados de naturaleza altamente apolar y no ionizable como el xileno, dodecano o hexadecano, cuando son dispersadas en agua sin la presencia de agentes estabilizantes desarrollan una elevada carga negativa debido probablemente a la adsorción en la interfase aceite-agua de los iones hidroxilo procedentes del equilibrio de disociación del agua. Esto les permite lograr valores de potencial ζ de hasta -60 mV, el que es dependiente de la fuerza iónica, el pH y la concentración de agentes estabilizantes no iónicos (Marinova et al., 1996).

De acuerdo con lo anterior, la interpretación del valor de potencial ζ estimado en las dispersiones de nanopartículas lipídicas debe realizarse con cuidado. Por lo tanto, para evaluar su significado y llevar a cabo comparaciones con otros sistemas dispersos es importante tener en cuenta la naturaleza y la concentración tanto de las nanopartículas como del agente estabilizante, los electrolitos en solución y el pH, variables que en todos los casos deberán ser plenamente reportadas.

De otro lado, el potencial ζ de las dispersiones de nanopartículas cargadas con metilparabeno y propilparabeno se muestra en la Figura 4-37.

Como se observa, se conservan los mismos valores que para las nanopartículas vacías, lo que sugiere que la incorporación de las moléculas de parabenos no afecta el potencial ζ de las nanopartículas lipídicas, independientemente del tipo de parabeno o del estado físico de los lípidos de la matriz. Este comportamiento no es del todo inesperado si se tiene en cuenta que las moléculas de metil y de propilparabeno se ionizan en una muy baja proporción (los valores de pK_a para el metil y el propilparabeno son de 8.17 y 8.35, respectivamente (Soni et al., 2005)) y por consiguiente, no aportarían una carga significativa a las nanopartículas.

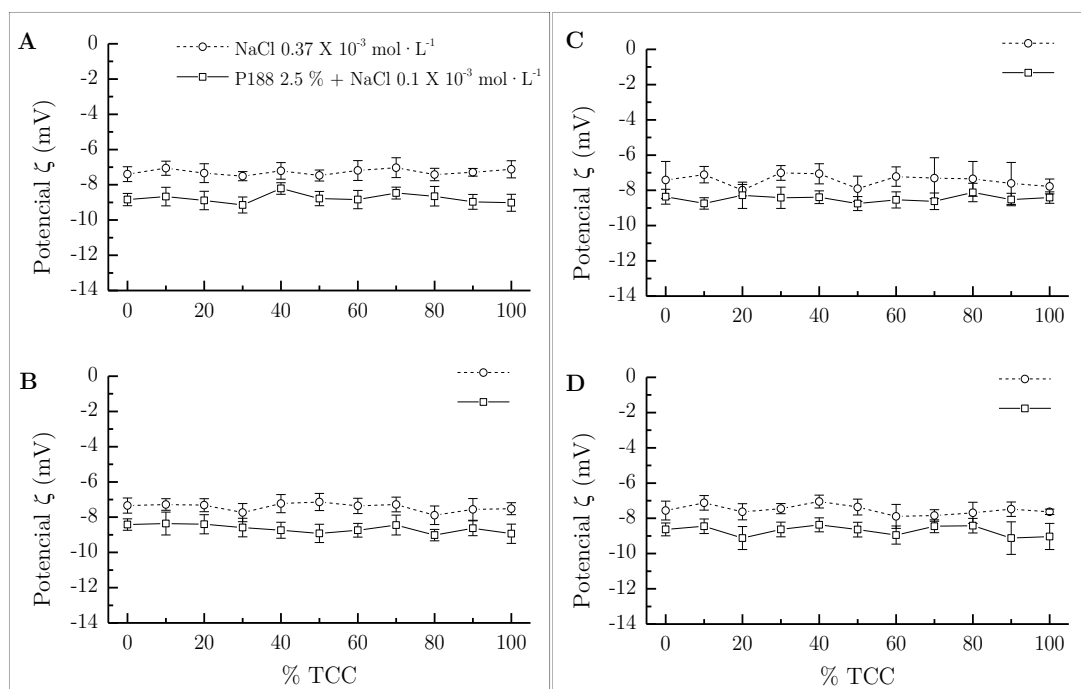


Figura 4–37. Comportamiento del potencial ζ de las dispersiones de lípidos con parabenos. Izquierda (A y B) dispersiones enfriadas a 4 °C; derecha (C y D) dispersiones enfriadas 20 °C; arriba (A y C) dispersiones conteniendo metilparabeno; abajo (B y D) dispersiones conteniendo propilparabeno. La concentración de cada dispersión se ajustó en $200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ y la conductividad en $50 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$. El pH de las dispersiones cargadas con parabenos se presenta en el Anexo C, Tabla C-2. Los valores de índice de refracción y de viscosidad para una solución de P188 al 2.5 % p/v se muestran en el Anexo A, Tabla A-5.

No obstante, si bien algunos estudios tampoco reportan cambios en el potencial ζ de las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo moléculas activas (Aditya et al., 2014, 2013; Lee et al., 2007; Pandita et al., 2014, 2011; Vieira et al., 2018), existen investigaciones que evidencian cambios en este parámetro. En algunos de ellos, por ejemplo, el valor absoluto del potencial ζ disminuye (Büyükköroğlu et al., 2016a; Chirio et al., 2011; Jain et al., 2013; Wang et al., 2015; J. Zhang et al., 2013), mientras que en otros incrementa (Attama et al., 2008; Banerjee et al., 2019; Jain et al., 2014; Lacerda et al., 2011; Tiwari y Pathak, 2011; Videira et al., 2012; J. Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2014).

Sin embargo, independientemente del valor reportado, la mayoría de los estudios asocian el potencial ζ de las nanopartículas con la estabilidad de las dispersiones (Aditya et al., 2013; Andrade et al., 2014; Banerjee et al., 2019; Maretta et al., 2016; Vaghasiya et al., 2013; Wang et al., 2015; Yuan et al., 2008), o con la ubicación

preferente de las moléculas en las nanopartículas (Das et al., 2012; Fazly Bazzaz et al., 2016; Urbán-Morlán et al., 2010; Venkateswarlu y Manjunath, 2004). En la presente investigación, no fue posible corroborar ninguno de estos planteamientos dado que la estabilización de las dispersiones de partículas ocurre principalmente por un mecanismo estérico y no electrostático y el potencial ζ de las partículas no es modificado con la adición de las moléculas de parabenos investigadas.

4.3.2 Tensioactivo en superficie

El Poloxamer 188 (P188) es el nombre genérico del copolímero en bloque no iónico soluble en agua, sintetizado por ejemplo a partir de la adición secuencial de óxido de propileno (PO) a un compuesto de bajo peso molecular hidrosoluble como el propilenglicol para después adicionar óxido de etileno (EO) dando como resultado copolímeros tribloque de polioxietileno (PEO) y polioxipropileno (PPO) denotados como PEO-PPO-PEO como se muestra en la Figura 4–38 (Schmolka, 1977). En el ámbito farmacéutico se le considera un importante agente activo de superficie cuyas propiedades anfífilas derivan de la proporción PEO (hidrófilo)/PPO (lipófilo). Particularmente, el P188 usado en este estudio posee un peso molecular promedio de 8400 Da en el que la proporción de PEO es de aproximadamente el 80 %. Además, este tensioactivo tiene una temperatura de fusión de 52 °C y un balance hidrófilo/lipófilo (HLB) >24 (Alexandridis, 1997; Alexandridis y Alan Hatton, 1995).

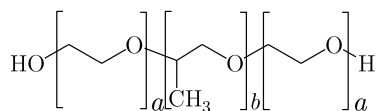


Figura 4–38. Estructura general del Poloxamer 188.

La proporción de a (PEO): b (PPO) es de 76-80(×2):29 (Alexandridis, 1997; Alexandridis et al., 1994; Alexandridis y Alan Hatton, 1995; Oh et al., 2004).

El P188 posee baja temperatura de solución crítica en agua, es decir, el agua se convierte progresivamente en un mal disolvente a medida que aumenta la temperatura. Esto conduce a que la formación de micelas se presente a una temperatura superior a los 50 °C debido a que los efectos hidrófobos aumentan con la temperatura y, por lo tanto, la separación macroscópica de fases conocida como “punto de nube” (Cloud Point, CP) se evidencie a temperaturas incluso más altas

(>100 °C) (Alexandridis, 1997; Alexandridis y Alan Hatton, 1995). En consecuencia, no se espera encontrar micelas en las dispersiones estabilizadas con P188 como agente tensioactivo a temperatura ambiente.

A pesar del uso de la misma concentración de P188 en la preparación de todas las dispersiones, la cantidad estimada de agente estabilizante adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas fue claramente dependiente del tratamiento térmico realizado y de la proporción de TCC en la dispersión (Figura 4–39). Para las dispersiones tratadas a 4 °C la cantidad de P188 en la superficie de las nanopartículas es mayor a medida que se aumenta la proporción de MMM y se hace constante a proporciones superiores al 50 % de lípido líquido en las dispersiones conteniendo tanto MP como PP (Figuras–39A y 4–39B). Para las dispersiones de nanopartículas con 100 % de MMM (SLN), la cantidad de P188 es superior al 80 % mientras que en las dispersiones con 100 % de TCC (NE) esta cantidad se reduce al 60 %.

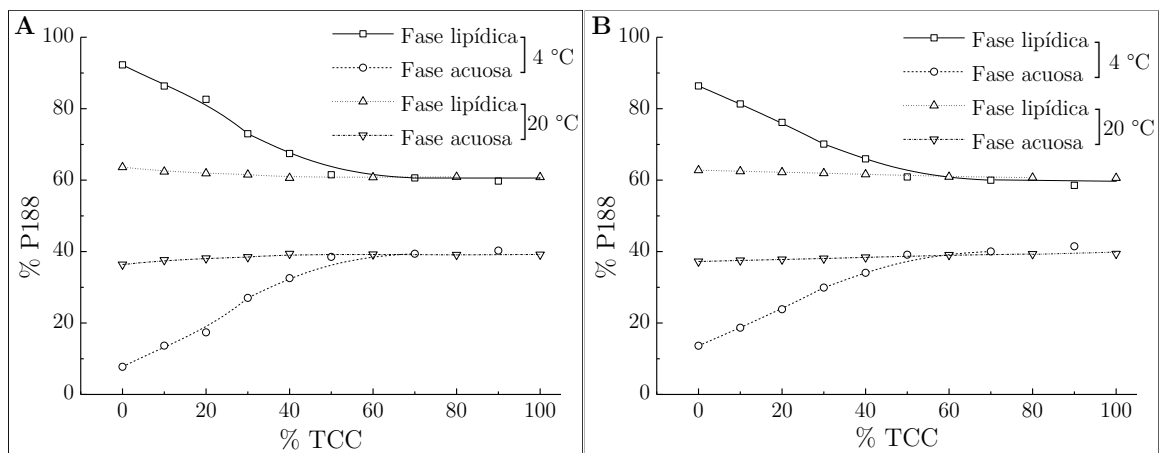


Figura 4–39. Cantidad de P188 adsorbido y en solución en dispersiones lipídicas.

La cantidad de P188 fue determinada en la fase lipídica y en la fase acuosa para las dispersiones tratadas a 4 °C y 20 °C conteniendo A: Metilparabeno y B: Propilparabeno. Las curvas no tienen barras de error puesto que se llevó a cabo una única determinación.

En las dispersiones enfriadas a 20 °C, en donde la trimiristina se mantiene como un líquido subenfriado, la cantidad adsorbida de P188 fue de aproximadamente el 60 % mientras que el 40 % restante se mantuvo libre en la fase acuosa. Estos comportamientos ya habían sido descritos para sistemas lipídicos formados por trimiristina y P188, a los que se les indujo una historia térmica similar a la del presente estudio (Göke et al., 2016). En ese caso, también se encontró mayor cantidad de P188

adsorbido sobre las partículas preparadas con 100 % de trimiristina enfriadas a 4 °C comparado con las correspondientes emulsiones enfriadas a 20 °C, es decir, en la trimiristina mantenida como líquido subenfriado. Igualmente, la cantidad de P188 adsorbido dependió del estado físico y del tamaño de las partículas. Las partículas más grandes adsorbieron una cantidad menor de agente estabilizante debido probablemente a una menor área superficial en comparación con las partículas más pequeñas.

En general, se adsorbe mayor cantidad de tensioactivos sobre superficies sólidas (partículas) que sobre superficies líquidas (gotas) (Nik et al., 2012). Lo mismo ocurre en las partículas anisométricas formadas tras la transición de la forma esférica a la forma de placa durante el enfriamiento, en donde el aumento del área superficial de estas últimas conduce a una mayor adsorción del agente estabilizante (Helgason et al., 2009b). En la presente investigación, esta diferencia es apreciable incluso desde la formación del complejo entre el P188 y el tiocianato de cobalto requerido para la determinación de la concentración de estabilizante en la fase acuosa y en la superficie de las partículas. Como se muestra en la Figura 4–40, el poloxamer libre en las dispersiones preparadas con 100 % de trimiristina (SLN) enfriadas a 4 °C, es menor que el encontrado en la respectiva dispersión enfriada a 20 °C, es decir, en la nanoemulsión.

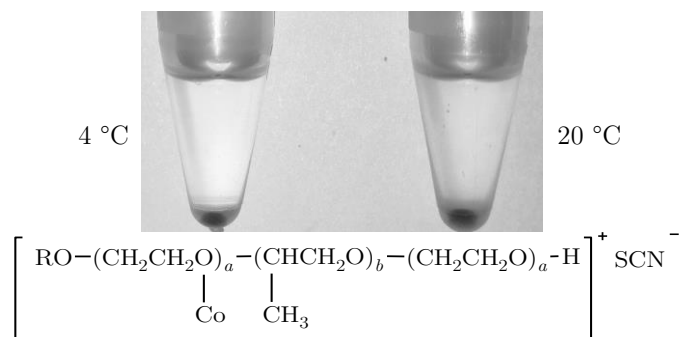


Figura 4–40. Complejo entre el P188 y el tiocianato de cobalto.

P188 libre (fase acuosa) en las dispersiones preparadas con 100 % de MMM enfriadas a 4 °C y 20 °C, respectivamente.

Sin embargo, el análisis detallado de nuestros resultados donde el P188 adsorbido en la superficie aumenta progresivamente a medida que disminuye el contenido de lípido líquido, independientemente del tratamiento térmico a 4 °C o a 20 °C (Anexo C,

Tablas C-5 y C-8), parece explicar el perfil de separación de fases observado en la Figura 4-4. El P188 tiene una densidad de $1.05 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), la densidad de la trimiristina es de $0.862 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Sharma et al., 2004) y la densidad del TCC es de aproximadamente $0.94\text{--}0.95 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Rowe et al., 2009). Así, el aumento de la cantidad adsorbida de P188 provocaría un aumento en la masa de las partículas y, en consecuencia, las partículas se densificarían y decantarían. Por el contrario, las partículas que adsorben menor cantidad de P188 se mantendrían menos densas que el agua y por lo tanto, tenderían a flotar.

Además, la cantidad de P188 adsorbido en las dispersiones conteniendo MP (Figura 4-39A) parece ser ligeramente mayor que en las dispersiones conteniendo PP (Figura 4-39B), lo que sugiere que las propiedades fisicoquímicas de las moléculas atrapadas en las dispersiones podrían ejercer un efecto diferente sobre la estructura de la partícula formada, es decir, una afinidad diferente del P188 con la superficie de las nanopartículas.

En conjunto, los resultados anteriores sugieren que el estado físico de las partículas en dispersión (núcleo líquido en NE o núcleo sólido en SLN y NLC) podría regular la organización molecular y la dinámica del agente estabilizante en la interfase. La relación entre el núcleo lipídico y el tensioactivo está dada por el orden estructural y la movilidad lateral del agente estabilizante en función del estado físico del núcleo lipídico. El orden estructural representa la organización local de las moléculas y la “microviscosidad” en la interfase, así como la organización del núcleo de las nanoestructuras lipídicas. Por su parte, la movilidad lateral representa la dinámica traslacional de las moléculas del agente estabilizante en la interfase de emulsiones (núcleo líquido) y SLN y NLC (núcleo sólido) (Bricarello et al., 2015). Por lo tanto, es posible suponer que la cantidad de agente estabilizante en la superficie, además de asociarse al estado físico de las partículas, se relaciona con diferencias en la afinidad del agente estabilizante y la interfase de los sistemas lipídicos debido a las diferencias de composición.

En este sentido, la cantidad adsorbida y la configuración del P188 en la interfase/superficie, así como el proceso dependiente del tiempo involucrado en el equilibrio en la interfase, son consideraciones importantes. Cuando el tensioactivo se

adsorbe sobre superficies hidrófobas puede formarse una monocapa de alta densidad donde los bloques hidrófilos (PEO) se extienden hacia el agua mientras que los bloques hidrófobos (PPO) se anclan sobre la superficie; no obstante, ambos bloques deben adsorberse en cierta medida, aunque es probable que los segmentos de PPO más hidrófobos sean preferentemente adsorbidos (Alexandridis y Alan Hatton, 1995). Sobre esta base, la adsorción diferencial de P188 sobre interfases líquidas o sólidas sugiere que la adsorción de los bloques hidrofóbicos es diferente en cada caso.

De otro lado, en las interfases líquidas como las de las emulsiones preparadas con 100 % de TCC, podría ocurrir interpenetración parcial de las moléculas de los triglicéridos del núcleo de la gota en los segmentos hidrófobos PPO, de modo similar a lo previamente reportado en emulsiones de triglicéridos estabilizadas con fosfolípidos (Chaban y Khandelia, 2014; Henneré et al., 2009; Schmiele et al., 2016; Tanaka et al., 2003). Para las superficies sólidas puede que la interpenetración de los segmentos hidrófobos PPO no se presente y en cambio, las cadenas poliméricas del agente estabilizante se localizarían sobre la superficie sólida de la partícula formando principalmente trenes (parches hidrófobos). Así es probable, que la interpenetración de los lípidos de la matriz en la capa de P188 reduzca más eficientemente la energía interfacial y de ese modo se requiera menor cantidad de P188 para alcanzar la estabilidad en la dispersión, en consecuencia, dicha interpenetración podría modular algunas propiedades de superficie de las dispersiones lipídicas (Figura 4–41).

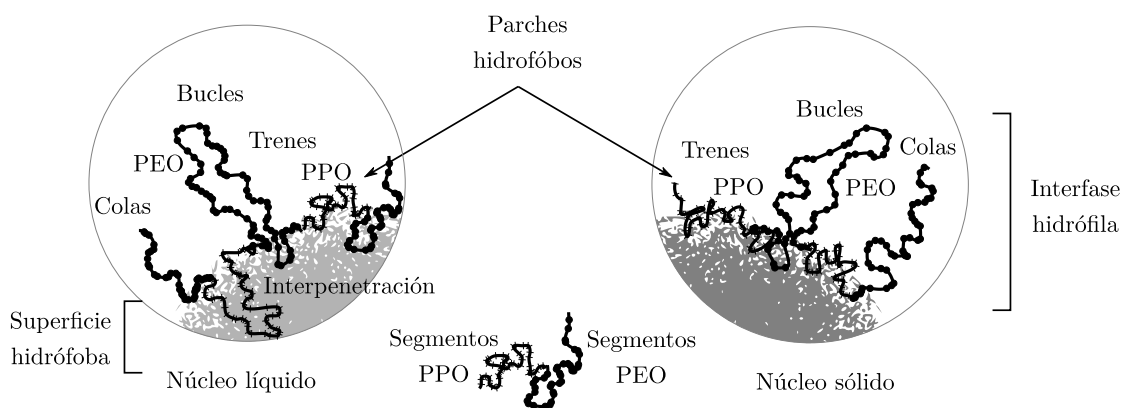


Figura 4–41. Arreglo estructural del P188 sobre superficies líquidas y sólidas.

Respecto a los segmentos hidrófilos del P188, son necesarias algunas consideraciones adicionales para entender la organización molecular y la dinámica del agente

estabilizante en la interfase. El término “estérico” en “estabilización estérica”, implica que algo que ocupa un espacio, o un volumen, puede estabilizar partículas dispersas en un líquido. Aunque esto es cierto, no resulta informativo y confunde el mecanismo por el que las partículas estéricamente estabilizadas mantienen su individualidad y permanecen estables, es decir, se repelen unas a otras cuando están inmersas en un líquido (usualmente agua). En esencia, la “estabilización estérica” consiste en recubrir partículas hidrófobas con un material hidrófilo y que puede ser un polímero no iónico. El mecanismo por el cual dichos polímeros pueden causar repulsión mutua entre las partículas es un poco confuso. Normalmente se acepta que los polímeros no iónicos tales como el P188, teniendo segmentos PEO hidrófilos que forman bucles como los de la Figura 4-41, cuando se unen a las partículas pueden causar repulsión al agitarse “estéricamente” entre sí de manera casi Browniana. Sin embargo, lo que no es normalmente considerado, es que si las moléculas del polímero no se repelen entre sí cuando están inmersas en agua, serían incapaces de estabilizar las partículas cuando están unidas a estas porque estarían ocupadas entrecruzándose unas con otras. Es decir, que todos estos polímeros no iónicos estabilizadores “estéricamente”, como el P188, se repelen entre sí cuando se dispersan en agua. De hecho, este tipo de polímeros pueden disolverse en agua precisamente porque se repelen unos a otros bajo esa condición (van Oss, 2008a).

En el caso de partículas hidrófobas con segmentos unidos de PEO y PPO, la influencia de los parches hidrófobos intersticiales formados por zonas no recubiertas de la superficie de las partículas o por los segmentos de PPO situados en la superficie de las partículas hidrófobas, entre los puntos de unión de los segmentos hidrófilos, es ampliamente superada por las relativamente largas ($\sim 100 \text{ \AA}$) hebras hidrófilas de los segmentos de PEO que se extienden en el agua (Figura 4-41) (van Oss, 2008a).

En consecuencia, la interpenetración de los segmentos de PPO en el interior de las gotas fluidas en las nanoemulsiones investigadas podría reducir la cantidad de parches hidrófobos sobre la superficie de la gota y de ese modo, se requeriría menor cantidad de segmentos PEO para producir la repulsión necesaria para mantener las partículas separadas. En contraste, en las partículas sólidas de los sistemas coloidales tipo SLN, los segmentos de PPO se organizan formando trenes sobre la superficie de la partícula,

aumentando la cantidad de parches hidrófobos. Puesto que la influencia en el mecanismo de estabilización estérica de los parches hidrófobos es despreciable respecto a la repulsión causada por los segmentos PEO, el incremento de P188 unido sobre las SLN podría ser causado por el aumento del área superficial de las partículas tras la transición de la forma esférica en la NE a la forma de placa durante la solidificación tras el enfriamiento. En las dispersiones tipo NLC, el aumento de la proporción de TCC podría conducir a un aumento de la esfericidad de la partícula o a un aumento de la fluidez superficial o a ambos, de tal suerte que la cantidad de P188 requerida para reducir la energía interfacial de las partículas sería cada vez menor.

Por otro lado, la elevada estabilidad de las dispersiones observada a lo largo del tiempo (Figura 4-4) es una consecuencia de la repulsión de los segmentos PEO alrededor de las partículas. Cuando dos partículas, cada una con un radio r y que contienen una capa de polímero adsorbido con un espesor hidrodinámico, δ_h , se aproximan una a la otra a una distancia de separación superficie a superficie, h , menor que $2\delta_h$, las dos capas de polímero interactúan una con la otra de modo que las moléculas del polímero se pueden solapar entre sí o pueden sufrir algún tipo de compresión de las capas de polímero. En ambos casos se produce un aumento en la densidad local de los segmentos hidrófilos del P188 resultando en un aumento de la repulsión en la zona de interacción entre ambas partículas (Tadros, 2009), por lo tanto, a pesar de la separación evidente de fases, la dispersión puede ser completamente redispersable sin afectar significativamente el tamaño de partícula (Figuras 4-1 y 4-2).

4.3.3 Agregación inducida por electrolitos

El ensayo de agregación inducida por electrolitos permite obtener información acerca de la estabilidad estérica de las dispersiones estudiadas. Particularmente, con la adición de electrolitos a la dispersión la doble capa eléctrica es comprimida (Ross y Long, 1969), la fuerza repulsiva se reduce y las partículas se comienzan a juntar como resultado del movimiento Browniano y permanecen unidas debido a fuerzas de atracción de Van der Waals (Verwey y Overbeek, 1955). Tanto la fuerza iónica como la carga de contraiones son importantes en la compresión de la doble capa eléctrica, de modo que si la doble capa eléctrica puede ser reducida a menos de 1 nm ocurre una

rápida floculación de la dispersión (Napper, 1977). La floculación puede evidenciarse incluso en dispersiones estabilizadas estéricamente debido a la deshidratación de la capa de estabilizante (Subramanian y Murthy, 2004) y por lo tanto, este ensayo permite conocer algunos detalles de las interacciones entre la capa de P188 y la composición y el estado físico de las partículas en las dispersiones.

El aumento de la concentración de (Na_2SO_4) en el ensayo de agregación inducida por electrolitos es una de varias formas de inducir la inestabilidad en dispersiones estabilizadas estéricamente, en donde el electrolito reduce la habilidad solvente del medio dispersante (agua) para el agente estabilizante. Puesto que la floculación resulta de la adición de un sólido (Na_2SO_4), el punto en el que la floculación comienza a ser observable se denomina concentración de floculación crítica, *cfc* (Napper, 1977).

La agregación inducida por electrolitos para las dispersiones enfriadas a 4 °C sin la adición de parabenos se presenta en la Figura 4–42. Los resultados obtenidos sugieren que la capa de agente estabilizante presenta un comportamiento diferencial asociado con las características de la matriz lipídica. Como se aprecia en el panel izquierdo de la Figura 4–42 este comportamiento se hace más evidente en las dispersiones con 100 % y 90 % de trimiristina, en donde la floculación de estas dispersiones se presenta a partir de 0.45 M de Na_2SO_4 , mientras que en las dispersiones con proporciones inferiores al 70 % la floculación se hace evidente a partir de 0.60 M de Na_2SO_4 . De las curvas $\text{Abs}_{600 \text{ nm}}$ en función de la concentración de Na_2SO_4 presentadas en el panel derecho de la Figura 4–42, se identifican dos tipos de comportamiento; el primero de ellos agrupa las dispersiones con hasta un 50 % de MMM y el segundo, agrupa las dispersiones con proporciones de MMM menores al 40 %.

Esta tendencia es similar a la observada para las dispersiones respecto a la cantidad adsorbida de P188 según la proporción de TCC en la matriz lipídica (Figura 4–39). Sin embargo, la proporción de TCC a la que la diferencia en las curvas de la gráfica se hace marcadamente visible en el ensayo de floculación es del 50 %, mientras que en el ensayo de la cuantificación de la cantidad adsorbida de P188 la diferencia del comportamiento es evidente al 60 % de TCC. El análisis de las curvas de la Figura 4–42 indica que la pendiente de las dispersiones con hasta 50 % de TCC es ligeramente mayor que la pendiente de las dispersiones con más del 50 % de TCC, es decir, que

se necesita menor cantidad de Na_2SO_4 para inducir la floculación de estas últimas (Figura C-4 en el Anexo C). Teniendo en cuenta que el ensayo de agregación inducida por electrolitos se realizó con dispersiones sin la adición de parabenos, en tanto que la cuantificación del P188 se llevó a cabo con las dispersiones conteniendo parabenos, es posible suponer que la presencia de las moléculas modelo en las dispersiones podría influenciar las características de superficie de las partículas lipídicas, además de la proporción de TCC.

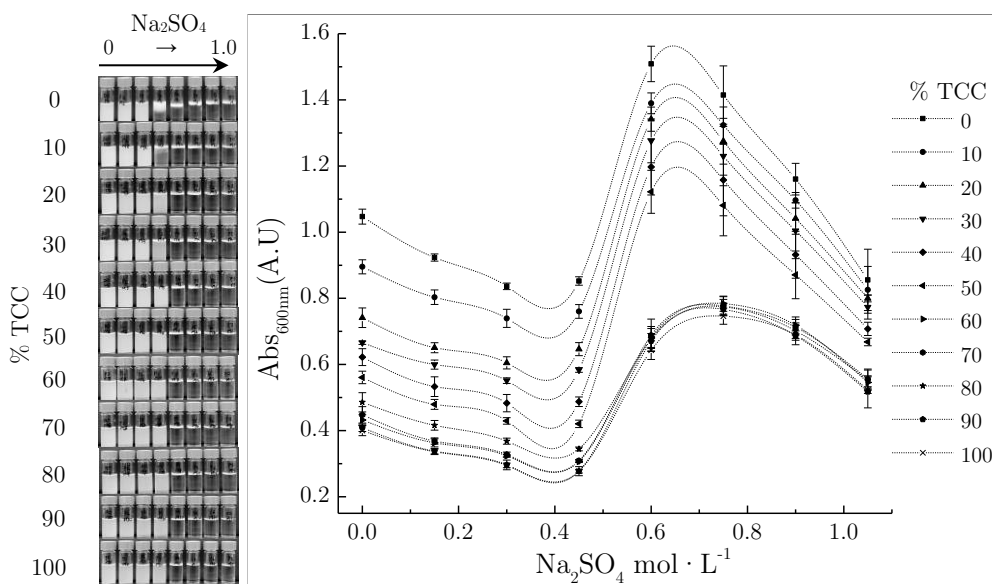


Figura 4-42. Agregación inducida por electrolitos en dispersiones lipídicas enfriadas a 4 °C. En el panel izquierdo de la figura, se muestran las dispersiones 24 h después del inicio del ensayo de floculación (promedio \pm S.D., $n = 3$).

Las barras de error en las curvas de la Figura 4-42 se relacionan directamente con la velocidad a la que se da el proceso de floculación y con la velocidad a la que se lleva a cabo la medida. El proceso de floculación fue más rápido en las dispersiones entre 0 % y 50 % de TCC que en las dispersiones con contenidos del lípido líquido entre el 60 % y el 100 %. Por ello, tomar la medida en estos últimos casos requirió mayor agilidad lo que conlleva una mayor desviación en los datos, especialmente, en aquellos casos donde se ha superado la concentración máxima requerida por el sistema para flocular. Además, a medida que aumenta progresivamente la concentración de Na_2SO_4 , también lo hace la densidad de esta solución. Suponiendo que la densidad ganada por las dispersiones lipídicas tras la adsorción de P188 es menor que la densidad de las

soluciones de Na_2SO_4 , los flóculos formados deben flotar tal como se observa en la Figura 4-42.

Estos resultados contrastan con aquellos reportados previamente en la literatura. Por ejemplo, en SLN preparadas con Poloxamer 407 (P407) al 1.5 % p/v, la floculación de las dispersiones se presentó a una concentración de aproximadamente $0.6 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-3}$ (Vivek et al., 2007). Aunque el P407 es un copolímero en bloque similar al P188 tiene un peso molecular promedio mayor (12600 Da y 8400 Da para el P407 y P188, respectivamente) (Alexandridis et al., 1994; Alexandridis y Alan Hatton, 1995; Kabanov et al., 2002; Oh et al., 2004). Es decir, el peso molecular promedio del polímero estabilizante podría tener una influencia directa sobre las propiedades de superficie. La cantidad adsorbida del polímero estabilizador, así como el espesor hidrodinámico, δ_h , aumentan a medida que aumenta el peso molecular del polímero (Tadros, 2009) y probablemente, esa sea la razón por la que, las dispersiones estabilizadas con P407 requieren una mayor cantidad de Na_2SO_4 para ser floculadas.

De otro lado, es importante destacar que las sales tienen un fuerte efecto sobre el punto de nube de los copolímeros de bloque. Para el caso del P188 el punto de nube se reduce de $> 100 \text{ }^\circ\text{C}$ a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ cuando se adiciona $\text{KF } 1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-3}$ a una solución acuosa de este polímero (Alexandridis y Alan Hatton, 1995). Por lo tanto, la separación de fases observada tras la adición de cierta cantidad de Na_2SO_4 a las dispersiones de partículas lipídicas podría tener este mismo efecto. Las altas concentraciones de sal no solo disminuyen la repulsión electrostática entre las partículas dispersas, sino que también reducen su hidrofiliidad al incrementar el valor de tensión superficial de los segmentos PEO del P188 mediante el incremento de la energía de cohesión del agua, y por lo tanto, ésta se hace más hidrofobizante con la capa de P188 que recubre las partículas (van Oss, 2008b).

Una solución de Na_2SO_4 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-3}$ puede incrementar la tensión superficial del agua alrededor del 4 % y por lo tanto, cerca de su punto de saturación, el Na_2SO_4 podría causar incrementos de la tensión interfacial de casi el 9 %. Esto se traduce en un aumento en la energía libre de cohesión del agua cercano a ese mismo valor y como consecuencia, la capacidad hidrofobizante del agua es mayor (van Oss, 2008c) provocando la deshidratación de los segmentos hidrófilos PEO del P188 lo que

ocasiona la inestabilización y posterior floculación de las partículas. En las dispersiones con 100 % de trimiristina, los segmentos hidrófobos del P188 están expuestos formando trenes sobre la superficie de la partícula y dado que estos segmentos son menos solubles en agua que los segmentos PEO, se necesitará menor cantidad de Na_2SO_4 para deshidratar la capa de polímero.

Por otro lado, en dispersiones con 100 % de TCC, los segmentos PPO del P188 podrían penetrar el núcleo de la gota y por lo tanto, los segmentos hidrófilos tendrán menor movilidad lateral incrementando de la rigidez de la capa de PEO sobre las partículas como consecuencia, el carácter hidrófilo de la superficie es mayor (Tanaka et al., 2003) haciendo que se requiera aumentar el efecto hidrofobizante del agua, es decir, aumentar la concentración de Na_2SO_4 para deshidratar los segmentos hidrófilos PEO de la capa de P188 sobre la gota. En otras palabras, debido a que los grupos PEO son más solubles en agua, el efecto de competencia entre los segmentos hidrófilos y el Na_2SO_4 por las moléculas de agua es menor cuando los segmentos hidrófobos están menos expuestos, es decir, que el estado físico de las partículas puede modular el grado de hidratación de los segmentos PEO en la región interfacial.

4.3.4 Hidrofobicidad de superficie

La hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas lipídicas fue estimada mediante el cálculo de la constante de unión, K_b , entre colorante rosa de Bengala (RB) o azul de Nilo (NB) y las partículas obtenidas a partir de las dispersiones enfriadas a 4 °C. El rosa de Bengala es un colorante hidrófobo que exhibe diferentes grados de afinidad por las nanopartículas dependiendo de la hidrofobicidad de su superficie (Gregoriadis et al., 1986). De otro lado, el azul de Nilo es un colorante de naturaleza más hidrófila en comparación con el rosa de Bengala y puede usarse para evaluar la hidrofiliidad de las nanopartículas siguiendo los mismos procedimientos y cálculos empleados para el rosa de Bengala. Además, el uso de ambos colorantes en el ensayo de hidrofobicidad puede ayudar a reducir errores de interpretación ocasionados por las interacciones electrostáticas generadas entre la carga negativa de las partículas con la carga negativa del rosa de Bengala y positiva del azul de Nilo, lo que provoca

repulsión y atracción, respectivamente, por cada uno de éstos colorantes (Xiao y Wiesner, 2012).

La constante de unión K_b puede ser calculada a través de la relación de Scatchard, graficando la cantidad de colorante unido a las nanopartículas respecto a la cantidad de colorante libre (Scatchard, 1949), de acuerdo con la Ecuación 4-10:

$$\frac{\text{Colorante}_{unido}}{\text{masa NP}} = -K_b \text{Colorante}_{libre} + K_b n \quad (4-10)$$

donde n es la cantidad máxima de rosa de Bengala o azul de Nilo unido a las partículas. El gráfico de Scatchard (Anexo C, Figuras C-7 y C-10) indica que cuanto más grande es el valor de la pendiente, K_b , hay una mayor cantidad de colorante unido a las partículas (Gregoriadis et al., 1986). Las constantes de unión K_b de la Figura 4-43 corresponden a la pendiente de la parte lineal del gráfico de Scatchard, es decir, entre 0.25 mg y 1.0 mg de nanopartículas para el rosa de Bengala y entre 0.75 mg y 1.50 mg para el azul de Nilo. Como puede observarse, a medida aumenta la proporción de TCC en las dispersiones también lo hace la cantidad de colorante que se une a las partículas.

Las curvas de la Figura 4-43 pueden dividirse en dos zonas de manera semejante al comportamiento observado para la adsorción de P188 y para la floculación inducida por sales, tal como se discutió previamente. En particular, la unión del rosa de Bengala aumenta progresivamente hasta proporciones superiores al 50 % de TCC (zona I) y a partir de ese punto parece mantenerse constante, zona II de la Figura 4-43A. Por el contrario, la unión del azul de Nilo se mantiene relativamente constante hasta proporciones menores al 50 % de TCC y aumenta progresivamente a proporciones mayores, zona II de Figura 4-43B.

La cantidad de colorante unido a las SLN (100 % de trimiristina) fue marcadamente diferente de aquella unida a las NE (100 % de TCC), lo que sugiere que el estado físico de la matriz lipídica, las diferencias en la hidrofobicidad de las partículas o ambas influyen la cantidad de colorante que se puede unir a las partículas. Dado que la cantidad de los colorantes se mantuvo constante durante el ensayo.

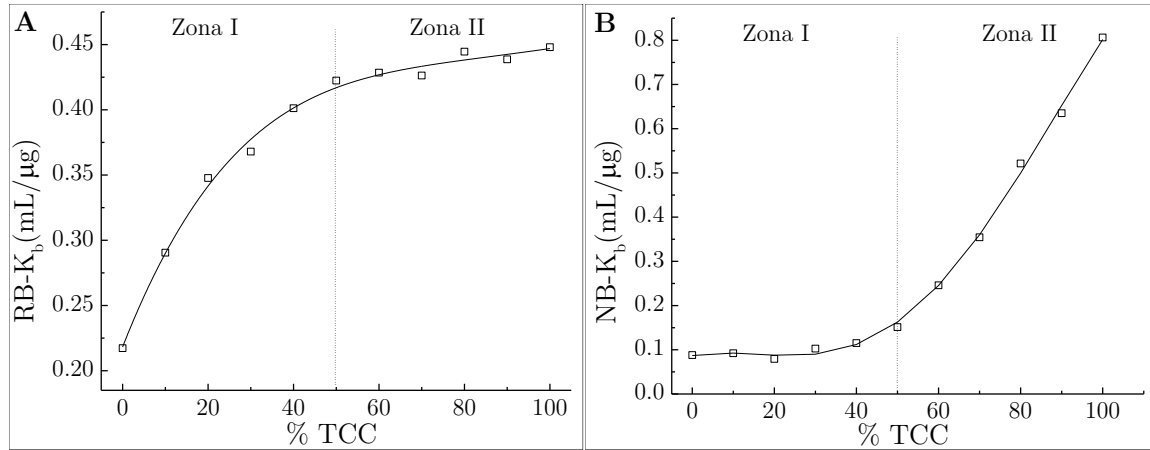


Figura 4-43. Comportamiento de la constante de unión del rosa de Bengala (A) y del azul de Nilo (B) sobre la superficie de las partículas lipídicas obtenidas a 4 °C en función de la proporción de TCC.

La energía interfacial libre de interacción entre dos superficies inmersas en agua, ΔG_{iwi}^{IF} , representa la definición termodinámica de la hidrofobicidad/hidrofilicidad de los materiales en fase condensada:

$$\Delta G_{iwi}^{IF} = \Delta G_{iwi}^{LW} + \Delta G_{iwi}^{AB} \quad (4-11)$$

en donde el primer término de la Ecuación 4-11, denota el componente apolar (LW) de la interacción entre las superficies de las partículas, i , inmersas en agua, w , y siempre es atractivo, es decir, el valor de ΔG_{iwi}^{LW} , es negativo o cero. Por su parte, el término ΔG_{iwi}^{AB} representa el componente polar. La Ecuación 4-11 puede ser reescrita como sigue (van Oss, 2008b):

$$\Delta G_{iwi}^{IF} = -2 \left(\sqrt{\gamma_w^{LW}} - \sqrt{\gamma_i^{LW}} \right)^2 - 4 \sqrt{(\gamma_i^+ \gamma_i^-)} - 4 \sqrt{(\gamma_w^+ \gamma_w^-)} + 4 \sqrt{(\gamma_i^+ \gamma_w^-)} + 4 \sqrt{(\gamma_i^- \gamma_w^+)} \quad (4-12)$$

1
2
3
4
5

En donde γ^{LW} y $\gamma^{+/-}$ en la Ecuación 4-12 representan las interacciones de Lifshitz-Van der Waals y las interacciones ácido base de Lewis (AB), respectivamente. El primer parámetro considera la energía de interacción sobre una escala macroscópica de las partículas en contacto con agua en las que las interacciones de Van der Waals decaen en función del inverso de la distancia (d) interpartícula. El segundo parámetro considera las interacciones repulsivas y las interacciones atractivas en donde γ^+

representa el parámetro aceptor de electrones y γ^- representa el parámetro donador de electrones (van Oss, 2008d).

Los términos 2 y 3 de la Ecuación 4-12 son atractivos e indican respectivamente, la energía libre polar de cohesión del material (es decir, los lípidos de la matriz o los segmentos PEO y PPO en las partículas) y la energía libre de cohesión del agua cuyo valor siempre es negativo (atractivo). El término 2 puede ser negativo o cero dependiendo de las características del material. Finalmente, los términos 4 y 5 indican la adhesión polar del material i con el agua, en otras palabras, son dos términos de hidratación. Los materiales muy hidrófobos tienden hacia valores bajos o cero de γ_i^- mientras que los materiales muy hidrófilos tienen valores muy elevados de γ_i^- . Los valores de γ_i^+ usualmente son cero o muy pequeños independientemente de si se trata de materiales hidrófobos o hidrófilos (van Oss, 2008b).

Por lo tanto, valores negativos de ΔG_{iwi}^{IF} indican que el material es hidrófobo, es decir, las partículas se atraen unas a otras cuando están inmersas en agua con precisamente la energía libre del valor negativo de ΔG_{iwi}^{IF} . Un valor positivo de ΔG_{iwi}^{IF} indica que el material o las partículas son hidrófilas, esto es porque cuando ΔG_{iwi}^{IF} es positivo, las partículas se repelen unas a otras y el valor positivo indica la cantidad de energía libre de repulsión entre dos moléculas o partículas cuando están sumergidas en agua (van Oss, 2008b). De esta forma ΔG_{iwi}^{IF} se puede correlacionar con el grado de estabilidad de las partículas suspendidas.

Lo anterior significa que la atracción hidrofóbica entre las partículas es causada por la energía libre de cohesión entre las moléculas de agua. Esta interacción está siempre presente independientemente de la hidrofobicidad o hidrofiliidad de las partículas inmersas. Sin embargo, la atracción hidrofóbica de los lípidos de la matriz puede ser superada mediante la adición de un polímero con segmentos hidrófilos como los PEO en el P188, de modo que tales segmentos se hidraten tan fuertemente que causen una repulsión hidrofílica neta (a veces llamada “presión de hidratación”) en donde las energías repulsivas se hacen más fuertes que las energías atractivas (van Oss, 2008d).

Como la interacción de los segmentos PEO y PPO en las dispersiones depende de la proporción de TCC en la matriz lipídica, es posible suponer que la presencia de parches

hidrófobos sobre las superficies sólidas y la interpenetración de los segmentos PPO en las matrices líquidas, influyen el grado de hidratación de los segmentos PEO en la interfase de las partículas de tal modo que las energías repulsivas presentes en las partículas aumenten con el grado de hidratación de la interfase. Consecuentemente, la hidrofobicidad será mayor en los sistemas lipídicos tipo SLN que en los sistemas lipídicos tipo NE.

No obstante, a medida que aumentan la densidad de empaquetamiento de las moléculas de P188 sobre la superficie de las partículas y el espesor de la capa de adsorción resultante, h , la hidrofobicidad de la superficie de la película adsorbida de P188 disminuye debido al aumento en la proporción de segmentos PEO (Carstensen et al., 1991; Müller et al., 1997). Por lo tanto, para explicar los resultados del ensayo de hidrofobicidad usando rosa de Bengala es necesario considerar tanto la adsorción del colorante sobre la superficie de las partículas como la absorción del colorante en el interior de la matriz lipídica. Es decir, que el rosa de Bengala podría ser adsorbido en la superficie de las partículas lipídicas o entre la interfase de la partícula y el P188 en las SLN (zona I) o ser absorbido en el interior de las NE (zona II).

El comportamiento de la constante de unión del azul de Nilo indica que en la zona I el colorante prácticamente no es adsorbido por las partículas mientras que el aumento progresivo de la constante de unión en la zona II de la Figura 4-43B evidencia que este colorante también se absorbe en el interior de las NE. No obstante, aunque las constantes de unión para el azul de Nilo son comparativamente mayores que las del rosa de Bengala, tal como se observa en los gráficos de Scatchard (Anexo C, Figuras C-7 y C-10), la cantidad de azul de Nilo que se une a las nanopartículas es mucho menor, lo que confirma la naturaleza hidrófoba de las nanopartículas lipídicas.

De otro lado, debido al aumento progresivo del RB unido a los NLC a medida que aumenta la proporción de TCC, es posible asumir que la superficie de la partícula se va haciendo cada vez más fluida y, en consecuencia, facilita la absorción del colorante. La fluidez de las partículas lipídicas a medida que incrementa la proporción de TCC ya ha sido corroborada a través del estudio del comportamiento dinámico de los lípidos de la matriz respecto a la fluidez de las partículas en SLN y NLC empleando los ácidos 5-doxil esteárico (5-DSA) y 16-doxil esteárico (16-DSA) como sondas espín

etiquetadas de ácidos grasos. Para ello, las sondas fueron incubadas con dispersiones de SLN y NCL y posteriormente analizadas mediante EPR. Los resultados muestran que la fluidez superficial de las partículas en las SLN es menor que en los NLC debido probablemente a la adición de los triglicéridos de cadena media que podrían acomodarse principalmente en la superficie. Además, la sonda 16-DSA se inserta a mayor profundidad en la partícula que la sonda 5-DSA, es decir, aparentemente existe una relación entre la fluidez de la partícula y la hidrofobicidad de las moléculas que se unen a ellas (Andrade et al., 2014; Tosta et al., 2014).

De hecho, en estudios previos con SLN preparadas con diferentes lípidos, se evidencia que a medida que aumenta la hidrofobicidad de las partículas también aumenta la eficiencia de atrapamiento siguiendo el orden gliceril triestearato (rango de fusión: 72–75 °C) > gliceril diestearato (rango de fusión: 72–74 °C) > gliceril monoestearato (rango de fusión: 78–81 °C). Curiosamente, la velocidad de liberación del fármaco atrapado (olanzapina) en estas nanopartículas sigue precisamente el orden contrario (Vivek et al., 2007). Por otro lado, además de la relación inversa entre la velocidad de liberación de las nanopartículas con la eficiencia de atrapamiento y la hidrofobicidad de superficie, también parece haber una relación con el grado de sustitución del triglicérido, es decir con la naturaleza de la matriz lipídica más que con la capa de agente estabilizante (Doktorovova et al., 2012).

4.4 Comportamiento de las nanopartículas como sistemas de entrega de moléculas modelo

El comportamiento de liberación de las nanopartículas es uno de los tópicos más relevantes en la investigación y desarrollo de sistemas farmacéuticos de entrega de activos dado que proporciona datos básicos para la optimización de la forma de entrega especialmente en lo relacionado con el riesgo de eventos no deseados tales como la descarga de dosis o la terminación prematura de la liberación (Güres et al., 2012). En este sentido, es importante tener en cuenta que una vez administrada la forma de dosificación conteniendo sistemas nanoparticulados, generalmente no se puede ejercer influencia directa sobre el destino ésta. Sobre esta base, el estudio del comportamiento de liberación *in vitro* de activos incorporados en dispersiones de

nanopartículas lipídicas como las investigadas en esta tesis es una herramienta utilizada para su caracterización debido a que permitiría, entre otros, predecir su desempeño *in vivo* (Burgess et al., 2002).

En términos generales, se presume que existe alguna relación entre la estructura de la partícula y el mecanismo de liberación de las moléculas activas que transporta. Sin embargo, para el caso de las partículas lipídicas, los estudios dirigidos a entender la estructura interna de las partículas son escasos y los trabajos orientados específicamente a entender el comportamiento de la liberación *in vitro* de los componentes activos lo son aún más. En consecuencia, es necesario aportar información dirigida a entender la relación existente entre las características estructurales de las nanopartículas y su comportamiento de liberación. En particular, es esencial una comprensión adecuada de la influencia de la capa del agente estabilizante, la estructura interna de la nanopartícula y las propiedades del fármaco en el comportamiento de liberación. Además, resulta de gran utilidad adelantar análisis comparativos entre las SLN, los NLC y las nanoemulsiones de modo que se identifiquen las ventajas y desventajas de cada uno de estos sistemas y su uso como potenciales transportadores de interés terapéutico.

Como ha sido reportado por diferentes equipos de investigación, los factores que determinan la liberación de moléculas activas desde sistemas coloidales basados en lípidos incluyen el método seleccionado y las condiciones operacionales para el estudio de liberación (medio de liberación, temperatura, agitación, etc.), la cantidad, naturaleza y localización del fármaco incorporado en las partículas, el tamaño y la forma de las partículas, el tipo de nanotransportador lipídico, la naturaleza de los lípidos empleados, el arreglo cristalino del fármaco y de los lípidos de la matriz, los agentes estabilizantes y el método de producción de las nanopartículas (Berchane et al., 2006; Berton-Carabin et al., 2013; Deshpande et al., 2017; Müller et al., 2000; zur Mühlen et al., 1998). Estos factores controlan en gran medida el proceso de liberación del fármaco, el que es complejo y podría ser influenciado por factores adicionales como las diferencias intrínsecas en la cinética de disolución del fármaco, en el coeficiente de partición o en la capacidad de carga y la eficiencia de incorporación de las moléculas activas en las nanopartículas (Shah et al., 2016). Por lo tanto, como

un aporte al estado del arte en este tema, esta parte del trabajo tiene como objetivo investigar el comportamiento de liberación del metilparabeno y el propilparabeno desde SLN, NLC y NE preparadas por la técnica de emulsificación-difusión, como una estrategia para entender la estructura de la partícula y la localización preferente de las moléculas modelo seleccionadas.

4.4.1 Capacidad de carga y eficiencia de incorporación

La capacidad de carga y la eficiencia de incorporación son parámetros importantes para investigar la idoneidad de un sistema de entrega de fármacos, en particular en el caso de fármacos costosos o muy tóxicos (Zhang y Feng, 2006), para los que se requiere una eficiente incorporación dentro de las partículas que facilite su dosificación y evite pérdidas considerables del activo durante el proceso de producción o reprocesamientos para recuperar el fármaco no incorporado.

La capacidad de carga (Drug Loading, *DL*) expresa la cantidad de activo incorporado en las partículas referido a la cantidad de partículas obtenidas, mientras que la eficiencia de incorporación (Encapsulation Efficiency, *EE*) es la cantidad de activo incorporado en las partículas respecto a la cantidad total presente en la dispersión. En esta investigación, la capacidad de carga se calculó a partir del cociente entre la cantidad total de fármaco incorporado y la masa total de nanopartículas y la eficiencia de encapsulación se estimó a partir de la diferencia entre la cantidad total de fármaco incorporado y la cantidad de fármaco libre no atrapado dividida entre el total del fármaco adicionado. La capacidad de carga y la eficiencia de encapsulación se calculan de acuerdo con las Ecuaciones 4-13 y 4-14.

$$DL = \frac{(W_t - W_s)}{(W_t - W_s + W_l)} \times 100 \quad (4-13)$$

$$EE = \frac{(W_t - W_s)}{W_t} \times 100 \quad (3-14)$$

Donde W_t es la cantidad total de activo presente en la dispersión de partículas, W_s es la cantidad de activo en el sobrenadante y W_l el peso de la mezcla de lípidos usada para preparar las dispersiones (como un valor aproximado sin considerar las pérdidas asociadas al método de obtención de las partículas).

En esencia, la capacidad de carga de un fármaco está determinada por la estructura y las propiedades físicas y químicas de las nanopartículas mientras que la eficiencia de incorporación depende del mecanismo de incorporación del fármaco en la matriz lipídica y de las condiciones experimentales, incluyendo la cantidad de fármaco adicionada durante el proceso de producción. Por lo general, es más difícil obtener un alto contenido de carga que una elevada eficiencia de incorporación (Shen et al., 2017). Además, debe tenerse presente que la capacidad de carga y la eficiencia de incorporación no estén influenciados por la formación de estructuras micelares o por interacciones no deseadas con el agente estabilizante. En este sentido, los resultados de los ensayos de compatibilidad entre los parabenos y el P188 (Anexo D) indican que no hay formación de estructuras micelares ni de interacciones indeseadas que puedan afectar negativamente el comportamiento de liberación.

Una forma rápida de evidenciar las diferencias en la capacidad de carga entre nanoemulsiones y nanosuspensiones de metil y propilparabeno es mediante una prueba colorimétrica a partir de la reacción de los grupos fenol en estas moléculas con FeCl_3 acuoso (de color amarillo intenso), para formar complejos de fenolato férrico de color violeta que permite identificar la presencia de estas sustancias en fase acuosa (Figura 4-44). Esto permite visualizar el grado de incorporación de los parabenos en la matriz lipídica o el grado de exposición a la fase acuosa del medio dispersante de las moléculas de parabenos no incorporadas.

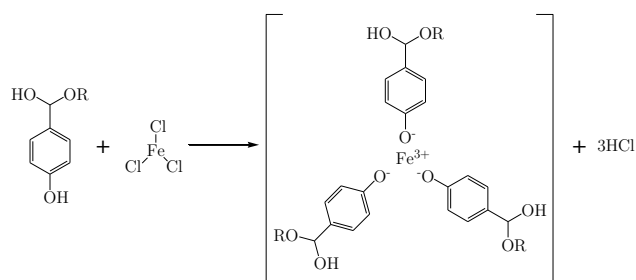


Figura 4-44. Reacción del FeCl_3 con los parabenos.

Como se observa en la Figura 4-45, el complejo de fenolato de hierro presenta una coloración violeta que no es identificable en las dispersiones sin parabenos (SLN-B y NE-B). En adición, la coloración es evidente en las dispersiones de partícula conteniendo metilparabeno (SLN-MP NE-MP) y apenas perceptible en las nanosuspensiones a base de propilparabeno (SLN-PP). Así, el grado de exposición de

los parabenos en las dispersiones lipídicas sigue el orden: SLN-MP>NE-MP>SLN-PP>NE-PP.



Figura 4–45. Identificación colorimétrica del MP y del PP en la fase acuosa.

La implementación de ensayos colorimétricos rápidos es de gran utilidad para fines comparativos durante la optimización de los parámetros más importantes en la preparación de dispersiones lipídicas, antes de llevar a cabo la cuantificación del fármaco mediante ensayos más sofisticados y costosos. Por ejemplo, podrían ser empleados para escoger los lípidos de la matriz y la proporción entre estos que permiten obtener los porcentajes de incorporación más altos o para encontrar las mejores condiciones de preparación.

En la Figura 4–46 se muestran los comportamientos de eficiencia de incorporación y de capacidad de carga de las dispersiones lipídicas. La eficiencia de incorporación de las dispersiones varía entre el 40 % y el 60 % para el metilparabeno y es superior al 80 % para el propilparabeno. En general, la mayoría de los estudios reportan eficiencias de incorporación de los activos en nanopartículas lipídicas superiores al 70 %, contrario a lo que ocurre con la capacidad de carga que no es informada en la mayoría de los casos (Gordillo-Galeano y Mora-Huertas, 2018). Sin embargo, aunque es necesario el desarrollo de nanopartículas lipídicas con elevada eficiencia de incorporación, que es dependiente del proceso de obtención de las partículas, la capacidad de carga podría resultar un parámetro más importante dado que está estrechamente relacionado con la misma eficiencia de incorporación, la farmacocinética del activo, sus efectos secundarios y su efecto terapéutico *in vivo* (Shen et al., 2017). Sobre esta base, la discusión a continuación se centrará sobre este parámetro.

Llama la atención que según lo reportado por Cerreto et al., (2013) en SLN y NLC preparadas a partir de Precirol® ATO 5 (85 % p/p) y aceite de almendras (15 % p/p) y estabilizadas con P188 (3.1 % p/p) y colato de sodio (1.2% p/p), la eficiencia de

incorporación del MP y PP fue mayor en SLN ($76.2 \% \pm 0.1 \%$ y $82.3 \% \pm 12.6 \%$, respectivamente) que en NLC ($61.4 \% \pm 6.4$ y $70.4 \% \pm 10.0 \%$, respectivamente), mientras que la eficiencia de incorporación para el butilparabeno fue de $93.7 \% \pm 2.7 \%$ en SLN y de $97.0 \% \pm 3.5 \%$ en NLC.

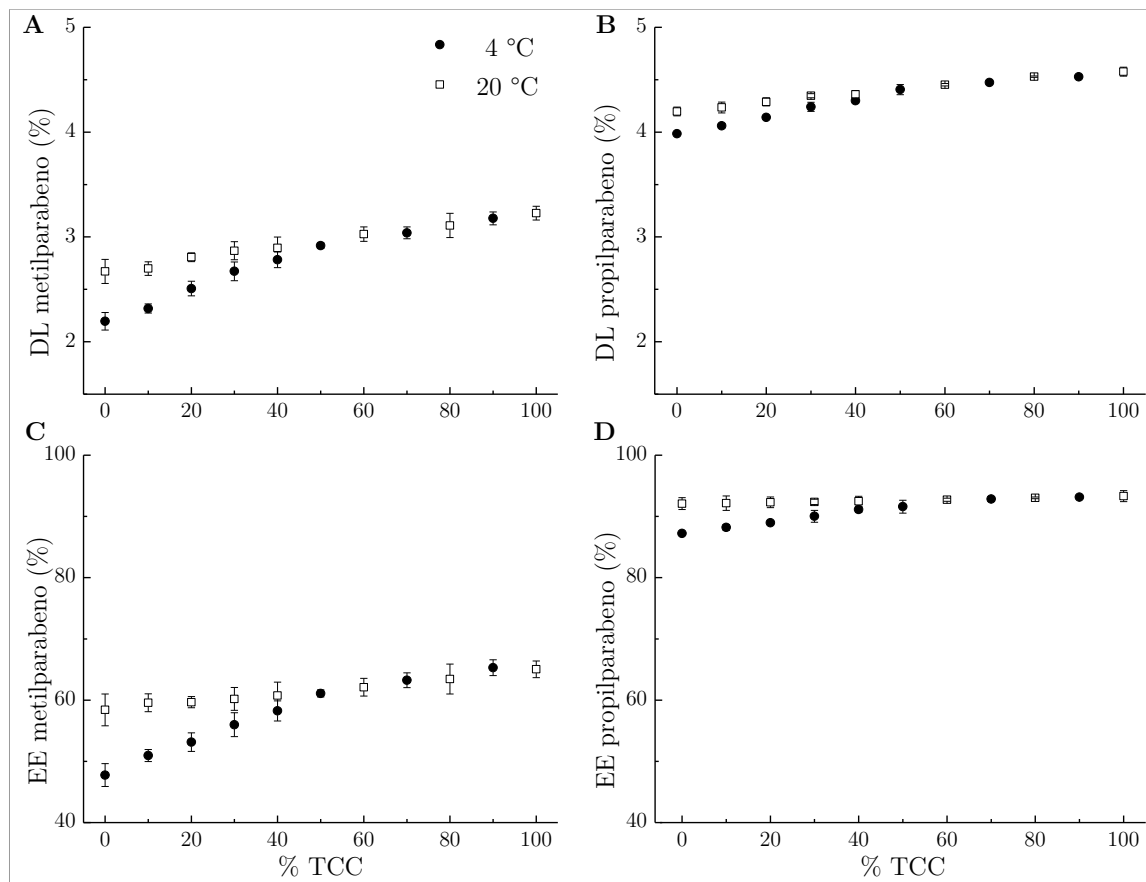


Figura 4–46. Capacidad de carga y eficiencia de incorporación de MP y PP en las dispersiones de nanopartículas lipídicas.

Las capacidades de carga para el MP y el PP se muestran en los paneles A y B, respectivamente, mientras que en C y D se presentan las eficiencias de incorporación. La cantidad de parabenos adicionada a las dispersiones es equivalente al 5 % p/p. Los valores representan el promedio \pm S.D., $n = 3$.

Esto es contrario a los resultados derivados de la Figura 4–46 donde independientemente del parabeno, la eficiencia de incorporación es mayor cuando se preparan NLC. Al respecto, es importante mencionar que la cantidad de parabenos adicionada a las nanopartículas por Cerreto et al., (2003) fue de 0.6 % p/p, claramente una cantidad muy inferior a la adicionada en las nanopartículas del presente estudio (5 % p/p). En consecuencia, la cantidad de los parabenos adicionada durante el

proceso probablemente afecta la eficiencia de incorporación. En cualquier caso, es importante señalar que la eficiencia de incorporación aumenta con la hidrofobicidad de los parabenos.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente investigación, la capacidad de carga de las dispersiones lipídicas es superior al 2 %. Sin embargo, hay claras diferencias entre las dispersiones enfriadas a 20 °C respecto a aquellas enfriadas a 4 °C. En general, las nanosuspensiones tienen una menor capacidad de carga que las nanoemulsiones y en éstas últimas aumenta con la proporción de TCC. Es decir, las NE formadas a partir de 100 % de TCC tienen mayor capacidad de carga que las NE formadas por 100 % de trimiristina subenfriada.

Estos resultados sugieren que la capacidad de carga de las nanoemulsiones depende de las características de la fase lipídica fluida que forma la nanogota. Hallazgos similares han sido previamente reportados para nanoemulsiones de trimiristina y TCC estabilizadas con P188, en las que el fenofibrato usado como molécula modelo alcanzó cerca de un 34 % más de capacidad de carga en las nanoemulsiones preparadas solo con TCC respecto a las nanoemulsiones de trimiristina subenfriada (Göke y Bunjes, 2018). No obstante, es importante tener en cuenta que la solubilidad del fenofibrato en agua es $< 2.9 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ a 37 °C (Granero et al., 2005) y que el método de carga pasiva (incubación) empleado para incorporar el fármaco en las nanoemulsiones es diferente al empleado en nuestra investigación, lo que puede determinar la capacidad de carga.

Para el caso del metilparabeno la capacidad de carga en las nanoemulsiones de TCC es aproximadamente 17 % más alta que en las nanoemulsiones de trimiristina, mientras que para el propilparabeno la diferencia es de cercana al 8 %, lo que podría indicar que las moléculas con menor solubilidad en agua se incorporan con mayor facilidad en ambas nanoemulsiones. Teniendo en cuenta el mayor empaquetamiento de las cadenas alifáticas cortas de los TCC (Hsu y Violi, 2009), es válido suponer que la capacidad de incorporar moléculas foráneas en su estructura líquida es menor en comparación con una emulsión formada por triglicéridos de cadena larga como los de la trimiristina. Adicionalmente, las emulsiones de trimiristina son un poco más hidrófobas que las emulsiones de TCC, lo que se deduce del ligero incremento en la

cantidad de P188 sobre la superficie de las nanoemulsiones preparadas con 100 % de trimiristina (Anexo C, Tablas C-6 y C-9). En consecuencia, se podría esperar que las emulsiones de trimiristina tuviesen mayor capacidad de carga para ambos activos en comparación con las nanoemulsiones de TCC.

Sin embargo, en nanoemulsiones de trioleína (C18) y tricaprilina (C8) estabilizadas con fosfatidilcolina de huevo, se encontró que la interpenetración parcial de las cadenas alifáticas más cortas es menor que la interpenetración de las cadenas alifáticas más largas de modo que los grupos hidrófilos de la fosfatidilcolina están más expuestos a la interfase acuosa y por lo tanto más hidratados. Además, la interpenetración parcial de las cadenas alquílicas de núcleo lipídico en el interior hidrófobo de la capa de fosfatidilcolina produce un aumento en la rigidez de esta región (Tanaka et al., 2003). Asumiendo que las nanoemulsiones de TCC y MMM estabilizadas con P188 tienen un comportamiento similar, podría ocurrir que debido a la interpenetración de las cadenas alquílicas de la trimiristina en la capa hidrófoba de P188, el “espacio” disponible en el núcleo de las nanoemulsiones de trimiristina para acomodar moléculas foráneas sea ligeramente menor que en el caso de las nanoemulsiones de TCC. De modo similar, asumiendo que las moléculas de los parabenos tienden a “acomodarse” en la capa hidrófoba de P188, un aumento en la rigidez y en el grado de hidratación de esta capa impediría dicha acomodación. Además, debido a que las nanoemulsiones de trimiristina son más hidrófobas que las de TCC, requieren una mayor cantidad de P188 para reducir la tensión interfacial lo que al parecer aumenta la interpenetración de las cadenas alquílicas (Bacle et al., 2017). En consecuencia, la capacidad de carga de las nanoemulsiones de trimiristina se reduce en comparación con las nanoemulsiones de TCC y aumenta con la proporción del aceite en la nanogota (Figura 4-46).

Respecto a las nanosuspensiones de trimiristina, la baja capacidad de carga podría ser el resultado de la expulsión de los parabenos hacia la superficie de la partícula durante la cristalización de la trimiristina. En este caso, la localización del activo en la superficie de las SLN puede ser explicada a partir de una serie de pasos que suceden a medida que avanza el proceso de formación de las partículas: (I) el activo se disuelve en la fase lipídica fundida hasta su concentración de saturación, C_s ; (II) durante el

enfriamiento la trimiristina cristaliza desde la fase α a la fase β produciendo una estructura laminar plana con superficies estructuradas por pliegues, bordes y escalones (Bunjés et al., 2007, 2000; Sjöström et al., 1995; Westesen y Siekmann, 1997) y las moléculas de parabenos se concentran en la fase lipídica líquida; (III) las moléculas de parabenos se acumulan sobre la superficie del cristal de trimiristina en un estado solubilizado en la interfase entre la partícula y la capa de P188.

Durante el enfriamiento, la solubilidad de los parabenos en la fase dispersante disminuye provocando que el exceso disuelto precipite en el seno de la dispersión o se acumule sobre la superficie de la partícula (Noack et al., 2012; Salminen et al., 2016, 2014). Sin embargo, en esta investigación no se evidencia la precipitación de los parabenos en el seno de la solución debido a que la cantidad adicionada de metilparabeno en las dispersiones esta justo en el límite de su concentración de saturación en agua a temperatura ambiente y a que las interacciones lipófilas del propilparabeno con las nanopartículas parecen ser suficientemente altas como para asegurar una incorporación cercana al 4 % en las nanopartículas. Para verificar la solubilidad de los parabenos, se preparó una dispersión de ambos parabenos en P188 al 2.5 % p/v siguiendo exactamente la misma metodología empleada para preparar las dispersiones de nanopartículas, pero sin la presencia de lípidos. Como se observa en la Figura 4-47 el metilparabeno se disuelve totalmente en la solución de P188 al 2.5 % p/v mientras que el propilparabeno precipita en forma de cristales planos con un característico brillo nacarado. Asimismo, como se discutirá más adelante la ausencia de cristales de parabenos en el seno de la dispersión se verifica en los termogramas obtenidos mediante HP-DSC (Figura 4-51).



Figura 4-47. MP y PP en P188 2.5 % p/v.

Finalmente, en las suspensiones formadas por mezclas binarias de TCC y trimiristina, es decir en los diferentes NLC, la capacidad de carga aumenta proporcionalmente con la cantidad de TCC en la matriz, lo que indica que la adición de un lípido líquido incrementa la capacidad de carga del activo incorporado en comparación con las SLN. Por consiguiente, durante la cristalización de la trimiristina en las mezclas binarias, tanto el TCC como las moléculas de parabeno disueltas en este, son expulsados hacia el exterior de la partícula formando una fase líquida separada del cristal de trimiristina. Cuando la proporción de TCC es baja, la fase líquida podría distribuirse entre los bordes y escalones de la estructura laminar de los cristales de trimiristina, pero a medida que la proporción de la fase líquida aumenta, es probable que se localice en una fase separada del cristal hasta eventualmente llegar a recubrirlo totalmente para formar una estructura como la de la Figura 4-34.

4.4.2 Determinación del comportamiento de liberación

Para investigar el comportamiento de liberación de los parabenos desde las nanopartículas lipídicas, inicialmente es necesario descartar que existan interacciones entre las moléculas de los parabenos y el P188 que puedan interferir en la interpretación de los resultados. En este sentido, los ensayos de compatibilidad presentados en el Anexo D, Figura D-1, muestran que el P188 a concentraciones incluso mayores al 2.5 % no presenta incompatibilidades ni interferencias con ninguno de los parabenos. Los valores para la absorbancia de las distintas concentraciones de parabenos evaluadas no evidencian cambios significativos en comparación con los valores obtenidos para las mismas concentraciones de parabenos obtenidas a partir de soluciones acuosas. Por el contrario, es evidente que el tensioactivo Tween® 20, usado como control positivo en estos ensayos de compatibilidad, no es recomendable como agente estabilizante dado que podría producir interferencias en la cuantificación e incompatibilidad con los parabenos a concentraciones superiores al 2.5 %.

De otro lado, a partir de los termogramas de calentamiento de la Figura 4-27 se evidencia que las dispersiones cargadas con metilparabeno y propilparabeno a proporciones mayores del 50 % de TCC no solidifican bajo la historia térmica introducida, es decir, 4 °C durante 24 h. Por lo tanto, en la Figura 4-48 se muestran

los perfiles de liberación característicos de SLN, NLC, NE de TCC/trimiristina, NE de TCC, NE subenfriadas con 100 % de trimiristina y NE subenfriadas de trimiristina/TCC. Para el ensayo de liberación se seleccionaron las dispersiones en donde la proporción de TCC aumentaba en un 20 % de modo que se cubriera todo el rango desde 0 % hasta 100 % de TCC. El ensayo de liberación emplea una metodología analítica estandarizada para la cuantificación de los parabenos (Anexo D).

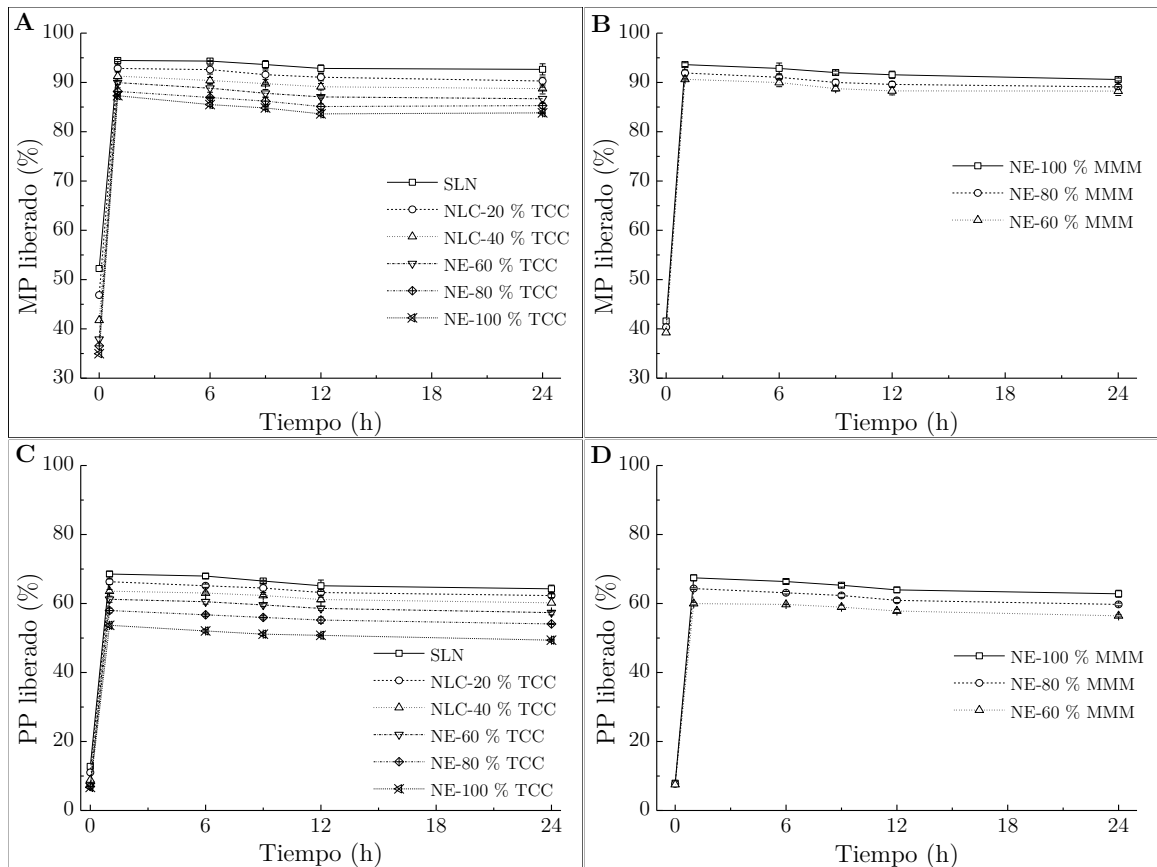


Figura 4-48. Perfiles de liberación de las dispersiones lipídicas en agua.

En A y C se presentan los perfiles de liberación de las dispersiones enfriadas a 4 °C para el MP y el PP, respectivamente, en B y D se presentan los perfiles de liberación de las dispersiones enfriadas a 20 °C.

En general, los perfiles de liberación de las moléculas de parabenos desde las dispersiones lipídicas presentan el mismo comportamiento. Tan pronto como las dispersiones son diluidas en el medio de liberación, las moléculas del parabeno se liberan en una proporción que depende de la cantidad libre de parabenos en la dispersión y del equilibrio de partición entre las dos fases, alcanzando un valor máximo casi de inmediato que no cambia durante las 24 h de seguimiento, lo que no permitió

hacer un análisis del comportamiento cinético de la liberación. De hecho, las dispersiones del presente estudio tienen un comportamiento de liberación similar al de SLN y NLC preparadas a partir de Precirol® ATO 5 (85 % p/p) y aceite de almendras (15 % p/p) estabilizadas con P188 (3.1 % p/p) y colato de sodio (1.2 % p/p), en las que el metilparabeno se libera más rápido y en mayor cantidad en comparación con el propilparabeno (Cerreto et al., 2013).

La liberación de las moléculas depende del tipo de dispersión de nanopartículas (SLN, NLC o NE), del coeficiente de distribución ($\log D$) de los parabenos y de su solubilidad en los componentes de la matriz. La solubilidad estimada del propilparabeno en TCC fue de $80.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 1.3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ mientras que para el metilparabeno fue de $66.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \pm 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Figura 4–49). Por lo tanto, es consecuente que el propilparabeno se libere en menor cantidad que el metilparabeno.

En las SLN con 100 % de trimiristina la cantidad de parabenos liberada es mayor que en las nanoemulsiones con 100 % de TCC debido a que la cantidad de parabenos libre en las SLN es mayor que en las NE. El mismo comportamiento se presenta en las dispersiones de NLC en donde la cantidad liberada disminuye al incrementar la proporción de TCC en la nanopartícula. Adicionalmente, los parabenos se liberan en mayor proporción desde las nanoemulsiones subenfriadas preparadas con 100 % de trimiristina en comparación con las nanoemulsiones preparadas con 100 % de TCC y aumenta con la proporción de trimiristina en las mezclas.

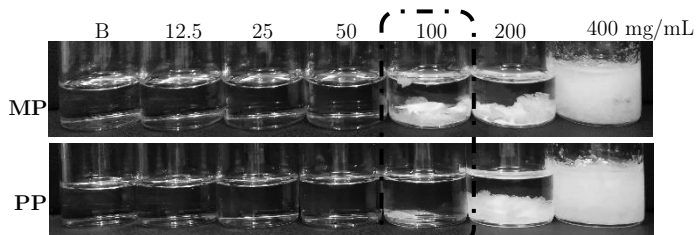


Figura 4–49. Solubilidad estimada del MP y PP en TCC.

Para establecer la solubilidad de los parabenos se utilizó una alícuota de la primera muestra que presentó cristales visibles de los parabenos y se diluyó en 10 mL de acetonitrilo para registrar el valor de la absorbancia a 255.2 nm.

En las dispersiones que tienen menor capacidad de carga, es decir, en aquellas que predomina la fracción de lípido sólido, hay más parabenos libres en la fase acuosa por lo que en la alícuota tomada para el ensayo de liberación habrá una cantidad mayor

de parabenos en el punto de inicio. Esa cantidad se va reduciendo a medida que aumenta la proporción de TCC en las nanopartículas, de modo que la cantidad posteriormente liberada desde las nanopartículas depende del coeficiente de partición del parabeno en la nanopartícula y la fase dispersante.

Previamente se mencionó que los triglicéridos de cadena corta se empaquetan mejor en el estado líquido que los triglicéridos de cadena larga (Hsu y Violi, 2009), lo que se ve reflejado en un aumento de la densidad de dichos triglicéridos (Figura 4–19). Así mismo, la interpenetración de los segmentos hidrófobos del P188 podría verse favorecida en los triglicéridos de cadena larga o más hidrófobos (Tanaka et al., 2003). Por lo tanto, se esperaría que tanto el metilparabeno como el propilparabeno tuviesen un comportamiento de liberación más lento en las nanoemulsiones con 100 % de trimiristina subenfriada respecto a las nanoemulsiones con 100 % de TCC. Sin embargo, los perfiles de liberación sugieren que además de los argumentos presentados en la discusión sobre capacidad de carga acerca del estado físico de las nanopartículas y el contenido de TCC, el metilparabeno y el propilparabeno podrían tener menor solubilidad y coeficiente de partición en la trimiristina subenfriada en comparación con el TCC.

Una forma de verificar estos comportamientos es mediante la sustracción de la cantidad libre de parabenos a cada uno de los perfiles de liberación (Figura 4–50). Como se observa, para las dispersiones de metilparabeno la cantidad liberada por las SLN es menor que en las NE de TCC mientras que en las dispersiones con propilparabeno ocurre todo lo contrario. Esta aparente contradicción en realidad obedece a que, en esta forma de análisis, las partículas tienen la cantidad máxima de parabenos que pueden incorporar. Por consiguiente, la cantidad liberada de metilparabeno a partir de las dispersiones de trimiristina 100 % es más pequeña que en las NE con 100 % de TCC. La adición progresiva de TCC a la matriz lipídica en los NLC aumenta la cantidad de carga de las nanopartículas en una proporción que depende de la cantidad de TCC adicionado. Por lo tanto, a medida que se adiciona el TCC a la matriz lipídica, las nanopartículas pueden incorporar una cantidad mayor de metilparabeno de modo que durante la dilución liberan aparentemente una cantidad mayor en comparación con las SLN. Sin embargo, en realidad, estas

dispersiones de partículas solo liberan el metilparabeno que excede el máximo posible que puede incorporar la matriz lipídica.

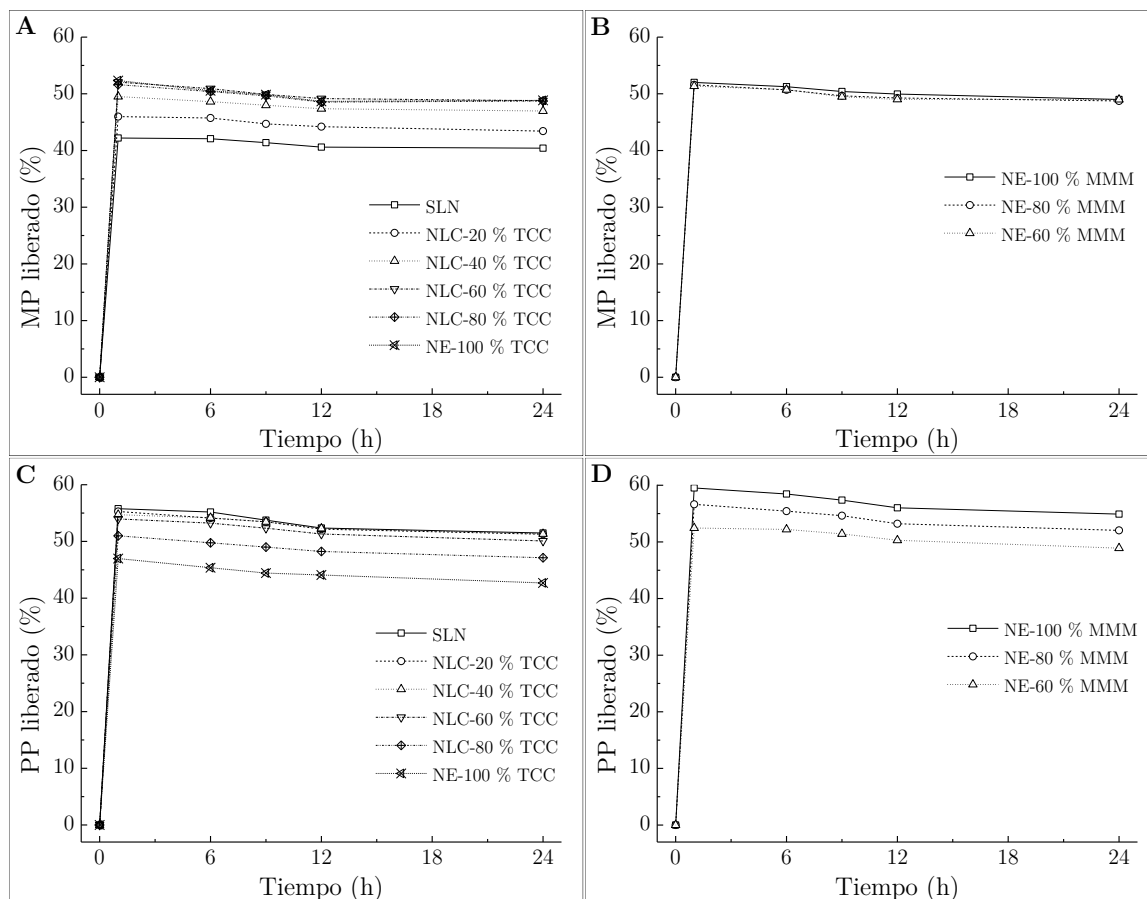


Figura 4-50. Perfiles de liberación de las dispersiones lipídicas sustrayendo la cantidad libre de parabenos.

En A y C se presentan los perfiles de liberación de las dispersiones enfriadas a 4 °C para el MP y el PP, respectivamente mientras que en B y D se presentan los perfiles de liberación de las dispersiones enfriadas a 20 °C.

De hecho, este comportamiento también se corrobora a partir de los datos de los perfiles de liberación de las dispersiones con propilparabeno (Figura 4-50C). Debido a que la capacidad de carga de este parabeno en las dispersiones lipídicas es mayor, la cantidad máxima que se puede alojar en las partículas también lo es. En consecuencia, la cantidad que se libera al medio durante la dilución de las dispersiones para hacer el ensayo de liberación es menor que la que se libera en las dispersiones con metilparabeno. Por lo tanto, en este caso, las SLN liberan mayor cantidad que las NE porque pueden incorporar menos parabenos. En los NLC, a medida que aumenta

la proporción de TCC en la matriz lipídica también aumenta la cantidad máxima de propilparabeno que las partículas pueden incorporar y de ese modo, durante la dilución en el medio de liberación la cantidad liberada se va reduciendo progresivamente.

Este fenómeno también es evidente en las NE subenfriadas (Figuras 4-50B y 4-50D). Debido a que al parecer la solubilidad del propilparabeno disminuye a medida que aumenta la proporción de MMM en la gota, la cantidad máxima que las gotas pueden incorporar aumenta a medida que se reduce la proporción de MMM. Sin embargo, para las NE la solubilidad del metilparabeno en las gotas subenfriadas podría ser mucho menor. En consecuencia, estas nanoemulsiones liberan muy poca cantidad al momento de adicionarlas al medio de liberación.

Estos resultados también son producto de las diferencias en la solubilidad en agua de los parabenos. La concentración adicionada de parabenos durante la preparación de las nanopartículas fue de aproximadamente $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y al momento de incorporar la alícuota de las dispersiones de los sistemas lipídicos al medio de liberación, la concentración de parabenos corresponde a $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Puesto que la solubilidad en agua del metilparabeno es de $2500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, su concentración está justo en el límite de saturación de la fase dispersante del sistema lipídico de modo que una vez preparado dicho sistema, las moléculas de parabenos se distribuyen libremente entre las nanopartículas y la fase dispersante, cuya proporción se ve favorecida en la fase de mayor solubilidad. Así, durante la solidificación de la trimiristina la mayoría de las moléculas del metilparabeno son “expulsadas” hacia el exterior del cristal ubicándose en la interfase con el P188 y desde donde puede migrar a la fase dispersante. Si la solubilidad en la fase dispersante es elevada, como sucede con el metilparabeno, la cantidad que queda asociada a la nanopartícula una vez preparadas podría ser pequeña y, por lo tanto, la cantidad liberada durante la dilución también debería ser pequeña.

Respecto al propilparabeno, su solubilidad en agua es de $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y la cantidad adicionada durante la preparación de las dispersiones es poco más de seis veces la cantidad que podría disolverse en la fase dispersante. De modo similar a lo descrito para el metilparabeno, durante el enfriamiento de las gotas y la cristalización de la trimiristina el propilparabeno es expulsado a la interfase con el P188 y de allí migra a

la fase dispersante. Sin embargo, debido a la baja solubilidad del propilparabeno en agua solo una pequeña proporción puede migrar a la fase dispersante quedando la mayor parte asociada a las nanopartículas. Durante la dilución al adicionar las dispersiones de sistemas lipídicos al medio de liberación, al igual que para el metilparabeno, la concentración de los parabenos se reduce a $25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y la cantidad de propilparabeno en exceso asociado a las nanopartículas se libera de inmediato, quedando en las partículas solamente aquellas moléculas completamente incorporadas. Como se ha mencionado, en este caso la cantidad en exceso asociada a las nanopartículas es mayor que en las dispersiones con metilparabeno debido a su mayor solubilidad en la fase dispersa.

Este comportamiento ya había sido advertido previamente por Bunjes (2010). Cuando se determina la capacidad de incorporación de moléculas activas en una emulsión se deben tener en cuenta tanto la solubilidad del fármaco en el aceite como la partición en la fase acuosa y el aceite. Si la concentración del fármaco en la fase dispersante excede el límite de solubilidad, éste podría precipitar a pesar de que la concentración del fármaco en la fase oleosa pueda estar por debajo del límite de solubilidad (Bunjes, 2010). Si el fármaco precipita en la dispersión, significa que la proporción en la fase lipídica de las nanopartículas podría ser mucho menor a la estimada. Por consiguiente, es importante descartar la presencia de cristales de parabenos que hayan precipitado.

Una forma de confirmar la presencia de cristales de parabenos o verificar que se encuentran totalmente disueltos o en un estado solubilizado en las dispersiones es a través del análisis térmico diferencial a alta presión (HP-DSC). Mediante esta técnica, la temperatura de la dispersión puede ser elevada a valores mayores al punto de fusión de los parabenos sin el riesgo de ebullición de la fase acuosa y de ese modo, detectar solamente los eventos térmicos asociados a los demás componentes de las partículas en dispersión, por ejemplo, la fusión de los cristales de parabenos en la dispersión producidos cuando la cantidad de parabenos adicionada excede la solubilidad en el medio dispersante.

Como se observa en la Figura 4-51, el comportamiento térmico de las dispersiones conteniendo parabenos fue muy similar al encontrado mediante DSC convencional (Anexo B, Tablas B-15 y B-16), Como se mencionó, la solubilidad en agua del

metilparabeno es de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, es decir la misma cantidad de parabenos usada para preparar las dispersiones (Tabla 3-1), mientras que la solubilidad en agua del propilparabeno es de $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Rowe et al., 2009; Sweetman, 2009).

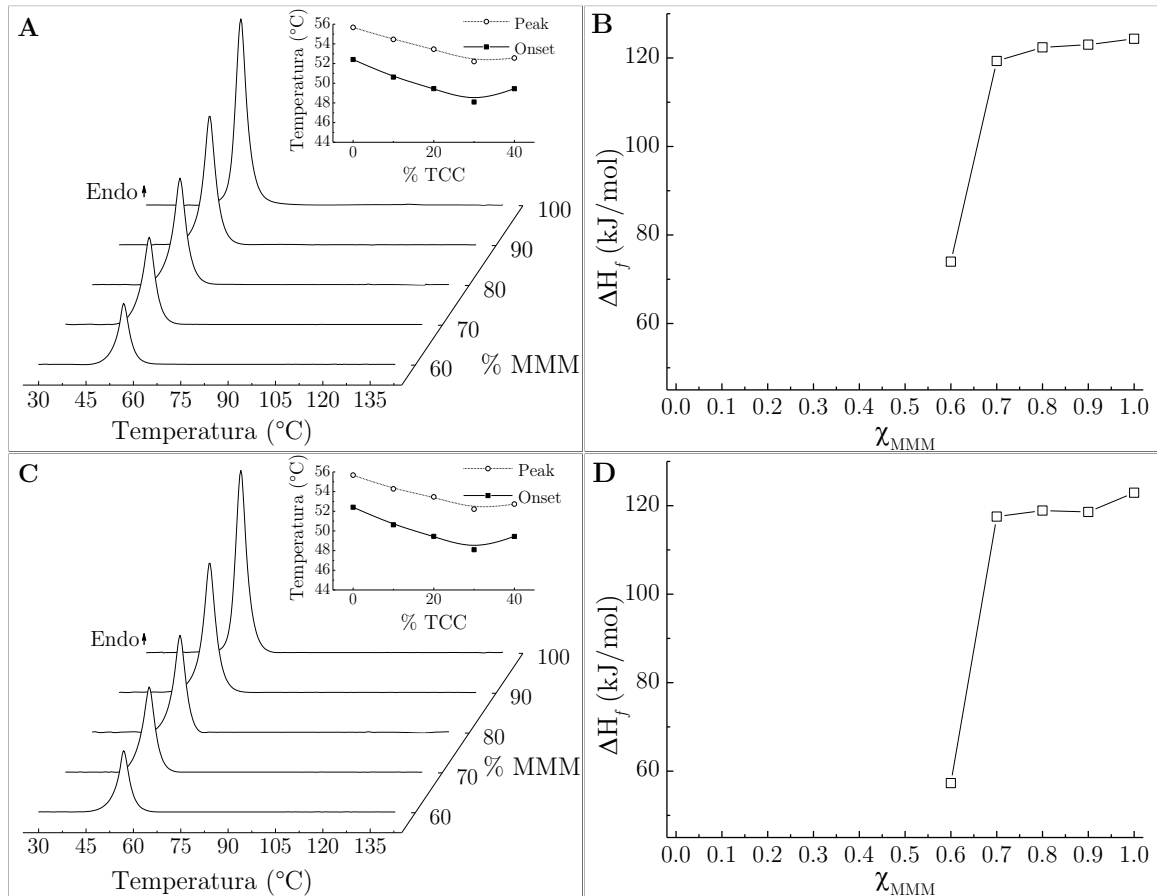


Figura 4–51. Análisis térmico diferencial a alta presión (HP–DSC) de las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h conteniendo parabenos.

En A y C se muestran los eventos térmicos de las dispersiones de metil y propilparabeno, respectivamente y en B y D se muestra el valor de la entalpía de fusión para dichos eventos.

Así, la cantidad usada en la preparación de las dispersiones ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) excede la solubilidad del propilparabeno, aun asumiendo que el P188 tenga un efecto solubilizante sobre los parabenos. En consecuencia, a menos que el excedente de propilparabeno esté completamente asociado a las nanopartículas, debería precipitar en forma de cristales y el evento de fusión correspondiente podría ser detectado mediante HP–DSC. No obstante, en los termogramas de fusión de las dispersiones con propilparabeno no se detectó ningún evento de fusión diferente al de los lípidos de la matriz, por lo tanto, es válido suponer que el propilparabeno no disuelto en la

fase dispersante debe estar asociado a las nanopartículas. Incluso si la resolución del HP–DSC no logra identificar los eventos térmicos de fusión de los cristales de propilparabeno, el ensayo colorimétrico con FeCl_3 (Figura 4–45) puede ser de hecho una forma adicional de verificar la presencia o ausencia de cristales precipitados de propilparabeno. Debido a la formación de un complejo muy coloreado y a la apariencia blanca de las dispersiones, la presencia de cristales de propilparabeno es fácilmente detectable en el fondo de los tubos de ensayo, porque de estar presentes mostrarían un intenso color violeta que no fue visible en ninguna de las dispersiones.

De acuerdo con todo lo anterior, el comportamiento de liberación de las dispersiones de SLN sugiere que los parabenos podrían localizarse en las nanopartículas en dos zonas diferentes. En la primera, dichas moléculas probablemente se incorporan sobre la superficie de las nanopartículas y la interfase del agente estabilizante. En la segunda zona, los parabenos se asocian con la interfase del agente estabilizante en un estado solubilizado. La cantidad de parabenos que se localiza en cada una de estas zonas depende de varios factores, incluyendo la solubilidad en la fase dispersante y la afinidad de las moléculas del fármaco con la superficie de las partículas y la interfase del agente estabilizante.

Respecto a los NLC, la adición del TCC a la matriz de trimiristina conduce a la formación de partículas bifásicas en las que una fase líquida formada por moléculas de trimiristina disueltas en TCC se localiza en la superficie de los cristales de trimiristina. Así, una parte de los parabenos se distribuye entre esta fase líquida y la superficie de la trimiristina y la otra se asocia con la interfase formada por la capa de P188 alrededor de la partícula. En este sentido, a medida que aumenta la proporción de TCC en las nanopartículas, también aumenta la cantidad de moléculas que se pueden localizar en la fase líquida. Similarmente, en la NE las moléculas de parabenos se distribuyen entre la fase líquida y la capa de P188 dependiendo de la solubilidad de cada parabeno en la fase líquida de TCC o trimiristina subenfriada, la capa de P188 y el medio dispersante.

Las moléculas incorporadas en la zona más interna de la nanopartícula podrían estar tan fuertemente asociadas que no podrían liberarse con facilidad. Tal es el caso de las dispersiones lipídicas con propilparabeno en las que cerca del 60 % permanece

incorporado en la nanopartícula sin mostrar signos de poderse liberar en tiempos más prolongados. En consecuencia, la liberación *in vivo* de fármacos a partir de nanopartículas lipídicas puede tener lugar más por degradación de la matriz lipídica de las nanopartículas que por procesos difusivos (Helena de Abreu-Martins et al., 2020). Al respecto, se ha reportado que en las dispersiones de nanopartículas lipídicas preparadas con triglicéridos de cadena larga y estabilizadas por mecanismos estéricos como el del P188, la degradación es más lenta que aquella observada para nanopartículas preparadas con triglicéridos de cadena corta y estabilizadas con agentes que promueven su degradación tales como las sales biliares (Olbrich et al., 2002b; Olbrich y Müller, 1999). Además, la velocidad de degradación disminuye a medida que aumenta la cristalinidad de las nanopartículas (Olbrich et al., 2002a).

De otro lado, si se asume que la liberación de los parabenos es controlada por el logaritmo del coeficiente de distribución ($\log D$) entre la fase lipídica y el medio de liberación, se puede establecer una correlación entre el $\log D$ y la liberación de los parabenos a partir de la proporción entre el volumen de las nanopartículas lipídicas (V_{NP}) y el volumen del medio de liberación (V_{RM}), de acuerdo con la ley de distribución de Nernts. Esto permite establecer la concentración remanente ($\%C_{NP}$) de los parabenos en las nanopartículas de acuerdo con la Ecuación 4-15, del mismo modo como se ha reportado en sistemas de entrega de fármacos autoemulsionables, SEDDS (Bernkop-Schnürch y Jalil, 2018):

$$\%C_{NP} = \frac{100\%}{1 + \frac{V_{RM}}{V_{NP} \times D_{NP/RM}}} \quad (4-15)$$

El coeficiente de partición se calcula a partir del cociente entre la solubilidad estimada del parabeno en el TCC y la solubilidad en agua. Los valores logarítmicos estimados para el metil y el propilparabeno son de 1.31 y 2.28, respectivamente. Si el $\log D$ está por debajo de 3 significa que una cantidad considerable del fármaco puede ser liberada inmediatamente desde las nanoemulsiones (Bernkop-Schnürch y Jalil, 2018), así como se observa para el metilparabeno en las nanoemulsiones de TCC de la Figura 4-50.

Al comparar la capacidad de incorporación obtenida experimentalmente (DL) respecto a la cantidad remanente ($\%C_{NP}$), considerando que el volumen de la fase lipídica (V_{NP})

en las nanoemulsiones con 100 % TCC es de aproximadamente 5 mL, dado que ésta es la proporción de aceite que se adiciona durante la preparación de las nanopartículas (sin considerar las pérdidas asociadas al método de obtención), y que 50 mL es el volumen del medio en el que están inicialmente dispersas las partículas (V_{RM}) la cantidad remanente ($\%C_{NP}$) estimada es aproximadamente del 95.5 % para el propilparabeno y del 69.4 % para el metilparabeno, valores próximos a la capacidad de carga (91.5 % para el propilparabeno y 64.5 % para el metilparabeno). Esto sugiere que la distribución del propilparabeno entre la fase lipídica y la fase dispersante durante la preparación es controlada principalmente por partición. Las diferencias entre ambos valores podrían ser el resultado de errores experimentales propios de cada una de las metodologías.

Aplicando la ley de Nernts a todas las dispersiones lipídicas (Tabla 4-9) se observan diferencias entre la cantidad remanente y la capacidad de incorporación.

Tabla 4-9. Cantidad remanente y capacidad de incorporación de parabenos en las dispersiones lipídicas.

% TCC	Metilparabeno			Propilparabeno		
	% C_{NP}	*DL		% C_{NP}	*DL	
		4 °C	20 °C		4 °C	20 °C
NLC-10 %	17.1	46.3	54.0	65.9	81.2	84.7
NLC-20 %	29.4	50.2	56.1	79.6	82.8	85.8
NLC-30 %	38.7	53.4	57.4	85.5	84.8	86.9
NLC-40 %	46.0	55.6	57.9	88.8	86.0	87.2
NE-50 %	51.8	58.3	–	91.0	88.1	–
NE-60 %	56.6	–	60.5	92.4	–	89.0
NE-70 %	60.6	60.8	–	93.5	89.5	–
NE-80 %	64.0	–	62.2	94.3	–	90.6
NE-90 %	66.9	63.5	–	95.0	90.6	–
NE-100%	69.4	–	64.5	95.5	–	91.5

*Corresponde al porcentaje de parabeno respecto al 5 % colocado inicialmente en la dispersión (Anexo D, Tabla D-6).

Estas diferencias sugieren que además de la distribución entre fases controlada por el coeficiente de distribución, existen otras interacciones adicionales de las moléculas modelo con las nanopartículas tales como interacciones hidrófobas (Rosenblatt y Bunjes, 2009) y particularmente en las dispersiones enfriadas a 4 °C, que pueden influenciar el comportamiento de liberación de los sistemas coloidales basados en lípidos.

En las SLN con 100 % de trimiristina la cantidad de parabenos liberada es mucho mayor que en las nanoemulsiones con 100 % de TCC debido a que la cantidad de parabenos libre en las SLN es mayor que en las NE. El mismo comportamiento se presenta en las dispersiones de NLC en donde la cantidad liberada aumenta con la proporción de TCC en la nanopartícula. Adicionalmente, los parabenos se liberan más rápidamente desde las nanoemulsiones subenfriadas preparadas con 100 % de MMM en comparación con las nanoemulsiones preparadas con 100 % de TCC y aumenta con la proporción de MMM en las mezclas.

En consecuencia, una posible razón del incremento de la capacidad de carga en las nanopartículas previamente discutido podría relacionarse con la habilidad del P188 de mejorar la solubilidad de compuestos hidrófobos insolubles en agua. La temperatura durante la preparación de las nanopartículas favorece la formación de estructuras micelares que albergarían probablemente las gotas de los lípidos fundidos de la matriz. Adicionalmente, el interior de dichas micelas está formado principalmente por los segmentos PPO que proporcionan un ambiente hidrófobo, adecuado para la solubilización de moléculas hidrófobas (Alexandridis, 1997; Alexandridis y Alan Hatton, 1995). Por lo tanto, la cantidad de moléculas de parabenos que pueden integrarse a las gotas fundidas aumenta. Una vez la temperatura disminuye y la solubilidad tanto en la fase lipídica como en la fase acuosa dispersante disminuye, las moléculas en exceso en ambas fases son obligadas a migrar hacia la capa del agente estabilizante que rodea las partículas.

Es posible suponer que las moléculas que migran a la capa de P188 desde la fase acuosa se localicen en un “microambiente” de hidrofobicidad intermedia en la interfase P188–fase acuosa en donde predominan los segmentos PEO, mientras que las moléculas que migran desde el interior de las gotas fundidas se localicen en un “microambiente” mucho más hidrófobo en la interfase formada por la fase lipídica–P188 en donde predominan los segmentos PPO. En consecuencia, las moléculas más hidrófobas tendrán preferencia por el “microambiente” donde predominan los segmentos PPO y las moléculas de hidrofobicidad intermedia tendrán preferencia por el “microambiente” en donde predominan los segmentos PEO, lo que daría cuenta del aumento en la cantidad de metilparabeno incorporado en las nanopartículas lipídicas

con respecto a la cantidad estimada de acuerdo con la ley de distribución de Nernts. De modo similar, las moléculas ubicadas en este “microambiente” serían liberadas con mayor facilidad durante la dilución de las nanopartículas al adicionar la alícuota de los sistemas lipídicos al medio en los ensayos de liberación, explicando de ese modo, el comportamiento de liberación de la Figura 4–50.

No obstante, se ha observado que incrementar la concentración de P188 en dispersiones de SLN de trimiristina, tripalmitina y triestearina reduce la eficiencia de atrapamiento de la clozapina debido probablemente al efecto solubilizante del agente estabilizante (P188) en la fase acuosa (Venkateswarlu y Manjunath, 2004). Como se mencionó previamente, la dilución de las nanopartículas en agua provoca que una parte de la capa de P188 se disuelva en el medio de liberación lo que se verifica con la reducción en el tamaño medio estimado de las nanopartículas. Por consiguiente, se puede suponer que, al iniciar el ensayo de liberación, las moléculas de los parabenos solubilizadas por el P188 contribuyen con el elevado efecto de carga inicial observado. En este sentido, el efecto de carga debería verse reducido si la dilución de las dispersiones se hace en una solución de P188 al 2.5 % p/v y no en agua destilada. Sin embargo, los estudios de liberación usando P188 al 2.5 % p/v (Figura 4–52) no muestran diferencias significativas, esto sugiere que el “microambiente” de hidrofobicidad intermedia no está tan expuesto a la fase dispersante, es decir, que cuando el medio de liberación es agua las partículas ceden una fracción del P188 que rodea las partículas, así como se explicó en la Figura 4–3, en la que la cantidad de parabenos es muy pequeña. Además, cuando el medio de liberación es P188 al 2.5 % p/v, el efecto solubilizante sobre los parabenos podría no ser suficiente como para mostrar un efecto significativo en el comportamiento de liberación.

En general, los resultados del comportamiento de liberación *in vitro* muestran que las nanosuspensiones de SLN no parecen proporcionar ninguna ventaja frente a las nanoemulsiones de TCC. Por el contrario, si la comparación se hace con respecto a las nanoemulsiones subenfriadas de trimiristina, es decir, si se comparan nanosuspensiones y nanoemulsiones con la misma composición, las SLN parecen tener una mejor liberación. De otro lado, los sistemas bifásicos formados por las mezclas binarias entre la trimiristina y el TCC muestran comportamientos de liberación

intermedios. Por consiguiente, la liberación *in vitro* de los parabenos procede en el orden NE-MMM>SLN>NLC>NE-TCC, en donde un incremento en la proporción de TCC produce un aumento en la cantidad remanente de los parabenos incorporados.

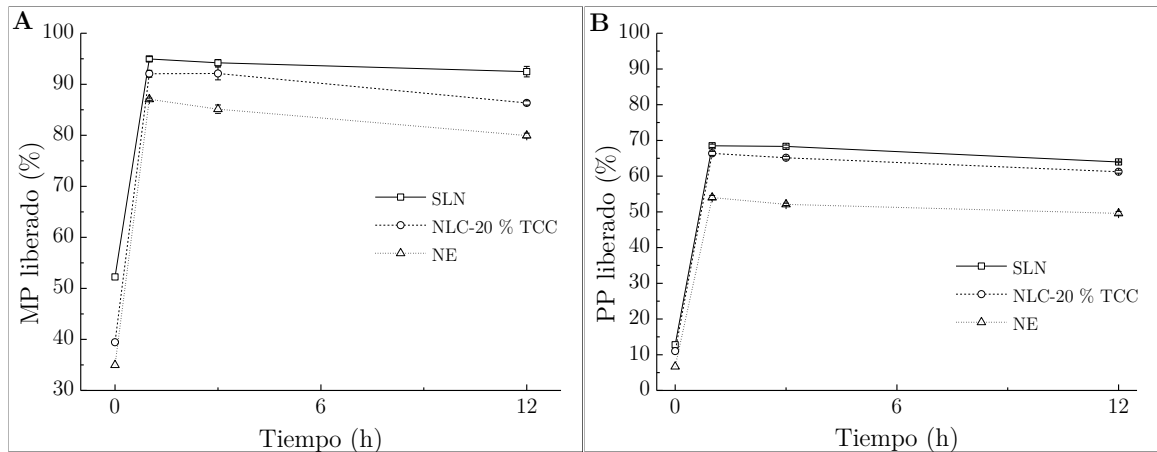


Figura 4-52. Perfiles de liberación de las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo parabenos enfriadas a 4 °C durante 24 h usando como medio de liberación P188 al 2.5 % p/v.

En A y B se presentan los perfiles de liberación de las dispersiones para el MP y el PP, respectivamente.

En síntesis, los resultados anteriores demuestran que la liberación de las moléculas activas desde sistemas coloidales basados en lípidos depende de la naturaleza química de los componentes de las partículas. Además, el comportamiento de liberación está influenciado no solo por las características estructurales de la partícula sino también por las diferencias intrínsecas propias de las moléculas incorporadas, tales como su coeficiente de partición. Igualmente, se ha reportado que la cinética de disolución del fármaco o la diferencia de cargas en las moléculas activas podrían tener algún efecto en su liberación a partir de sistemas lipídicos (Shah et al., 2016). Por lo tanto, a pesar del comportamiento de liberación observado en esta investigación no se puede descartar que el comportamiento de liberación pueda ser diferente para moléculas con diferentes propiedades fisicoquímicas.

5. Observaciones finales y conclusiones

Los sistemas coloidales basados en lípidos, en especial las nanopartículas sólidas lipídicas y los sistemas lipídicos nanoestructurados, han atraído la atención durante más de dos décadas como una alternativa para la entrega de fármacos poco solubles en agua. Sin embargo, a pesar de considerarlas prometedoras sobre la base de sus mejores desempeños de estabilidad, capacidad de carga y comportamiento controlado de la liberación del fármaco respecto a, por ejemplo, las nanoemulsiones (Zhong y Zhang, 2019), todavía existe un conocimiento limitado sobre cómo las características estructurales de este tipo de sistemas pueden tener un efecto significativo sobre sus propiedades funcionalmente importantes, particularmente en relación con su localización dentro de las partículas individuales y su impacto sobre el comportamiento de liberación. Esto se debe quizás a que las propiedades relacionadas con la organización estructural de la partícula siguen siendo poco estudiadas y aunque los aportes hechos por varios investigadores son de gran valor, todavía quedan muchos aspectos por tratar.

En este sentido, en este trabajo de investigación se presentan los resultados del estudio comparativo entre nanopartículas sólidas lipídicas, transportadores lipídicos nanoestructurados y nanoemulsiones con el objeto de brindar un aporte acerca de la caracterización de la estructura interna y de la superficie de estos sistemas, así como su influencia en el comportamiento de liberación de dos moléculas modelo (metil y propilparabeno) incorporadas en ellos. La estrategia metodológica empleada permitió obtener sistemas lipídicos tipo SLN, NLC y NE con la misma composición. El tamaño medio de partícula de las dispersiones preparadas fue de aproximadamente 200 nm, con índices de polidispersidad en todos los casos inferiores a 0.3. En general, el tamaño medio de partícula y el índice de polidispersidad de las dispersiones disminuye en el

orden SLN>NLC>NE, lo que sugiere que la adición de TCC a la trimiristina lipídica produce una reducción en la asimetría de las partículas.

El análisis térmico indica que la adición del TCC, del metilparabeno o del propilparabeno a la fase lipídica influencia la velocidad de cristalización de las gotas fundidas causando un incremento significativo en la temperatura de subenfriamiento. Así, para inducir la nucleación y posterior cristalización de la trimiristina en fases lipídicas con proporciones de TCC mayores al 40 % se requieren temperaturas inferiores a los 4 °C. Además, las mezclas binarias entre la trimiristina y el TCC conducen a la formación de una mezcla eutéctica en la que la trimiristina cristaliza como un sólido puro rodeado de una fase líquida formada por trimiristina disuelta en el TCC. De hecho, el valor para la entalpía de fusión estimado para las dispersiones lipídicas es muy similar a la entalpía de fusión del polimorfo β de la trimiristina, el cual se refleja en un índice de cristalinidad cercano al 80 %.

Adicionalmente, el patrón de difracción de rayos X de las dispersiones es característico de los triglicéridos monoácidos saturados en una configuración polimórfica de tipo β , con una señal intensa hacia 0.45–0.46 nm y dos señales débiles hacia 0.36–0.37 nm y 0.37–0.38 nm para la trimiristina, indicando además la ausencia de polimorfos de alta energía tales como los polimorfos α y β' . La formación de estructuras bifásicas en las que el polimorfo β de la trimiristina forma una fase separada del TCC se corroboró mediante espectroscopía Raman a partir de la proporción relativa de las dos bandas principales $\eta = I_{\sim 2846} / I_{\sim 2882}$. En este caso, los valores de η de aproximadamente 0.58 de la trimiristina en polvo y para cada una de las dispersiones lipídicas conteniendo hasta un 60 % de TCC, sugieren que el estado cristalino de la trimiristina en las dispersiones lipídicas es esencialmente el mismo que el de la trimiristina pura, independientemente de la presencia de TCC en la matriz. Consecuentemente, es más probable que el TCC favorezca la transición polimórfica de la trimiristina desde las fases metaestables α y β' hacia la fase β . Por lo tanto, las mezclas binarias de triglicéridos usadas para preparar NLC no garantizan la obtención de una solución sólida dado que en la mayoría de los casos se obtienen mezclas eutécticas.

De modo similar, la ausencia de las señales características para las fases cristalinas de los parabenos en los espectros de Raman permite suponer que las moléculas se asocian

a las nanopartículas lipídicas en un estado amorfo o solubilizado y su incorporación en la matriz lipídica altamente ordenada es bastante improbable. De esta forma, los resultados obtenidos se corresponden con estructuras en las que el lípido líquido se ubica sobre una superficie de un cristal tipo β y en donde se solubilizarían las moléculas del activo (Figura 5-1).

De otro lado, la cantidad estimada de P188 adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas fue claramente dependiente del tratamiento térmico realizado y de la proporción de TCC en la dispersión. La cantidad de P188 ubicado sobre la superficie de las gotas de las nanoemulsiones es menor que aquella estimada sobre la superficie de las partículas de las nanosuspensiones, es decir, las dispersiones formadas por partículas bifásicas, y disminuye con la proporción de TCC. De acuerdo con lo anterior, el estado físico y la composición de la matriz lipídica parecen tener un impacto directo sobre la cantidad de agente estabilizante requerido para estabilizar las dispersiones. En promedio, la extensión espacial de la capa de P188 (espesor hidrodinámico, δ_h) es de aproximadamente 20 nm por lo que la relación entre el espesor de la capa adsorbida y el radio de las partículas ($\delta_h/r=0.1$) es significativa y el mecanismo predominante para la estabilización de estos sistemas lipídicos sería el estérico. De hecho, en todas las dispersiones estudiadas el valor estimado de potencial ζ osciló entre -6 mV y -10 mV confirmando que, a pesar de la evidente separación de fases observada en algunas de las dispersiones estudiadas, la estabilidad alcanzada durante los dos años de almacenamiento se debe principalmente a la repulsión y al espesor hidrodinámico de la capa de P188 adsorbido sobre la superficie de las partículas. No obstante, la densidad de la trimiristina sólida y subenfriada es menor que la densidad del TCC, de modo que las mezclas binarias entre ambos lípidos pueden modular la densidad de las dispersiones. Así, si la densidad obtenida es similar a la del medio dispersante, la estabilidad de las dispersiones también mejora y, en consecuencia, la separación de las partículas mediante centrifugación se hace más difícil.

La interacción de los segmentos PEO y PPO del P188 con las partículas en las dispersiones depende de la proporción de TCC en la matriz lipídica. En las nanosuspensiones se estima que hay un aumento de parches hidrófobos sobre las

superficies sólidas mientras que en las nanoemulsiones puede ocurrir interpenetración de los segmentos PPO en las gotas. Estas diferencias en cuanto a la interacción del P188 con el estado físico de la matriz lipídica influyen en el grado de hidratación de los segmentos PEO en la interfase de las partículas. En este sentido, dependiendo del estado físico de la matriz lipídica, las moléculas hidrófobas como el rosa de Bengala pueden ser adsorbidas en la superficie de las partículas, ubicadas entre la interfase de la partícula y el P188, o pueden ser absorbidas en el interior de la matriz. Por consiguiente, en las nanoemulsiones se podría presentar tanto la absorción como la adsorción de las moléculas y en las nanosuspensiones solo se presentarían fenómenos de adsorción. Además, debido a que tanto la absorción del rosa de Bengala como el grado de hidratación de la capa de P188 es mayor en las nanoemulsiones, su hidrofobicidad sería mayor en las nanosuspensiones. Por consiguiente, las moléculas con características hidrófilas como el azul de Nilo y con alta solubilidad en agua tienen poca probabilidad de incorporarse en los sistemas lipídicos (SLN, NLC y NE).

Como se deduce a partir de los datos obtenidos, lo anterior afecta la capacidad de carga de las dispersiones y el comportamiento de liberación de las moléculas incorporadas. La capacidad de carga de las moléculas de parabenos fue mayor en las nanoemulsiones de TCC comparada con las de las nanosuspensiones de trimiristina. En los NLC la capacidad de carga aumenta en función de la proporción de TCC en la matriz lipídica. De acuerdo con nuestra evidencia, en las nanoemulsiones de TCC una parte de las moléculas de los parabenos estaría disuelta en las gotas y la otra se distribuiría en dos zonas ubicadas entre la superficie de la gota y la fase dispersante dependiendo de su hidrofobicidad, como se esquematiza en la parte izquierda de la Figura 5-1. La primera zona es la más externa y corresponde a la interfase entre la superficie de la gota y la capa de P188 en donde predominan los segmentos PPO y está caracterizada por la interpenetración de dichos segmentos en el interior de la gota y por ser altamente hidrófoba. La zona interna de la Figura 5-1 corresponde a la interfase entre la capa de P188 y la fase dispersante, en donde predominan los segmentos hidrófilos PEO del P188 por lo que su hidrofobicidad es intermedia y se encuentra fuertemente hidratada.

En las nanosuspensiones, la cristalización de la trimiristina probablemente expulsa los parabenos hacia la superficie del cristal de modo que sus moléculas se integran a las

nanopartículas principalmente por fenómenos de adsorción. No obstante, la superficie sólida de los cristales de trimiristina no permite la interpenetración de los segmentos PPO del P188, por lo que se necesita una mayor cantidad de agente estabilizante para reducir la energía interfacial generada por el incremento de parches hidrófobos producidos por el aumento del área superficial. Por consiguiente, en la interfase entre la superficie de la gota y la capa de P188 habrá una mayor cantidad de segmentos PPO en comparación con las nanoemulsiones, aumentando la hidrofobicidad de esta zona. En la zona interna de estas SLN, hay menor predominancia de segmentos PEO en comparación con las nanoemulsiones, lo que se refleja en un menor grado de hidratación. Así, las moléculas de los parabenos más hidrófobos se pueden incorporar en mayor cantidad entre la superficie del cristal y la zona interna. Por el contrario, las moléculas más hidrófilas se distribuyen en alta proporción en la zona externa, es decir, en la interfase entre la capa de P188 y la fase dispersante rica en segmentos PEO (Figura 5-1).

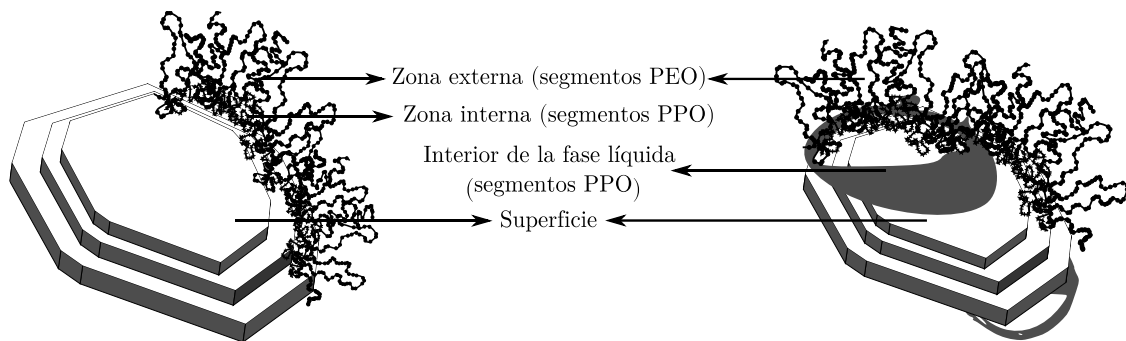


Figura 5-1. Organización estructural de las SLN y los NLC.

En las partículas bifásicas formadas por las mezclas binarias de trimiristina y TCC, las características de superficie y la capacidad de carga de los parabenos presentan un comportamiento intermedio entre las nanoemulsiones y las nanosuspensiones, el que depende de la proporción del TCC en la matriz lipídica (Figura 5-1). Así, cuando se incrementa la proporción de TCC, se produce una fase líquida en contacto íntimo con la superficie del cristal de trimiristina donde las moléculas de los parabenos se incorporan del mismo modo que lo hacen en las nanoemulsiones. Por el contrario, en las zonas del cristal de trimiristina no cubiertas por la fase lipídica líquida, las moléculas de los parabenos se incorporan como lo hacen en las nanosuspensiones.

El comportamiento de liberación es, por lo tanto, una consecuencia directa de la solubilidad de los parabenos en la fase lipídica (bien sea en el interior de la gota o en la superficie del cristal de trimiristina) y de las interacciones que presenten entre las dos zonas previamente descritas. La liberación *in vitro* de los parabenos sigue el orden: NE-MMM>SLN>NLC>NE-TCC, en donde un incremento en la proporción de TCC produce un aumento en la cantidad remanente de los parabenos incorporados.

De otro lado, las características y el comportamiento como sistemas de entrega de las nanoemulsiones de trimiristina subenfriadas al parecer son más dependientes de la solubilidad que tienen las moléculas de los parabenos en este tipo de sustancias y podría ser el hallazgo más interesante del presente estudio. La razón de esto es que, si la estructura de los nanotransportadores lipídicos determina el comportamiento de liberación de las moléculas activas incorporadas en ellos, y si la organización estructural es similar en todas las nanoemulsiones independientemente del aceite empleado, entonces también se puede asumir que su comportamiento de liberación debe ser muy similar. Sin embargo, las diferencias encontradas entre las nanoemulsiones de TCC y trimiristina subenfriada en comparación con las nanosuspensiones de SLN indican que no solo la organización estructural de la gota o de la partícula determina el comportamiento de liberación de la dispersión, sino que las interacciones entre las moléculas activas y la matriz lipídica también juegan un papel determinante.

Es de suponer que las interacciones entre los componentes de las nanogotas y los parabenos sean específicas para cada combinación. Sin embargo, es interesante evidenciar que estas interacciones además dependen del estado físico en el que se encuentran las moléculas involucradas. Las interacciones de las moléculas de los parabenos con la trimiristina parecen depender del estado físico de esta última y eso explicaría porque las nanoemulsiones de trimiristina subenfriada liberan la mayor cantidad de parabenos al ser adicionadas al medio de liberación. En efecto, ésta podría ser una de las causas por las que se observan resultados aparentemente contradictorios respecto al desempeño de las dispersiones lipídicas en ensayos *in vitro* de liberación de activos (Dan, 2014; Zoubari et al., 2017).

Al respecto, valdría la pena preguntarse si las SLN o los NLC son mejores que las NE. No obstante, el comportamiento de liberación observado en esta investigación para los tres tipos de sistemas lipídicos no da cuenta de ventajas importantes de las SLN sobre las NE. En cuanto a los sistemas bifásicos tipo NLC con altas proporciones de TCC, podrían tener propiedades comparables a las NE en cuanto a capacidad de carga y comportamiento de liberación, con la ventaja de ser más estables en el tiempo frente a la separación de fases.

Finalmente, desde el punto de vista de la aplicabilidad farmacéutica de este tipo de sistemas, sobre la base de los resultados aquí presentados no es posible afirmar con certeza que las SLN y los NLC satisfagan las expectativas con las que fueron desarrollados. A pesar de las múltiples posibilidades de aplicación como sistemas transportadores de fármacos, en todos los casos se deben estudiar detalladamente las características estructurales y evaluar críticamente si los comportamientos obtenidos presentan las ventajas esperadas antes de considerar el desarrollo completo de un sistema de entrega de fármacos probablemente más complejo que las emulsiones tradicionales.

6. Recomendaciones

Debido a la complejidad de los sistemas coloidales basados en lípidos, el conocimiento de las características de la estructura interna y de la superficie de las nanopartículas es de especial relevancia para evaluar su habilidad para incorporar moléculas activas en la matriz lipídica. Los resultados de este estudio han aportado una visión comparativa acerca de las características estructurales y el comportamiento de liberación de las SLN y los NLC frente a las nanoemulsiones.

Sin embargo, uno de los aspectos más difíciles de evaluar fue la morfología de las partículas. Durante el desarrollo experimental del estudio se intentó la observación de las dispersiones lipídicas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) y con unidad de Barrido (STEM). Sin embargo, y a pesar de los esfuerzos, no fue posible obtener ninguna imagen apropiada de las nanopartículas. En la Figura 6-1 se observa que las muestras se funden bajo el haz de electrones de modo que las partículas parecen tener forma esférica debido a la circularidad de la gota fundida sobre el soporte de carbono de la rejilla. Además, a medida que se incrementa la amplificación, es evidente la carbonización de las muestras lo que a su vez provoca una aparente reducción del tamaño de las nanopartículas.

Las imágenes de la Figura 6-1 corresponden a la dispersión de las nanopartículas de trimiristina, no obstante, todas las dispersiones se comportaron de la misma manera y no permitieron identificar diferencias entre los sistemas bajo estudio. Además, estos resultados son una clara demostración del riesgo de artefactos generados durante la observación de las nanopartículas lipídicas si no se trabajan bajo las condiciones adecuadas, lo que podrían dar lugar a interpretaciones equivocadas de las imágenes obtenidas.

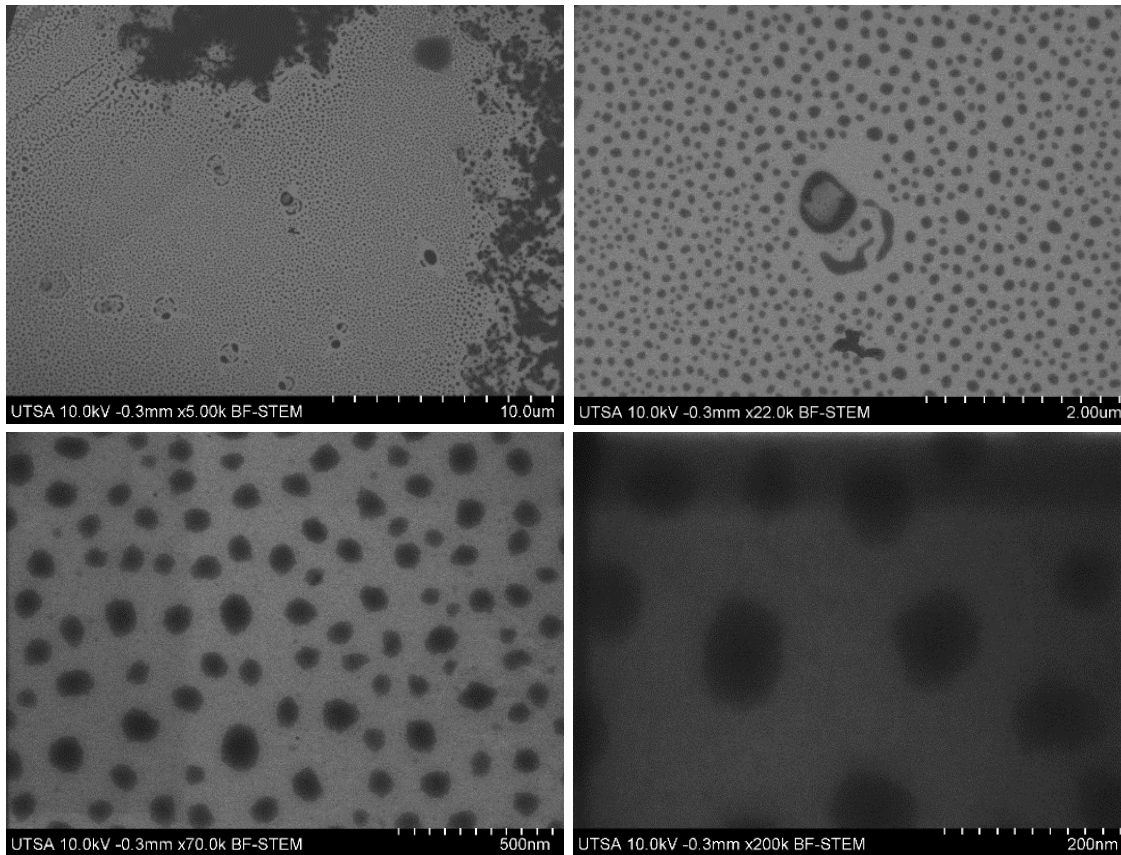


Figura 6–1. Micrografías electrónicas de transmisión con unidad de barrido (STEM) de las SLN.

De otro lado, la observación de la misma dispersión mediante TEM (Figura 6–2) en condiciones de baja dosis muestra partículas en forma de placas laminares de acuerdo con lo que se podría esperar a partir de los resultados previos. No obstante, la polidispersidad de la muestra parece ser mayor a la estimada mediante DLS. En este caso, debe considerarse que la preparación de la muestra produce la deshidratación de la dispersión provocando fenómenos de gelación y crecimiento inesperado del tamaño de las nanopartículas con el consecuente aumento de la polidispersión. Las manchas negras presentes tanto en las micrografías SEM y TEM corresponden al ácido fosfotúngstico usado como agente de tinción. La aglomeración del agente de tinción sugiere que su empleo podría no ser necesario o que se deben utilizar concentraciones menores al 2 %.

En consecuencia, y teniendo en cuenta que la observación directa de la forma de las nanopartículas de los sistemas abordados en este estudio no fue del todo satisfactoria, se recomienda profundizar a este respecto diseñando un protocolo de trabajo acorde a

la naturaleza de estas partículas, por ejemplo, mediante alguna de las varias técnicas de microscopía electrónica, de preferencia en alguna de las variantes criogénicas que permita la observación certera de las nanopartículas de las dispersiones estudiadas. Esto podría ayudar a comprobar la reducción en la anisotropía de las nanopartículas con la adición de un lípido líquido a la matriz lipídica además de obtener información adicional respecto a la cristalinidad mediante difracción de electrones *in situ* durante la observación de las muestras.

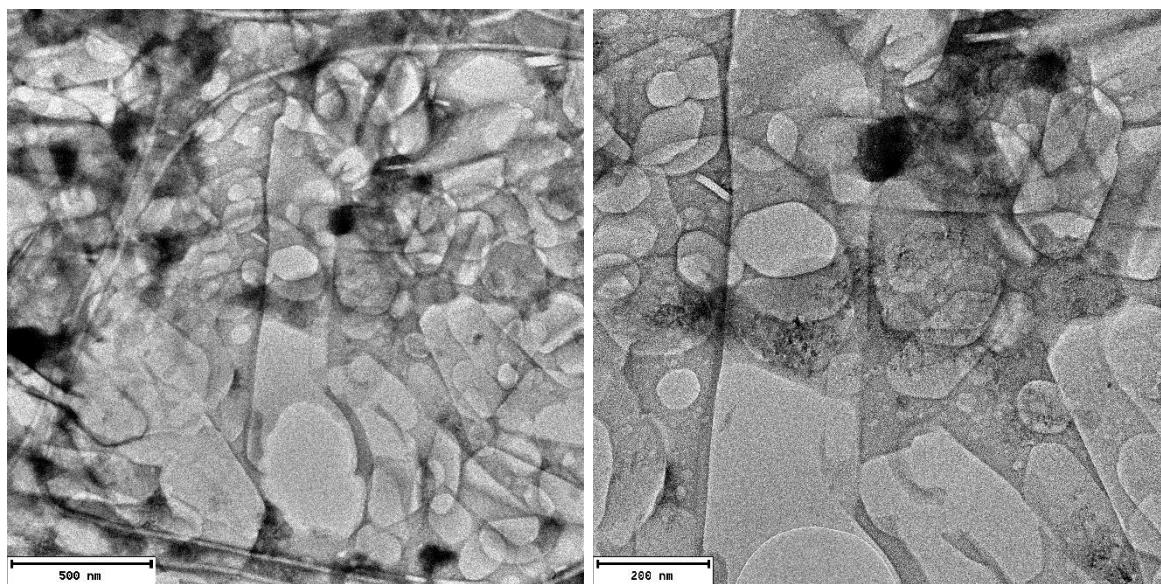


Figura 6-2. Micrografía electrónica de transmisión (TEM) en condiciones de baja dosis.

Adicionalmente, teniendo en cuenta que los resultados indican que las moléculas activas tienden a localizarse a nivel de superficie, sería interesante profundizar en el estudio de esta parte de la estructura de las nanopartículas usando herramientas más sofisticadas que podrían incluir el uso de resonancia magnética nuclear (Nuclear Magnetic Resonance, RMN) en sus diversas configuraciones, resonancia paramagnética electrónica, (Electron Paramagnetic Resonance, EPR), espectroscopía paraeléctrica (Parelectric Spectroscopy, PS), entre otras. Como una primera aproximación se podrían preparar este tipo de dispersiones con tamaños de partícula en el rango micrométrico que facilite la observación directa, por ejemplo, de moléculas etiquetadas mediante técnicas microscópicas de fluorescencia que permitan diferenciar tanto el agente estabilizante como las moléculas activas.

Respecto al comportamiento de liberación de los sistemas lipídicos, es importante señalar que, para efectos prácticos, los métodos de liberación *in vitro* deben desarrollarse con énfasis en el sitio de administración previsto, es decir, sobre la base del mecanismo de liberación *in vivo* (Larsen et al., 2013). En este sentido, se recomienda identificar medios de liberación y condiciones de ensayo biorelevantes, quizá mediante el empleo de enzimas tales como lipasas y colipasas (Olbrich et al., 2002a), bajo el entendido de que la liberación *in vivo* de fármacos a partir de sistemas lipídicos puede tener lugar mediante mecanismos de degradación enzimática. Respecto a la temperatura, se recomienda llevar a cabo estudios de liberación a 37 °C y a 32 °C (cuando se tiene prevista la aplicación dérmica) con el objetivo de evidenciar el efecto de la temperatura sobre la estructura de la partícula teniendo en cuenta los efectos de la adición de TCC en el comportamiento térmico de este tipo de sistemas.

También es importante ensayar otros métodos de liberación *in vitro* que descarten comportamientos de liberación distorsionados artificialmente (Washington, 1990). Los sistemas coloidales presentan desafíos especiales a este respecto. En particular, porque para evaluar la cantidad de activo liberada en sistemas coloidales, las partículas deben estar separadas de la fase dispersante. Esto debe ocurrir de manera rápida y eficiente, pero sin ninguna influencia en el comportamiento de liberación del sistema en estudio. Sin embargo, dicha separación es difícil de conseguir en el caso de partículas coloidales (Chidambaram y Burgess, 1999; Henriksen et al., 1995).

Por ejemplo, los métodos de liberación que se llevan a cabo mediante técnicas de diálisis o celdas de difusión a menudo conducen a comportamientos de liberación sostenidos ya que no proporcionan una dilución adecuada de las nanopartículas y a que la membrana limita el área de superficie disponible para el transporte desde el compartimiento donador hacia el compartimiento receptor (Chidambaram y Burgess, 1999; Levy y Benita, 1990; Washington, 1990).

De otro lado, en las metodologías más cercanas a “condiciones sink”, por ejemplo, filtración, centrifugación o el método de ultrafiltración/centrifugación (como el empleado en este trabajo de investigación) se requiere lograr una separación de las partículas rápida y limpia y además, tienen la desventaja de que la fuerza centrífuga necesaria para separar el ultrafiltrado de las nanopartículas puede alterar la integridad

de la dispersión, lo que resulta en un perfil de distribución de fase de fármaco diferente y que puede conducir a un incremento en la velocidad de liberación (Benita y Klang, 1998; Henriksen et al., 1995), sugiriendo que el perfil de liberación es controlado principalmente por procesos de partición, más que por el impedimento de la difusión de la molécula activa través de la matriz lipídica sólida (Bunjes, 2010) tal y como ocurrió en las dispersiones del presente estudio.

En este sentido, se podrían ensayar otros métodos de liberación, por ejemplo, técnicas de ultrafiltración a baja presión, ~ 0.05 MPa (Boyd, 2003; Magenheimer et al., 1993; Rosenblatt et al., 2007), extracción en fase sólida (Varache et al., 2020) o métodos *in situ* en los que no se requiere la separación del medio de liberación que contiene el fármaco, incluyendo método electroquímicos (Rosenblatt et al., 2007), métodos basados en fluoróforos (Chidambaram y Burgess, 1999) o incluso mediante espectroscopía Raman, siendo esta última más adecuada para moléculas como los parabenos porque permite la recolección directa de espectros vibracionales específicos de las moléculas en tiempo real sin necesidad de etiquetarlos (Lee et al., 2018).

Finalmente, este trabajo debería avanzar hacia el entendimiento de los mecanismos de liberación de las moléculas activas incorporadas en sistemas coloidales basados en lípidos. Además, se requiere investigar modificaciones en la estructura de las partículas, por ejemplo, mediante la generación de partículas híbridas o mediante la formación de estructuras lipídicas porosas, capaces de modular la liberación del activo.

A. Datos primarios para la estimación del tamaño medio de partícula

El tamaño medio de partícula estimado para las dispersiones se presenta en las Tablas A-1 a A-4. Los valores de Z-ave registrados corresponden al promedio de 5 determinaciones \pm la desviación estándar (S.D.). El valor registrado para el estándar secundario estuvo entre 341.5 nm \pm 3.50 nm. La diferencia entre el tamaño de partícula estimado en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ respecto al tamaño de partícula estimado en P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ fue de aproximadamente 20 nm y aparentemente, la diferencia es ligeramente mayor para las dispersiones preparadas con 100 % de MMM enfriadas a 4 °C.

Tabla A-1. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al primer mes de almacenamiento.

Historia térmica (4 °C), Mes 1									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
	TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D
0	247.0	1.707	0.159	0.019	270.3	2.938	0.163	0.019	23.3
10	209.9	2.622	0.081	0.032	231.2	1.901	0.092	0.023	21.3
20	204.2	2.665	0.069	0.014	224.6	1.879	0.06	0.024	20.4
30	203.4	2.387	0.083	0.022	224.5	5.873	0.072	0.032	21.1
40	203.4	1.766	0.069	0.011	224.6	2.217	0.079	0.019	21.2
50	195.3	2.98	0.065	0.016	212.5	3.079	0.080	0.025	17.2
60	195.3	2.725	0.07	0.041	214.6	2.265	0.066	0.041	19.3
70	203.2	3.107	0.055	0.028	219.4	4.354	0.085	0.021	16.2
80	203.7	1.27	0.08	0.013	223.1	3.054	0.078	0.024	19.4
90	204.2	1.24	0.098	0.025	224.2	1.894	0.099	0.033	20.0
100	199.5	3.359	0.072	0.021	219.8	3.171	0.057	0.011	20.3
Historia térmica (20 °C), Mes 1									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
	TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D
0	199.9	2.586	0.104	0.011	221.5	3.15	0.048	0.022	21.6
10	201.4	3.143	0.077	0.022	222.6	3.466	0.068	0.026	21.2
20	198.5	2.645	0.073	0.011	219.7	2.856	0.072	0.014	21.2
30	199.7	199.8	0.068	0.011	220.2	2.301	0.068	0.016	20.5
40	202.6	1.692	0.07	0.023	222.4	1.711	0.075	0.014	19.8
50	201.1	2.088	0.132	0.026	221.3	1.705	0.081	0.023	20.2
60	201.4	1.545	0.232	0.021	220.7	2.897	0.073	0.018	19.3
70	195.1	1.895	0.114	0.020	214.6	3.686	0.069	0.028	19.5
80	195.7	1.663	0.078	0.017	215.6	2.044	0.078	0.015	19.9
90	196.5	2.001	0.069	0.018	216.6	2.675	0.069	0.011	20.1
100	196.6	2.438	0.055	0.024	216.9	1.669	0.055	0.017	20.3

Tabla A-2. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 6 de almacenamiento.

Historia térmica (4 °C), Mes 6									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	*Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D.	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	238.5	1.840	0.126	0.025	262.0	3.112	0.139	0.019	23.5
10	198.3	2.885	0.056	0.033	219.1	2.562	0.082	0.025	20.8
20	199.6	2.054	0.075	0.027	219.5	2.745	0.059	0.035	19.9
30	194.1	0.759	0.054	0.014	213.9	1.438	0.084	0.019	19.8
40	200.6	2.250	0.137	0.021	219.5	2.428	0.081	0.024	18.9
50	198.1	2.603	0.059	0.014	219.3	1.542	0.077	0.03	21.2
60	195.9	3.125	0.067	0.013	215.1	1.566	0.065	0.044	19.2
70	200.1	2.485	0.072	0.018	220.4	4.137	0.061	0.026	20.3
80	198.8	1.646	0.066	0.005	219.1	2.024	0.07	0.024	20.3
90	200.2	4.694	0.067	0.037	220.0	0.073	0.073	0.013	19.8
100	201.3	2.698	0.063	0.03	222.0	2.204	0.053	0.026	20.7
Historia térmica (20 °C), Mes 6									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D.	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	199.5	1.348	0.05	0.028	222.2	2.001	0.049	0.015	20.3
10	196.4	1.118	0.074	0.038	222.3	3.346	0.044	0.016	20.2
20	199.1	1.35	0.063	0.013	224.8	4.416	0.061	0.037	20.3
30	195.1	2.483	0.068	0.026	221.7	5.962	0.059	0.027	20.1
40	198.1	1.553	0.012	0.012	224.4	1.333	0.077	0.025	20.8
50	195.4	3.355	0.061	0.012	227.15	2.775	0.080	0.022	20.4
60	195	2.152	0.06	0.024	223.7	2.601	0.077	0.025	19.8
70	198.9	2.203	0.064	0.010	223.8	3.773	0.082	0.033	22.3
80	199.6	1.638	0.065	0.017	218.2	4.285	0.062	0.029	21.4
90	201.6	1.798	0.066	0.026	230.4	1.863	0.065	0.029	28.1
100	194.3	2.512	0.059	0.019	222.5	4.732	0.062	0.027	19.3

Tabla A-3. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 12 de almacenamiento.

Historia térmica (4 °C), Mes 12									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	*Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D.	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	244.6	1.872	0.145	0.030	268.6	3.683	0.145	0.037	24.0
10	202.8	3.222	0.100	0.006	224.3	4.069	0.094	0.047	21.5
20	201.3	3.450	0.071	0.020	223.8	1.801	0.043	0.006	22.5
30	201.7	2.383	0.094	0.024	222.2	1.521	0.089	0.017	20.5
40	198.3	3.275	0.089	0.029	219.6	4.459	0.049	0.020	21.3
50	200.6	3.584	0.058	0.012	222.5	2.710	0.051	0.034	21.9
60	199.8	2.916	0.078	0.032	220.4	3.146	0.047	0.024	20.6
70	197.2	1.979	0.107	0.018	217.2	2.168	0.074	0.011	20
80	197.3	2.568	0.047	0.022	218.1	5.482	0.028	0.014	20.8
90	199.5	2.143	0.094	0.013	218.7	1.468	0.032	0.026	19.2
100	197.1	1.806	0.071	0.021	217.1	1.167	0.090	0.027	20.0
Historia térmica (20 °C), Mes 12									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D.	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	201.9	1.991	0.101	0.021	222.2	2.001	0.089	0.015	20.3
10	202.1	2.061	0.122	0.025	221.3	3.346	0.044	0.016	19.2
20	204.5	3.200	0.079	0.038	221.1	4.416	0.061	0.037	16.6
30	201.6	2.057	0.085	0.026	221.7	5.962	0.079	0.027	20.1
40	203.6	4.125	0.117	0.011	224.4	1.333	0.087	0.025	20.8
50	206.7	2.045	0.218	0.006	226.5	2.775	0.080	0.022	19.8
60	203.9	1.942	0.109	0.038	223.7	2.601	0.077	0.025	19.8
70	201.5	2.063	0.058	0.028	223.8	3.773	0.082	0.033	22.3
80	196.8	2.320	0.077	0.022	218.2	4.285	0.062	0.029	21.4
90	202.3	4.087	0.076	0.042	223.4	1.863	0.065	0.029	21.1
100	203.2	5.289	0.078	0.044	222.5	4.734	0.062	0.027	19.3

Tabla A-4. Z-Ave de las dispersiones de nanopartículas al mes 24 de almacenamiento.

Historia térmica (4 °C), Mes 24									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	242.7	3.347	0.135	0.019	266.0	3.908	0.167	0.021	23.3
10	202.3	2.260	0.078	0.026	223.9	3.257	0.093	0.018	21.6
20	198.1	1.482	0.076	0.021	219.4	2.475	0.066	0.028	21.3
30	198.6	1.240	0.084	0.030	219.3	2.079	0.096	0.029	20.7
40	197.4	1.761	0.074	0.017	218.3	0.9581	0.060	0.010	20.9
50	198.6	2.747	0.068	0.028	218.9	1.492	0.084	0.020	20.3
60	196.8	2.161	0.068	0.010	217.9	2.353	0.076	0.024	21.1
70	198.3	1.960	0.090	0.023	219.4	2.178	0.098	0.024	21.1
80	198.7	2.101	0.078	0.028	218.8	2.951	0.033	0.028	20.1
90	201.9	1.673	0.079	0.041	222.1	3.153	0.069	0.026	20.2
100	198.3	1.827	0.050	0.016	219.6	4.461	0.072	0.017	21.3
Historia térmica (20 °C), Mes 24									
%	NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				Diferencia
TCC	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)	S.D	PI	S.D	Z-Ave (nm)
0	196.6	1.940	0.083	0.015	219.0	1.968	0.088	0.039	22.4
10	198.2	2.726	0.077	0.027	218.1	2.467	0.083	0.029	19.9
20	198.5	9.038	0.157	0.042	218.7	2.879	0.081	0.028	20.2
30	197.8	0.802	0.066	0.031	215.8	3.838	0.092	0.021	18.0
40	199.8	1.121	0.074	0.010	218.6	2.523	0.063	0.037	18.8
50	196.6	1.401	0.080	0.011	215.4	3.733	0.093	0.019	18.8
60	197.1	1.988	0.091	0.015	216.9	1.055	0.042	0.026	19.8
70	198.9	1.92	0.226	0.011	217.1	1.722	0.072	0.033	18.2
80	194.3	1.958	0.129	0.024	214.5	1.052	0.089	0.024	20.2
90	196.4	1.152	0.076	0.032	216.4	1.571	0.080	0.022	20.0
100	196.7	2.273	0.036	0.027	215.2	3.204	0.089	0.023	18.5

*Los valores de Z-ave corresponden al promedio de 5 determinaciones \pm S.D. El valor medido para el estándar secundario estuvo entre $341.5 \text{ nm} \pm 3.50 \text{ nm}$, (mean \pm S.D., $n = 5$).

Por otro lado, el índice de refracción de la solución de P188 al 2.5 % p/v a 25 °C fue de 1.3348 ± 0.0005 ($n = 3$). Los datos para la estimación de la viscosidad dinámica, η , a partir de la viscosidad cinemática, ν , de acuerdo con la Ecuaciones A-1 y A-2 (ASTM, 2017), se muestran en la Tabla A-5, en donde la constante de calibración del viscosímetro, C , es de $0.01537 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-2}$ y t , es el tiempo de flujo de la solución de P188 al 2.5 % p/v en el capilar.

$$\nu = C \times t \quad \text{Ecuación A-1}$$

$$\eta = \nu \times \rho \times 10^{-3} \quad \text{Ecuación A-2}$$

Tabla A-5. Estimación de la viscosidad dinámica de la solución de P188 al 2.5 % p/v.

	t (s)	Viscosidad cinemática (mm ² · s ⁻¹)	Densidad (kg · m ⁻³)	Viscosidad dinámica (mPa · s)
	83.216	1.27903	1000.2	1.27929
	83.224	1.27915	1000.5	1.27979
	83.216	1.27903	1000.5	1.27967
Promedio	83.219	1.27907	1000.4	1.27958
S.D.	0.0046	0.00005	0.1732	0.00026

Los valores obtenidos para la densidad y la viscosidad dinámica de la solución del P188 al 2.5 % p/v son similares a los valores encontrados en la literatura, 1.000 kg · m⁻³ y 1.270 mPa · s, respectivamente para soluciones de P188 al 2.0 % a 25 °C (Q. Liu et al., 2011). Tanto el índice de refracción como la viscosidad dinámica son requeridas para estimar el tamaño medio de partícula y el potencial ζ por las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS) y microelectroforesis de láser Doppler.

B. Datos primarios para la caracterización de la matriz lipídica

B.1 Análisis térmico diferencial

Los datos obtenidos mediante el análisis térmico diferencial de las dispersiones se presentan en las Tablas B-1 a B-16. En la Tabla B-1 se presentan los valores para el inicio y la velocidad máxima del evento de fusión durante el calentamiento y el enfriamiento de las mezclas binarias de trimiristina + TCC.

Tabla B-1. Onset y peak de la trimiristina y las mezclas de trimiristina/TCC.

%TCC	Ciclo de calentamiento		Ciclo de enfriamiento					
	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset1 (°C)	Peak1 (°C)	Onset2 (°C)	Peak2 (°C)	Onset3 (°C)	Peak3 (°C)
0	55.51	58.59	31.56	27.52	—	—	—	—
10	55.15	57.98	31.11	26.46	-4.57	-7.98	-7.91	-15.1
20	53.98	57.51	30.42	25.61	-4.54	-7.95	-8.4	-15.3
30	52.40	56.67	29.90	24.00	-5.09	-8.28	-9.37	-15.5
40	51.31	55.73	28.49	20.47	-4.73	-8.11	-10	-15.59
50	48.34	53.75	26.6	18.78	-4.08	-7.63	-11.21	-15.78
60	45.79	51.93	24.64	14.71	-4.13	-8.07	-11.34	-15.85
70	42.85	50.38	22.54	12.10	-4.15	-7.79	-11.43	-15.86
80	39.96	46.91	19.12	9.36	—	—	-11.45	-15.89
90	34.94	43.85	15.39	4.29	—	—	-11.48	-15.89

Durante el ciclo de enfriamiento se detectaron tres eventos térmicos mientras que durante el ciclo de calentamiento se detectó solo uno para las mezclas de MMM/TCC. Es importante señalar que para la MMM pura se detecta un único evento térmico durante el ciclo de enfriamiento, lo que podría indicar que la formación de los eventos térmicos II y III es causada por la presencia del TCC. La proporción relativa de trimiristina en fase sólida de acuerdo con el diagrama de fases para la mezcla MMM/TCC de la Figura 4-9, se presenta en la Tabla B-2. Estos valores demuestran

que solo una parte de la trimiristina en la mezcla solidifica mientras que el resto se mantiene disuelta formando una fase líquida con el TCC.

Tabla B-2. Proporción relativa de trimiristina en fase sólida para las mezclas binarias MMM/TCCC.

MMM(χ_{masa})	Proporción relativa de las fases durante el ciclo de calentamiento*		Proporción relativa de las fases durante el ciclo de enfriamiento**	
	Fase sólida I	Fase líquida (MMM + TCC)	Fase sólida I	Fase líquida (MMM + TCC)
0.90	0.892	0.108	0.897	0.103
0.80	0.796	0.204	0.786	0.214
0.70	0.689	0.311	0.675	0.325
0.60	0.587	0.413	0.563	0.437
0.50	0.485	0.515	0.460	0.540
0.40	0.383	0.617	0.357	0.643
0.30	0.281	0.719	0.246	0.754
0.20	0.180	0.820	0.143	0.857
0.10	0.078	0.922	0.032	0.968

*Valores calculados a 20 °C.

**Valores calculados a 4 °C.

La cantidad relativa de las fases presentes en determinada mezcla de MMM+TCC se calcula a partir de la aplicación de la regla de reparto o regla de la palanca, a lo largo de una línea horizontal trazada a una temperatura fija. Para estimar la cantidad relativa de las fases durante la curva de calentamiento, la temperatura se fijó en 20 °C y para la curva de enfriamiento en 4 °C tratando de simular las condiciones de temperatura de la historia térmica. En la Tabla B-3 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la entalpía del evento de fusión durante el calentamiento teniendo en cuenta la cantidad relativa de trimiristina en la fase sólida de acuerdo con el diagrama de fases de la Tabla B-2.

Tabla B-3. Entalpías de fusión para las mezclas binarias MMM+TCC.

% MMM	Masa de mezcla (mg)	Masa corregida (mg)	*Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f (J · g ⁻¹)	** ΔH_f (kJ · mol ⁻¹)
100	5.7	5.7	-1207.2	-211.8	-153.2
90	8.1	7.2	-1546.8	-191.0	-154.8
80	6.2	4.9	-1063.2	-171.5	-155.7
70	20.3	14.0	-3065.2	-151.0	-158.6
60	28.3	16.6	-3714.0	-131.2	-161.7
50	24.7	12.0	-2745.1	-111.1	-165.7
40	19.8	7.6	-1785.3	-90.2	-170.1
30	20.1	5.7	-1380.0	-68.7	-176.4
20	30.2	5.4	-1410.1	-46.7	-188.0
10	19.8	1.5	-467.1	-24.0	-222.5

* El signo negativo indica que el evento de fusión es un proceso endotérmico.

** La masa molecular de la trimiristina es de 723.16 g · mol⁻¹.

En la Tabla B-4 se presentan los valores calculados para la entalpía de cristalización de los tres eventos térmicos encontrados durante el ciclo de enfriamiento.

Tabla B-4. Entalpía de cristalización para las mezclas binarias MMM+TCC.

**% MMM	Evento I			Evento II			Evento III			Suma ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)
	Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	* ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)	Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)	Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)	
100	1016.8	178.4	129.0	—	—	—	—	—	—	178.4
90	1517.5	187.3	151.1	14.3	1.8	1.42	57.9	7.1	5.8	196.3
80	1058.3	170.7	157.1	19.0	3.1	2.82	83.8	13.5	12.4	187.3
70	3006.1	159.1	158.7	80.8	4.3	4.27	350.9	18.6	18.5	181.9
60	3680.4	130.0	166.9	145.1	5.1	6.58	665.6	23.5	30.2	158.7
50	2685.8	108.7	170.8	110.3	4.5	7.01	1023.0	41.4	65.1	154.6
40	1801.2	91.0	184.2	65.6	3.3	6.71	1196.3	60.4	122.3	154.7
30	1391.5	69.2	203.5	40.4	2.0	5.91	1671.5	83.2	244.4	154.4
20	1451.6	48.1	243.3	—	—	—	3218.6	106.6	539.5	154.6
10	577.8	29.6	674.9	—	—	—	2437.45	125.0	2847.4	154.6

* Los valores de la masa corregida son los mismos de la Tabla B-3.

** El signo positivo indica que el evento de cristalización es un proceso exotérmico.

*** La masa molecular de la trimiristina es de $723.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Las temperaturas del comienzo y de máxima velocidad para las transiciones de fusión y de cristalización de las dispersiones de nanopartículas se presentan en la Tabla B-5.

Tabla B-5. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento.

% TCC	Ciclo de calentamiento		Ciclo de enfriamiento	
	Onset ($^{\circ}\text{C}$)	Peak ($^{\circ}\text{C}$)	Onset1 ($^{\circ}\text{C}$)	Peak ($^{\circ}\text{C}$)
0	51.24	55.27	13.83	12.34
10	50.90	54.58	11.43	9.88
20	49.27	53.23	9.32	7.86
30	47.19	51.75	7.47	6.04
40	45.64	50.54	5.14	3.63
50	46.70	50.46	*3.02	**1.51
60	—	—	0.30	-1.33
70	—	—	-3.34	-4.92
80	—	—	-7.83	-9.50

* Onset de la señal denotada por **a** en la Figura 4–12.

** Peak de la señal denotada por **b**.

Como en el caso anterior, se calcula la proporción relativa de trimiristina en fase sólida de acuerdo con el diagrama de fases para las dispersiones de nanopartículas de la Figura 4–13. Como era de esperar, solo una parte de la trimiristina en la matriz lipídica de las nanopartículas solidifica mientras que el resto se mantiene disuelta formando una fase líquida con el TCC. De la Tabla B-5 es evidente el aumento en la

temperatura de subenfriamiento de las dispersiones en comparación con la temperatura de subenfriamiento de las mezclas de MMM+TCC a granel, con una diferencia de aproximadamente 18 °C. Este comportamiento de la trimiristina garantiza que las dispersiones puedan mantenerse en estado líquido formando nanoemulsiones estables durante un largo periodo de tiempo.

Tabla B-6. Proporción relativa de trimiristina en fase sólida para las dispersiones lipídicas.

MMM (χ_{masa})	Proporción relativa de las fases durante el ciclo de calentamiento*		Proporción relativa de las fases durante el ciclo de enfriamiento**	
	Fase sólida I	Fase líquida (MMM + TCC)	Fase sólida I	Fase líquida (MMM + TCC)
0.90	0.896	0.104	0.893	0.107
0.80	0.799	0.201	0.781	0.219
0.70	0.694	0.306	0.674	0.326
0.60	0.597	0.403	0.567	0.433
0.50	0.493	0.507	0.461	0.539
0.40	—	—	0.348	0.652
0.30	—	—	0.242	0.758
0.20	—	—	0.129	0.871

* Valores calculados a 20 °C.

** Valores calculados a 4 °C.

Es importante señalar que las proporciones relativas de las fases sólida y líquida de las mezclas binarias y de las dispersiones lipídicas son prácticamente las mismas, lo que indica que el grado de cristalinidad de la trimiristina es independiente del tamaño medio de partícula. No obstante, la velocidad de nucleación, J , es diferente para las dispersiones puesto que depende del tamaño de las gotas fundidas y de la temperatura de enfriamiento.

En la Tabla B-7 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la entalpía del evento de fusión durante el calentamiento teniendo en cuenta la cantidad relativa de trimiristina en la fase sólida de acuerdo con el diagrama de fases de la Tabla B-6. Solo se muestran los valores hasta 50 % de MMM puesto que a proporciones mayores no se detecta el evento de fusión.

Tabla B-7. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas.

% MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	**** ΔH_{fn} (J · g ⁻¹)	***** ΔH_f (kJ · mol ⁻¹)
100	36.8	1.84	1.84	-306.94	-166.815	-120.634
90	36.1	1.81	1.62	-270.06	-149.618	-120.821
80	36.2	1.81	1.45	-239.80	-132.486	-119.985
70	36.4	1.82	1.26	-209.51	-115.115	-119.947
60	37.2	1.86	1.11	-176.57	-94.930	-114.988
50	33.8	1.69	0.83	-62.68	-37.089	-54.455

* La masa total de la dispersión en el crisol de muestra contiene 5 % de lípidos, por lo tanto, esta masa debe ser corregida de acuerdo con este porcentaje.

** El 5 % de lípidos en la dispersión debe ser corregido de acuerdo con la cantidad relativa de fase sólida presente en las nanopartículas obtenida a partir del diagrama de fases de la Figura 4–13.

*** El signo negativo indica que el evento de fusión es un proceso endotérmico.

**** ΔH_{fn} , corresponde al valor de la entalpía normalizado la fracción en masa de la fase lipídica (5 %).

***** La masa molecular de la trimiristina es de 723.16 g · mol⁻¹.

En la Tabla B-8 se presentan los valores calculados para la entalpía de cristalización de los tres eventos térmicos encontrados durante el ciclo de enfriamiento.

Tabla B-8. Entalpías de cristalización para las dispersiones lipídicas.

% MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f (J · g ⁻¹)	**** ΔH_f (kJ · mol ⁻¹)
100	36.8	1.84	1.84	181.43	71.31	71.31
90	36.1	1.81	1.61	217.26	87.04	97.45
80	36.2	1.81	1.41	205.87	82.25	105.33
70	36.4	1.82	1.23	183.05	72.73	107.89
60	37.2	1.86	1.06	156.43	60.82	107.19
50	33.8	1.69	0.78	115.05	49.23	106.87
40	36.7	1.84	0.64	95.27	37.55	107.79
30	36.5	1.83	0.44	65.91	26.12	108.11
20	36.5	1.83	0.24	35.67	14.13	109.39

* La masa total de la dispersión en el crisol de muestra contiene 5 % de lípidos, por lo tanto, esta masa debe ser corregida de acuerdo con este porcentaje.

** El 5 % de lípidos en la dispersión debe ser corregido de acuerdo con la cantidad relativa de fase sólida presente en las nanopartículas obtenidas a partir del diagrama de fases de la Figura 4–13.

*** El signo positivo indica que el evento de fusión es un proceso exotérmico.

**** La masa molecular de la trimiristina es de 723.16 g · mol⁻¹.

El índice de cristalinidad, CI , de las dispersiones lipídicas se muestra en la Tabla B-9 para tres posibilidades de cálculo diferentes. En la primera columna se presentan los valores estimados de acuerdo con la mayoría de los estudios consultados (Ecuación 3–9), es decir, teniendo en cuenta la fracción total, $\chi_{FL(masa)}$, de la fase lipídica (MMM y TCC). En la segunda columna se incluyen los valores calculados teniendo en cuenta

solo la fracción de trimiristina presente en la dispersión y en la tercera columna, se reportan los valores obtenidos teniendo en cuenta la cantidad relativa de trimiristina presente en las nanopartículas calculada a partir del diagrama de fases de la Figura 4-13.

Tabla B-9. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas.

%TCC	Índice de cristalinidad (%)		
	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)} \times \chi_{LS(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{f(MMM)}} \times 100$
0	79.26	79.26	79.26
10	71.11	78.99	79.38
20	62.95	78.69	78.83
30	54.70	78.14	78.81
40	45.10	75.17	75.55
50	17.62	35.25	35.78

$\Delta H_{fn(NP)}$, corresponde a la entalpía de fusión normalizada de las nanopartículas y se calcula dividiendo el área bajo la curva entre la masa total de la dispersión en el crisol.

$$\Delta H_{fn(MMM)} = 210.46 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$\Delta H_{f(MMM)} = 152.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Las temperaturas del comienzo y de máxima velocidad para las transiciones de fusión y de cristalización de las dispersiones de nanopartículas con MP y PP se presentan en la Tabla B-10.

Tabla B-10. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas con MP y PP.

%TCC	Metilparabeno				Propilparabeno			
	Ciclo de calentamiento		Ciclo de enfriamiento		Ciclo de calentamiento		Ciclo de enfriamiento	
	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset1 (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset1 (°C)	Peak (°C)
0	50.85	54.82	11.29	9.83	50.74	53.68	11.24	9.45
10	49.76	52.97	9.22	7.76	49.34	52.46	8.95	7.1
20	48.15	51.75	7.19	5.67	48.00	51.31	6.92	5.17
30	47.13	50.61	5.20	3.74	47.08	50.79	4.39	2.63
40	48.87	51.65	6.32	4.43	48.16	51.81	2.15	0.37
50	—	—	-0.37	-1.81	—	—	-0.85	-2.49
60	—	—	-3.51	-5.09	—	—	-4.25	-6.03
70	—	—	-7.76	-9.53	—	—	-8.22	-10.05
80	—	—	-12.86	-14.72	—	—	-13.03	-14.81

* Onset de la señal denotada por **a** en la Figura 4-27.

** Peak de la señal denotada por **b**

En la Tabla B-11 se presentan los datos de proporción relativa de trimiristina en fase sólida de acuerdo con el diagrama de fases de la Figura 4-28 para las dispersiones de

nanopartículas con MP y PP. La incorporación de las moléculas de parabenos no afecta el comportamiento cristalino de las dispersiones sin parabenos.

Tabla B-11. Proporción relativa de la trimiristina en fase sólida para las dispersiones lipídicas con MP y PP.

MMM (χ_{masa})	Metilparabeno				Propilparabeno			
	Proporción relativa de las fases durante el ciclo de calentamiento*		Proporción relativa de las fases durante el ciclo de enfriamiento**		Proporción relativa de las fases durante el ciclo de calentamiento*		Proporción relativa de las fases durante el ciclo de enfriamiento**	
	Fase sólida I	Fase líquida (MMM+TCC)	Fase sólida I	Fase líquida (MMM+TCC)	Fase sólida I	Fase líquida (MMM+TCC)	Fase sólida I	Fase líquida (MMM+TCC)
0.90	0.888	0.112	0.879	0.121	0.887	0.113	0.877	0.123
0.80	0.787	0.213	0.776	0.224	0.782	0.218	0.730	0.200
0.70	0.685	0.315	0.667	0.333	0.677	0.323	0.680	0.320
0.60	0.618	0.382	0.521	0.479	0.564	0.436	0.541	0.459
0.50	0.455	0.545	0.394	0.606	0.451	0.549	0.385	0.615
0.40	—	—	0.279	0.721	—	0.654	0.266	0.734
0.30	—	—	0.176	0.824	—	0.759	0.164	0.836
0.20	—	—	0.091	0.909	—	0.872	0.074	0.926

En la Tabla B-12 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la entalpía de los eventos de fusión durante el calentamiento de las dispersiones lipídicas con MP y PP teniendo en cuenta la cantidad relativa de trimiristina en la fase sólida de acuerdo con la zona metaestable de sobresaturación de la Figura 4–28. Solo se muestran los valores hasta 60 % de MMM puesto que a proporciones mayores no se detecta el evento de fusión.

Tabla B-12. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas con MP y PP.

% MMM	Metilparabeno					
	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	**** ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)
100	36.7	1.84	1.84	-306.61	-120.83	-120.83
90	35.9	1.59	1.62	-265.49	-106.96	-120.50
80	37.1	1.46	1.45	-242.57	-94.56	-120.23
70	36.7	1.26	1.26	-207.8	-81.89	-119.48
60	36.9	1.14	1.11	-110.54	-43.33	-70.11
% MMM	Propilparabeno					
	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	**** ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)
100	41.5	2.08	2.08	-349.49	-121.801	-121.801
90	38.6	1.93	1.71	-287.60	-107.762	-121.461
80	38.5	1.93	1.51	-250.24	-94.007	-120.221
70	36.6	1.83	1.24	-199.53	-78.848	-116.520
60	37.0	1.85	1.04	-80.66	-31.530	-55.913

* La masa total de la dispersión en el crisol de muestra contiene 5 % de lípidos, por lo tanto, esta masa debe ser corregida de acuerdo con este porcentaje.

** El 5 % de lípidos en la dispersión debe ser corregido de acuerdo con la cantidad relativa de fase sólida presente en las nanopartículas obtenida a partir del diagrama de fases de la Figura 4-27.

*** El signo negativo indica que el evento de fusión es un proceso endotérmico.

**** La masa molecular de la trimiristina es de $723.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

En la Tabla B-13 se presentan los valores calculados para la entalpía de cristalización de los eventos térmicos durante el ciclo de enfriamiento de las dispersiones con MP y PP.

Tabla B-13. Entalpías de cristalización para las dispersiones lipídicas con MP y PP.

Metilparabeno						
% MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_c ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	**** ΔH_c ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
100	36.7	1.84	1.84	202.55	79.82	79.82
90	35.9	1.80	1.58	226.89	91.41	104.02
80	37.1	1.86	1.44	220.50	85.96	110.81
70	36.7	1.84	1.22	186.60	73.54	110.31
60	36.9	1.85	0.96	146.45	57.40	110.13
50	39.8	1.99	0.78	119.87	43.56	110.58
40	37.0	1.85	0.52	79.04	30.90	110.82
30	36.9	1.85	0.32	51.00	19.99	113.74
20	36.7	1.84	0.17	30.34	11.96	131.52
Propilparabeno						
% MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_c ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$)	**** ΔH_c ($\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$)
100	41.5	2.08	2.08	243.87	84.99	84.99
90	38.6	1.93	1.69	248.59	93.15	106.20
80	38.5	1.93	1.40	216.10	81.18	111.28
70	36.6	1.83	1.25	189.39	74.84	110.01
60	37.0	1.85	1.00	154.12	60.25	111.36
50	39.8	1.99	0.77	119.12	43.29	112.36
40	36.9	1.85	0.49	76.63	30.04	112.75
30	36.6	1.83	0.30	50.11	19.80	120.79
20	28.47	1.84	0.14	28.47	11.22	152.09

* La masa total de la dispersión en el crisol de muestra contiene 5 % de lípidos, por lo tanto, esta masa debe ser corregida de acuerdo con este porcentaje.

** El 5 % de lípidos en la dispersión debe ser corregido de acuerdo con la cantidad relativa de fase sólida presente en las nanopartículas obtenidas a partir del diagrama de fases de la Figura 4-27.

*** El signo positivo indica que el evento de fusión es un proceso exotérmico.

**** La masa molecular de la trimiristina es de $723.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

El índice de cristalinidad, CI , de las dispersiones lipídicas con MP y PP se muestra en la Tabla B-14 para tres posibilidades de cálculo diferentes. En la primera columna se incluyen los valores calculados de acuerdo con la mayoría de los estudios consultados (Ecuación 3-9). En la segunda columna se reportan los valores calculado teniendo en cuenta solo la cantidad de lípidos (sólidos y líquidos) presentes en la

dispersión y en la tercera columna se presentan los valores obtenidos teniendo en cuenta la cantidad relativa de lípidos sólidos presentes en las nanopartículas.

Tabla B-14. Índice de cristalinidad de las dispersiones lipídicas con MP y PP.

% TCC	Metilparabeno		
	Índice de cristalinidad (%)		
	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)} \times \chi_{LS(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)}} \times 100$
0	109.78	109.78	79.39
10	97.31	107.98	79.17
20	84.26	105.32	78.80
30	74.40	106.29	78.50
40	39.37	65.61	46.07

% TCC	Propilparabeno		
	Índice de cristalinidad (%)		
	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)} \times \chi_{FL(masa)} \times \chi_{LS(masa)}} \times 100$	$CI(\%) = \frac{\Delta H_{fn(NP)}}{\Delta H_{fn(MMM)}} \times 100$
0	110.67	110.66	80.03
10	98.037	108.79	79.81
20	83.76	104.70	78.99
30	71.64	102.34	76.56
40	28.65	47.75	36.74

$\Delta H_{fn(NP)}$, corresponde a la entalpía de fusión normalizada de las nanopartículas y se calcula dividiendo el área bajo la curva entre la masa total de la dispersión en el crisol.

$$\Delta H_{fn(MMM)} = 210.46 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$$

$$\Delta H_{f(MMM)} = 152.2 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Las temperaturas del comienzo y de máxima velocidad para las transiciones de fusión a alta presión (HP-DSC) de las dispersiones de nanopartículas con metilparabeno y propilparabeno se reportan en la Tabla B-15.

Tabla B-15. Onset y peak de las dispersiones de nanopartículas durante los ciclos de calentamiento.

%TCC	Ciclo de calentamiento			
	Metilparabeno		Propilparabeno	
	Onset (°C)	Peak (°C)	Onset (°C)	Peak (°C)
0	52.41	55.67	52.41	55.67
10	50.62	54.45	50.62	54.28
20	49.45	53.46	49.45	53.46
30	48.09	52.21	48.09	52.21
40	49.44	52.56	49.44	52.73

En la Tabla B-16 se presentan los datos necesarios para el cálculo de la entalpía de los eventos de fusión durante el calentamiento de las dispersiones lipídicas con MP y

PP sin tener en cuenta la cantidad relativa de trimiristina debido a que solo se obtuvieron los termogramas de las dispersiones durante el calentamiento.

Tabla B-16. Entalpías de fusión para las dispersiones lipídicas con MP y PP obtenidas mediante HP-DSC.

Metilparabeno						
%MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	**** ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)
100	36.0	1.80	1.80	-309.47	-124.33	-124.33
90	36.3	1.82	1.63	-277.85	-110.71	-123.01
80	36.3	1.82	1.45	-245.73	-97.91	-122.38
70	34.8	1.74	1.22	-200.95	-83.52	-119.31
60	36.1	1.81	1.08	-110.79	-44.39	-73.98
Propilparabeno						
%MMM	Masa de la dispersión (mg)	*Masa corregida al 5 % (mg)	**Masa corregida	***Área bajo la curva (mJ)	ΔH_f ($J \cdot g^{-1}$)	**** ΔH_f ($kJ \cdot mol^{-1}$)
100	36.4	1.82	1.82	-305.97	-121.574	-121.574
90	36.8	1.84	1.66	-267.85	-105.271	-116.968
80	36.7	1.84	1.47	-238.73	-94.082	-117.602
70	34.2	1.71	1.20	-197.95	-83.713	-119.590
60	36.5	1.83	1.10	-85.79	-33.994	-56.657

* La masa total de la dispersión en el crisol de muestra contiene 5 % de lípidos, por lo tanto, esta masa debe ser corregida de acuerdo con este porcentaje.

** En este caso, dado que no se tienen los eventos térmicos durante el enfriamiento, el 5 % de lípidos en la dispersión no puede ser corregido con respecto a la cantidad relativa. Por lo tanto, los valores calculados corresponden al cálculo a partir de la fracción en masa de la trimiristina en cada dispersión.

*** El signo positivo indica que el evento de fusión es un proceso endotérmico.

**** La masa molecular de la trimiristina es de $723.16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Los valores para la densidad de las dispersiones lipídicas se presentan en la Tabla B-17. La densidad se midió por triplicado para cada dispersión enfriada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Tabla B-17. Densidad de las dispersiones lipídicas.

%TCC	Densidad de las nanosuspensiones (g/mL)					Densidad de las nanoemulsiones (g/mL)				
	R1	R2	R3	\bar{x}	S.D.	R1	R2	R3	\bar{x}	S.D.
0	1.0020	1.0020	1.002	1.0020	0.00000	0.9966	0.9967	0.9967	0.9967	0.00006
10	1.0019	1.0018	1.0019	1.0019	0.00006	0.9969	0.9969	0.9970	0.9969	0.00006
20	1.0016	1.0016	1.0017	1.0016	0.00006	0.9971	0.9971	0.9971	0.9971	0.00000
30	1.0011	1.0012	1.0011	1.0011	0.00006	0.9973	0.9971	0.9972	0.9972	0.00010
40	1.0008	1.0007	1.0008	1.0008	0.00006	0.9975	0.9975	0.9975	0.9975	0.00000
50	1.0002	1.0001	1.0002	1.0002	0.00006	0.9976	0.9976	0.9976	0.9976	0.00000
60	0.9977	0.9977	0.9977	0.9977	0.00000	0.9977	0.9977	0.9977	0.9977	0.00000
70	0.9978	0.9978	0.9978	0.9978	0.00000	0.9978	0.9977	0.9978	0.9978	0.00006
80	0.9980	0.9980	0.998	0.9980	0.00000	0.9981	0.9980	0.9981	0.9981	0.00006
90	0.9982	0.9982	0.9982	0.9982	0.00000	0.9982	0.9982	0.9982	0.9982	0.00000
100	0.9983	0.9983	0.9984	0.9983	0.00006	0.9981	0.9983	0.9983	0.9982	0.00012

La densidad del P188 al 2.5 % p/v es de $1000.4 \pm 0.1732 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Tabla A-5).

B.2 Difracción de rayos X

Los valores para los difractogramas del P188, de la trimiristina, el metilparabeno y el propilparabeno se presentan en las Tablas B-18 a B-21.

Tabla B-18. Señales de difracción para el P188.

No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]	No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]
1	14.5491	6.08840	237.65	3.85	12	36.2121	2.48068	815.59	5.87
2	15.0468	5.88811	152.92	3.30	13	39.3821	2.28800	619.9	3.34
3	19.0902	4.64914	6264.24	95.40	14	41.1166	2.19540	164.65	0.89
4	23.3121	3.81584	22403.63	100.0	15	42.8247	2.11171	566.49	2.29
5	26.0604	3.41933	1571.61	9.25	16	44.8178	2.02232	289.59	2.34
6	26.9174	3.31237	861.29	7.96	17	45.3924	1.99805	383.31	2.48
7	27.8176	3.20719	401.27	2.89	18	47.3356	1.92046	339.52	2.44
8	30.7887	2.90174	40.68	1.11	19	48.759	1.86768	410.14	2.95
9	32.3471	2.76770	22.79	0.30	20	49.9319	1.82652	341.13	2.21
10	32.8030	2.73027	31.45	0.51	21	53.2959	1.71890	158.40	0.85
11	35.1940	2.55007	641.89	4.15	22	54.2107	1.69203	88.24	0.57

*cps: cuentas por segundo

El difractograma del P188 (Tabla B-11) se caracteriza por dos señales muy anchas lo que demuestra su baja cristalinidad. Por el contrario, el difractograma de la trimiristina (Tabla B-19) se caracteriza por más de 16 señales bien definidas, la mayoría concentradas en la región de 16 a 26 de 2°θ. Sin embargo, la señal en 7.4 de 2°θ es característica de los triglicéridos saturados y puede ser usada con motivos de identificación.

Tabla B-19. Señales de difracción para la trimiristina.

No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]	No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]
1	7.4080	11.9336	317.56	13.12	13	25.1217	3.54493	594.36	10.52
2	16.5232	5.36516	790.90	21.78	14	27.2050	3.27801	175.70	2.18
3	16.8545	5.26044	1408.88	17.46	15	34.8953	2.57121	764.60	7.89
4	17.5346	5.05792	563.13	11.63	16	38.1871	2.3568	270.53	3.35
5	19.2830	4.60309	3631.79	100.00	17	39.3620	2.28912	228.20	2.83
6	19.5032	4.55161	2232.92	61.48	18	40.0087	2.25360	297.81	3.08
7	19.9822	4.44357	965.04	21.74	19	41.0776	2.19739	512.70	2.89
8	21.1054	4.20955	419.25	6.49	20	42.2956	2.13689	178.75	2.21
9	22.0414	4.03287	912.48	17.39	21	42.9001	2.10817	257.46	2.90
10	23.2067	3.83293	4586.58	75.77	22	43.8753	2.06355	632.65	6.53
11	24.0924	3.69399	5214.15	86.14	23	46.6365	1.94761	362.14	3.74
12	24.5468	3.62663	950.47	16.82	24	47.5352	1.91286	258.03	2.28

Las señales usadas para la identificación del polimorfismo en la trimiristina pura o en las dispersiones son las correspondientes a las posiciones 19.2830 [2°θ], 23.2067 [2°θ] y 24.0924 [2°θ].

En la Tabla B-20 se presentan las señales de difracción para el metilparabeno y en la Tabla B-21 para el propilparabeno.

Tabla B-20. Señales de difracción para el metilparabeno.

No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]	No.	Pos. [2°θ]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]
1	13.1112	6.75269	817.84	9.00	15	25.2753	3.52373	5961.09	39.36
2	13.6036	6.50937	199.14	2.19	16	25.9164	3.438	561.68	7.42
3	13.8434	6.39712	452.24	5.97	17	26.2121	3.39988	6099.38	36.61
4	13.9679	6.34039	564.94	6.22	18	27.2955	3.26735	781.54	7.37
5	16.1551	5.48657	274.57	2.59	19	27.6518	3.22605	2172.37	23.91
6	16.8013	5.27699	626.45	8.27	20	36.4497	2.46301	1631.54	13.07
7	16.9569	5.22893	5195.43	57.17	21	36.562	2.45570	7947.13	79.59
8	17.0477	5.20127	3920.26	51.77	22	36.6461	2.45229	6057.98	100
9	17.3576	5.10910	481.75	3.98	23	42.6778	2.11688	357.57	2.86
10	17.8387	4.97238	341.98	2.82	24	43.3853	2.08399	273.86	2.74
11	18.3011	4.84776	997.15	10.97	25	43.9306	2.05938	463.45	3.71
12	21.3035	4.17086	2636.78	21.76	26	51.8053	1.76333	357.67	2.87
13	24.8986	3.57618	1183.00	19.53	27	52.0067	1.75697	765.93	3.84
14	25.0659	3.55268	2623.23	43.3	28	52.1389	1.75718	403.19	3.23

Tabla B-21. Señales de difracción para el propilparabeno.

No.	Pos. [2°q.]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]	No.	Pos. [2°q.]	d-espaci. [Å]	Área [cts*[2°θ]	Int. Rel. [%]
1	10.0268	8.82194	1141.12	7.51	16	21.2452	4.18217	384.89	5.07
2	10.5657	8.37316	343.61	3.02	17	23.3382	3.81162	368.28	4.85
3	11.0909	7.97782	2293.34	22.64	18	23.7049	3.7535	719	11.36
4	12.7984	6.91703	188.13	2.48	19	24.1688	3.68248	3855.46	25.38
5	15.2509	5.80978	283.04	2.79	20	24.7433	3.59828	1185.65	9.37
6	15.6500	5.66251	817.95	7.18	21	25.5037	3.48979	16694.95	100
7	15.9944	5.54135	815.87	9.21	22	25.6084	3.48441	5213.14	62.45
8	16.3643	5.41692	2474.62	39.09	23	26.3382	3.38109	1351.36	6.48
9	16.5755	5.34837	2421.21	21.25	24	26.5492	3.35469	800.28	9.59
10	19.5558	4.53948	1086.31	9.15	25	27.4431	3.24742	1466.98	7.03
11	19.7125	4.50374	444.86	9.53	26	27.6904	3.21897	1261.35	12.09
12	20.1107	4.41546	499.44	5.02	27	32.822	2.72647	415.15	4.97
13	20.3196	4.37054	595.19	4.93	28	33.421	2.67897	1331.6	3.19
14	20.6959	4.29191	675.13	6.72	29	50.3081	1.81224	1629.26	15.61
15	20.8796	4.25457	1086.31	7.62	30	50.4358	1.80795	1462.8	14.02

B.3 Espectrometría Raman

Los valores de intensidad para las vibraciones Raman características de la trimiristina, el TCC, el metil y el propilparabeno se presentan en la Tabla B-22.

Tabla B-22. Bandas Raman características con sus asignaciones.

MMM			P188			MP			PP		
cm ⁻¹	I	Asignación	cm ⁻¹	I	Asignación	cm ⁻¹	I	Asignación	cm ⁻¹	I	Asignación
2881.8	0.283	v _{as} (=CH ₃)	2887.3	0.181	v(CH)	3080.6	0.018	O-H	1668.3	0.466	v(C=O)
2846.4	0.165	v _s (=CH ₂)	1480.3	0.858	H-C-H	3064.0	0.008	O-H	1608.4	1	v(C=O)
1895.0	0.014	v(C=O)	1280.2	0.919	H-C-H	2968.8	0.015	O-CH ₃	1590.5	0.359	v(C=O)
1775.7	0.043	v(C=O)	1232.4	0.632	H-C-H	1688.7	0.359	v(C=O)	1476.1	0.018	CH ₂ -CH ₂
1744.6	0.122	v(C=O)	1142.0	0.601	v(C-C)	1676.7	0.427	v(C=O)	1450.3	0.090	CH ₂ -CH ₂
1730.5	0.071	v(C=O)	1127.1	0.415	v(C-C)	1609.1	0.477	v(C=O)	1438.0	0.1	CH ₃
1463.2	0.500	β(CH ₂ /CH ₃)	1063.1	0.345	v(C-C)	1589.9	0.650	v(C=O)	1394.5	0.084	CH ₃
1439.9	0.742	α(CH ₂ /CH ₃)	926.8	0.216	r(CH ₃)	1454.0	0.077	CH ₃	1376.2	0.060	O(CH ₂) ₂
1296.4	1	τ(CH ₂)	855.6	0.766	r(CH ₃)	1433.1	0.063	CH ₃	1361.1	0.042	O(CH ₂) ₂
1178.5	0.111	v(C-C)	840.9	1	C-O-C	1311.3	0.185	C-C-H	1318.3	0.265	O(CH ₂) ₂ CH ₃
1129.1	0.945	v(C-C)	581.3	0.225	C-C-C	1282.1	0.965	C-C-O	1276.3	0.725	v(C=O)
1094.9	0.231	v(C-C)	534.7	0.245	C-C-C	1161.7	0.401	C-C-O	1229.1	0.151	v(C=O)
1062.4	0.912	v(C-C)	362.5	0.445	CH ₂ -CH	853.5	1	Ph(C-H)	1172.4	0.478	v(C=O)
885.6	0.344	C-O-C	278.7	0.963	CH ₂ -CH ₂	637.0	0.466	Ph(C-H)	913.3	0.275	Ph(C-H)
416.0	0.116	C-C-O				348.0	0.195	Ph(C-H)	857.0	0.641	Ph(C-H)
						335.1	0.171	Ph(C-H)	637.8	0.200	Ph(C-H)
						326.9	0.214	Ph(C-H)	314.7	0.174	Ph(C-H)
						311.5	0.365	C-C-O	282.8	0.226	C-C-O

v: estiramiento (stretching), r: balanceo (rocking), α: tijera (scissoring), Ph: fenil: τ: giro (twisting), s: simétrico, as: asimétrico

C. Datos primarios para la caracterización de las propiedades de superficie

C.1 Estimación del potencial zeta

Los valores de pH registrados para las dispersiones almacenadas a 4 °C y a 20 °C respectivamente, se presentan en la Tabla C-1 y en la Figura C-1.

Tabla C-1. Valores de pH de las dispersiones de lípidos durante el almacenamiento.

Historia térmica (4 °C)												
%	Original				NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
TCC	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24
0	4.23	4.32	4.24	4.43	4.65	4.84	4.78	5.01	6.31	6.12	6.37	6.12
10	4.35	4.49	4.22	4.18	4.35	5.02	4.74	4.93	5.84	6.45	6.32	6.05
20	4.01	4.21	4.44	4.51	4.86	5.12	4.97	4.64	6.12	6.34	6.31	6.16
30	4.18	4.15	4.41	4.20	4.98	4.65	4.8	4.88	6.25	6.02	6.31	6.23
40	4.19	4.09	4.38	4.48	4.52	4.28	4.86	5.16	6.35	6.62	6.36	6.17
50	4.19	4.12	4.15	4.20	5.23	4.41	4.49	4.77	6.19	6.45	6.33	6.05
60	4.14	4.13	4.19	4.01	4.85	5.23	4.47	4.67	6.21	6.16	6.36	5.87
70	4.39	4.02	4.09	3.97	4.65	4.64	4.77	4.8	5.87	6.25	6.25	6.01
80	4.11	3.95	4.21	3.98	4.78	4.87	4.76	4.73	6.1	6.21	6.34	5.73
90	4.08	4.05	3.85	4.02	4.97	4.73	4.77	4.68	6.02	5.87	6.29	6.15
100	4.13	3.98	4.12	3.97	4.96	4.62	4.58	5.13	5.75	6.01	6.31	6.25
\bar{x}	4.18	4.14	4.21	4.18	4.80	4.77	4.73	4.86	6.09	6.23	6.33	6.07
Historia térmica (20 °C)												
%	Original				NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$				P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$			
TCC	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24	Mes 1	Mes 6	Mes 12	Mes 24
0	4.37	4.18	4.22	4.49	4.39	4.69	4.77	5.49	6.19	6.41	6.42	6.35
10	4.29	4.31	4.24	4.15	4.78	4.61	4.87	4.98	6.12	6.25	6.23	6.22
20	4.47	4.27	4.38	4.49	4.65	4.41	4.75	5.19	6.23	5.98	5.95	6.42
30	4.26	4.49	4.15	4.38	4.51	4.02	5.03	5.12	5.95	5.94	6.12	6.18
40	4.01	4.34	4.44	4.18	5.26	4.37	5.12	4.84	6.36	6.28	6.02	6.21
50	4.33	4.06	4.15	4.32	4.74	4.67	4.62	4.68	6.28	6.41	5.87	6.02
60	4.35	4.08	4.25	4.49	4.89	4.25	4.65	4.78	5.86	6.45	6.01	6.18
70	4.11	4.05	4.31	3.98	4.98	5.45	4.42	5.03	5.98	5.84	6.34	6.21
80	3.61	3.92	4.09	4.35	5.03	5.12	4.87	5.08	6.42	5.69	5.87	6.13
90	4.23	4.15	4.11	4.05	4.52	4.43	4.42	4.25	6.39	6.15	6.08	6.08
100	3.83	4.05	4.24	3.75	4.63	4.98	4.42	4.94	6.38	6.38	6.12	6.18
\bar{x}	4.17	4.17	4.24	4.24	4.76	4.64	4.72	4.94	6.20	6.16	6.09	6.20

Durante los dos años de almacenamiento no se evidenciaron cambios significativos en los valores del pH de las dispersiones lo que puede significar elevada estabilidad química de las nanopartículas en el tiempo. Como se muestra en la Figura C-1 el pH aumenta desde aproximadamente 4.16 en la dispersión original hasta 4.75 en soluciones de NaCl y 6.15 en diluciones de P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente.

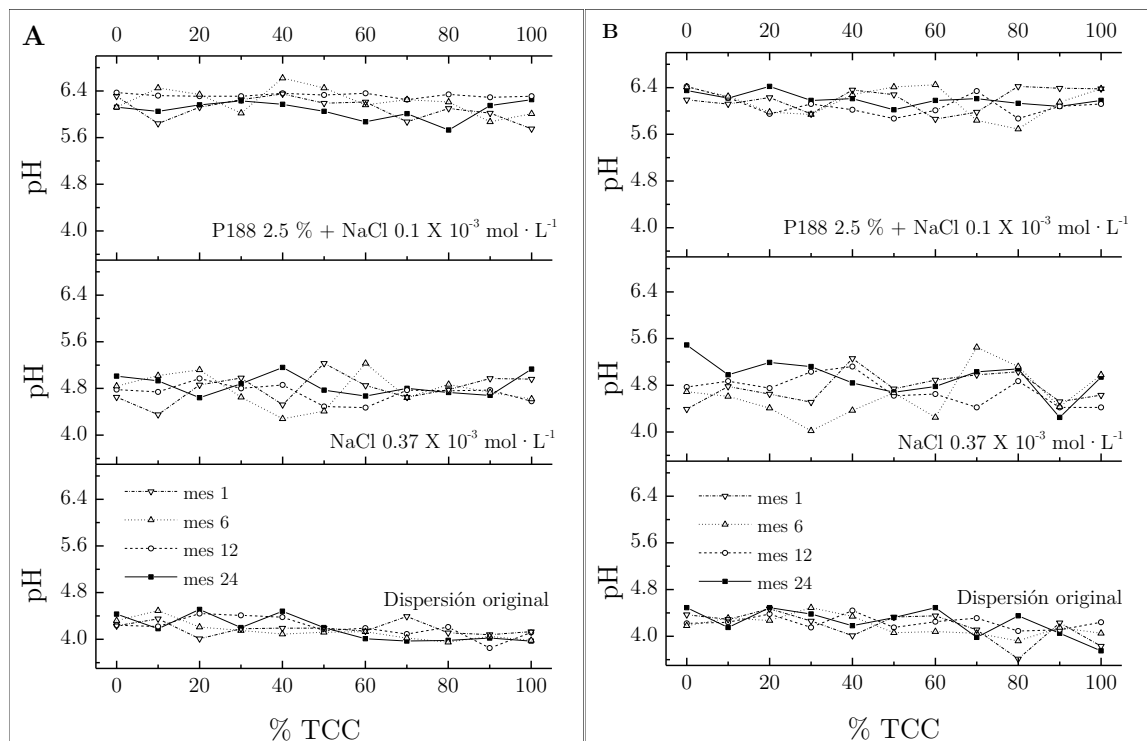


Figura C-1. Efecto de la concentración de TCC sobre el pH de las dispersiones.

A: pH de las dispersiones enfriadas a 4 °C y en B: pH de las dispersiones enfriadas a 20 °C. Las dispersiones fueron diluidas en solución acuosa de NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en solución de P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Este aumento del pH puede ser atribuido a la presencia de ácido acético en el acetato de etilo usado como solvente para la preparación de las dispersiones lipídicas (pH del agua saturada con acetato de etilo: 3.74 ± 0.032). Además, a la disociación de los ácidos grasos libres presentes en los lípidos de la matriz (triglicérido cáprico/caprílico y trimiristina, $\text{pK}_a \sim 4.9$). Aunque el pH de las dispersiones se mantiene sin cambios durante el almacenamiento, las diferencias observadas en las dispersiones diluidas en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ y en P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

pueden ser atribuidas al grado de disociación de los grupos ácidos en el medio de dilución, siendo mayor en NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ que en P188 al 2.5 % p/v + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

El pH de las dispersiones cargadas con metilparabeno y propilparabeno presenta esencialmente el mismo comportamiento (Tabla C-2 y Figura C-2). En adición, no se observan diferencias en los valores de pH para las dispersiones cargadas con metil y propilparabeno.

Tabla C-2. Valores de pH de las dispersiones de lípidos cargadas con parabenos.

Historia térmica (4 °C)						
%	Original		NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$		P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
TCC	Metilparabeno	Propilparabeno	Metilparabeno	Propilparabeno	Metilparabeno	Propilparabeno
0	4.32	4.35	5.16	5.23	6.32	6.29
10	4.26	4.34	5.02	5.18	6.41	6.22
20	4.51	4.32	5.05	5.14	6.38	6.34
30	4.32	4.46	5.06	5.16	6.24	6.27
40	4.15	4.36	5.03	5.17	6.39	6.32
50	4.32	4.28	4.89	5.23	6.37	6.34
60	4.41	4.34	4.99	5.11	6.37	6.29
70	4.24	4.41	4.97	5.09	6.29	6.31
80	4.36	4.31	5.06	5.02	6.34	6.30
90	4.27	4.32	4.83	5.13	6.38	6.34
100	4.36	4.38	4.97	5.11	6.37	6.30
\bar{x}	4.32	4.35	5.00	5.14	6.35	6.30
SD	0.09	0.05	0.09	0.06	0.05	0.04
Historia térmica (20 °C)						
%	Original		NaCl $0.37 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$		P188 2.5 % + NaCl $0.1 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$	
TCC	Metilparabeno	Propilparabeno	Metilparabeno	Propilparabeno	Metilparabeno	Propilparabeno
0	4.26	4.31	5.24	5.3	6.27	6.32
10	4.34	4.34	5.23	5.31	6.29	6.34
20	4.38	4.32	5.15	5.29	6.32	6.33
30	4.41	4.29	5.13	5.31	6.32	6.30
40	4.38	4.31	5.24	5.32	6.28	6.32
50	4.36	4.29	5.15	5.30	6.27	6.28
60	4.37	4.32	5.19	5.27	6.34	6.30
70	4.34	4.34	5.18	5.28	6.32	6.29
80	4.4	4.33	5.19	5.27	6.35	6.31
90	4.37	4.32	5.11	5.25	6.29	6.28
100	4.35	4.27	5.14	5.27	6.33	6.29
\bar{x}	4.36	4.31	5.18	5.29	6.31	6.31
SD	0.04	0.02	0.05	0.02	0.03	0.02

La razón de este comportamiento es que no hay diferencias significativas en los valores de pK_a de los parabenos estudiados (8.17 para el metil y 8.35 para el propil (Soni et al., 2005)).

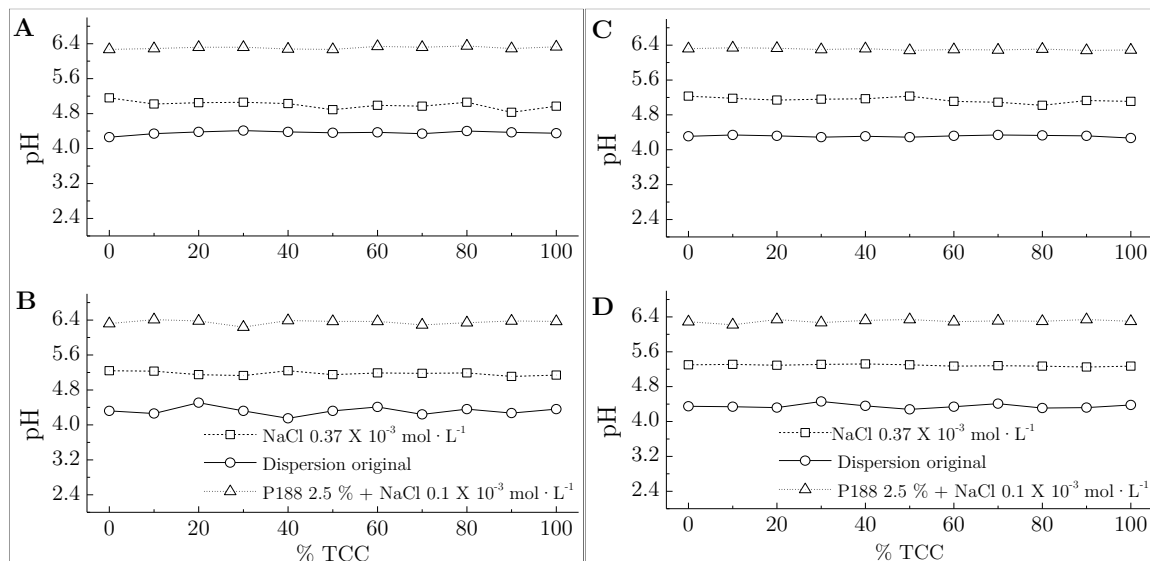


Figura C-2. Comportamiento del pH en dispersiones de lípidos cargadas con parabenos.

A y C: pH de las dispersiones enfriadas a 4 °C para el MP y el PP, respectivamente. B y D: pH de las dispersiones enfriadas a 20 °C para el MP y el PP, respectivamente.

C.2 Determinación del P188 en la superficie de las nanopartículas

En la Tabla C-3 se presentan los datos para la cuantificación del P188 de acuerdo con las condiciones de ensayo descritas en la sección 2.2.1; se preparó una curva de calibración en agua destilada, desde 0.083 hasta 0.83 mg · mL⁻¹.

Tabla C-3. Curva de calibración para la cuantificación del P188.

P188 (mg · mL ⁻¹)	Abs _(624.80 nm)			Abs _{promedio}	Abs _{S.D., n = 3}
0.083	0.215	0.222	0.209	0.216	0.009
0.167	0.443	0.445	0.451	0.448	0.004
0.250	0.701	0.696	0.705	0.701	0.006
0.417	1.112	1.109	1.119	1.114	0.007
0.500	1.31	1.265	1.348	1.307	0.059
0.667	1.77	1.788	1.761	1.775	0.019
0.833	2.186	2.194	2.161	2.178	0.023

El coeficiente de correlación estimado para la curva de calibración fue de 0.9993, que indica adecuada linealidad en el rango de concentraciones evaluado (Figura C-3).

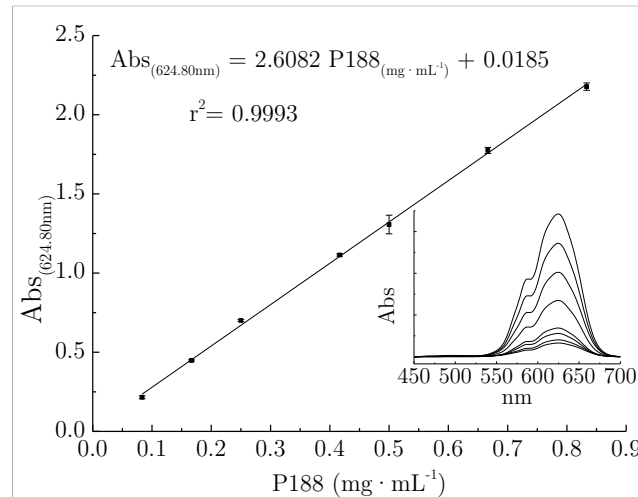


Figura C-3. Curva de calibración para la cuantificación del P188.

Las mediciones se realizaron a 624.80 nm que corresponde a la longitud de onda de máxima absorción del complejo formado (ver inserto en la Figura C-3) y cada punto de la curva corresponde al promedio \pm la desviación estándar para tres muestras (S.D., $n = 3$).

De otro lado, los datos primarios para la cuantificación del P188 libre (en fase acuosa) y adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas (fase lipídica) conteniendo metilparabeno se presenta en las Tablas C-4 y C-5 para las dispersiones enfriadas a 4 °C y a 20 °C, respectivamente. Para la cuantificación del P188 se eligieron las dispersiones de la 1 a la 5 para ambas condiciones térmicas y a partir de éstas, se seleccionaron la 6, 8 y 10 para las dispersiones enfriadas a 4 °C y las dispersiones 7, 9 y 11 para las dispersiones enfriadas a 20 °C de modo que se cubrieran todas las dispersiones preparadas.

Tabla C-4. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 4 °C.

Historia térmica (4 °C)										
Fase lipídica				Fase acuosa				% P188		
% TCC	Abs _{624.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Abs _{624.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Fase lipídica	Fase acuosa
0	1.475	0.558	5.584	20.941	0.477	0.176	1.758	22.699	92.3	7.7
10	1.445	0.547	5.469	20.510	0.864	0.324	3.242	23.752	86.4	13.6
20	1.395	0.528	5.278	19.791	1.105	0.417	4.166	23.957	82.6	17.4
30	1.266	0.478	4.783	17.936	1.751	0.664	6.643	24.579	73.0	27.0
40	1.116	0.421	4.208	15.780	2.006	0.762	7.620	23.400	67.4	32.6
50	1.016	0.382	3.824	14.342	2.518	0.958	9.583	23.925	59.9	40.1
70	1.011	0.381	3.805	14.270	2.437	0.927	9.273	23.543	60.6	39.4
90	1.019	0.384	3.836	14.385	2.548	0.970	9.698	24.083	59.7	40.3

Tabla C-5. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 20 °C.

Historia térmica (20 °C)										
Fase lipídica					Fase acuosa				% P188	
% TCC	Abs _{624.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Abs _{624.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Fase lipídica	Fase acuosa
0	1.074	0.405	4.047	15.176	2.281	0.867	8.675	23.850	63.6	36.4
10	1.058	0.399	3.986	14.946	2.37	0.902	9.016	23.961	62.4	37.6
20	1.045	0.394	3.936	14.759	2.39	0.909	9.092	23.851	61.9	38.1
30	1.055	0.397	3.974	14.903	2.447	0.931	9.311	24.214	61.5	38.5
40	1.008	0.379	3.794	14.227	2.429	0.924	9.242	23.469	60.6	39.4
60	0.998	0.376	3.755	14.083	2.389	0.909	9.089	23.172	60.8	39.2
80	1.064	0.401	4.009	15.032	2.534	0.964	9.645	24.677	60.9	39.1
100	1.024	0.386	3.855	14.457	2.446	0.931	9.307	23.764	60.8	39.2

Los datos primarios para calcular la cantidad total de P188 en las dispersiones enfriadas a 4 °C y 20 °C conteniendo metilparabeno se presentan en la Tabla C-6. Como en el caso anterior, para la cuantificación del P188 total se seleccionaron las dispersiones de la 1 a la 5 para ambas condiciones térmicas y a partir de estas, se seleccionaron la 6, 8 y 10 para las dispersiones enfriadas a 4 °C y las dispersiones 7, 9 y 11 para las dispersiones enfriadas a 20 °C de modo que se cubrieran todas las dispersiones preparadas.

Tabla C-6. Datos primarios cuantificación P188 total en dispersiones conteniendo MP enfriadas a 4 °C y a 20 °C.

Historia térmica										Total (mg · mL ⁻¹)		
4 °C					20 °C					mg/mL lectura		
% TCC	Abs _{624.8 nm}			% TCC	Abs _{624.8 nm}				Dilución 25:1500	*S.D., n = 6 o 3		
0	1.008	1.071	1.010	0	1.014	1.013	1.032	0.386	23.15	0.51		
10	1.114	1.102	1.039	10	1.067	1.05	1.043	0.403	24.17	0.67		
20	1.053	1.044	1.024	20	1.023	1.005	1.033	0.388	23.28	0.36		
30	1.016	1.081	1.094	30	1.062	1.056	1.051	0.399	23.96	0.57		
40	1.051	1.05	1.038	40	1.02	1.008	1.077	0.392	23.51	0.52		
50	1.034	1.042	1.046	—	—	—	—	0.392	23.51	0.14		
—	—	—	—	60	1.094	1.08	1.064	0.407	24.40	0.28		
70	1.078	1.051	1.077	—	—	—	—	0.403	24.16	0.35		
—	—	—	—	80	1.099	1.017	1.091	0.403	24.17	1.04		
90	1.028	1.038	1.051	—	—	—	—	0.391	23.48	0.27		
—	—	—	—	100	1.056	1.05	1.080	0.400	24.01	0.37		

* La cantidad total del P188 se determinó a partir de la cantidad estimada para tres réplicas tanto en la fase lipídica como en la fase acuosa para los cinco primeros puntos. Después se determinó la cantidad del P188 para tres réplicas en los puntos pares para las muestras tratadas a 4 °C y en los puntos impares para las muestras tratadas a 20 °C.

Los datos primarios para la cuantificación del P188 libre (en fase acuosa) y adsorbido sobre la superficie de las nanopartículas lipídicas (fase lipídica) conteniendo propilparabeno se presentan en las Tabla C-7 y Tabla C-8 para las dispersiones enfriadas a 4 °C y 20 °C, respectivamente. Los análisis se llevaron a cabo siguiendo el mismo orden que para las dispersiones conteniendo metilparabeno.

Tabla C-7. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 4 °C.

Historia térmica (4 °C)										
Fase lipídica				Fase acuosa				% P188		
% TCC	Abs _{824.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Abs _{824.8 nm}	mg/mL lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Fase lipídica	Fase acuosa
0	1.435	0.543	5.431	20.366	0.857	0.321	3.215	23.581	86.4	13.6
10	1.343	0.508	5.078	19.043	1.159	0.437	4.373	23.416	81.3	18.7
20	1.298	0.491	4.906	18.396	1.521	0.576	5.761	24.157	76.2	23.8
30	1.141	0.430	4.304	16.139	1.816	0.689	6.892	23.031	70.1	29.9
40	1.108	0.418	4.177	15.665	2.128	0.809	8.088	23.752	65.9	34.1
50	1.045	0.394	3.936	14.759	2.492	0.948	9.484	24.242	60.9	39.1
70	1.011	0.381	3.805	14.270	2.502	0.952	9.522	23.792	60.0	40.0
90	0.989	0.372	3.721	13.954	2.598	0.989	9.890	23.844	58.5	41.5

Tabla C-8. Datos primarios cuantificación P188 en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 20 °C.

Historia térmica (20 °C)										
Fase lipídica				Fase acuosa				% P188		
% TCC	Abs _{824.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Abs _{824.8 nm}	mg · mL ⁻¹ lectura	Factor de dilución 100:1000	Total (mg · mL ⁻¹)	Fase lipídica	Fase acuosa
0	1.078	0.406	4.062	15.233	2.375	0.903	9.035	24.268	62.8	37.2
10	1.062	0.400	4.001	15.003	2.37	0.902	9.016	24.019	62.5	37.5
20	1.032	0.389	3.886	14.572	2.329	0.886	8.859	23.430	62.2	37.8
30	1.059	0.399	3.989	14.960	2.417	0.920	9.196	24.156	61.9	38.1
40	1.031	0.388	3.882	14.557	2.385	0.907	9.073	23.631	61.6	38.4
60	1.044	0.393	3.932	14.744	2.484	0.945	9.453	24.197	60.9	39.1
80	1.013	0.381	3.813	14.299	2.434	0.926	9.261	23.560	60.7	39.3
100	1.034	0.389	3.893	14.601	2.492	0.948	9.484	24.084	60.6	39.4

Los datos primarios para calcular la cantidad total de P188 en las dispersiones enfriadas a 4 °C y 20 °C conteniendo propilparabeno se presentan en la Tabla C-9 siguiendo el mismo esquema de análisis que para las dispersiones conteniendo metilparabeno.

Tabla C-9. Datos primarios cuantificación P188 total en dispersiones conteniendo PP enfriadas a 4°C y a 20 °C.

		Historia térmica						mg · mL ⁻¹ lectura	Total (mg · mL ⁻¹)	
		4 °C			20 °C				Dilución 25:1500	*S.D. n = 6 o 3
% TCC	Abs _{624.8 nm}			% TCC	Abs _{624.8 nm}					
0	1.012	1.027	1.06	0	1.065	1.054	1.086	0.396	23.15	0.56
10	1.042	1.064	1.033	10	1.051	1.085	1.047	0.397	24.17	0.39
20	1.011	1.025	1.098	20	1.013	1.079	1.033	0.393	23.28	0.77
30	1.03	1.012	1.091	30	1.038	1.024	1.055	0.392	23.96	0.59
40	1.12	1.094	1.005	40	1.034	1.035	1.067	0.399	23.51	0.90
50	1.095	1.075	1.064	—	—	—	—	0.406	23.51	0.36
—	—	—	—	60	1.045	1.034	1.073	0.396	24.40	0.38
70	1.047	1.051	1.077	—	—	—	—	0.399	24.16	0.37
—	—	—	—	80	1.079	1.055	1.083	0.404	24.17	0.35
90	1.024	1.038	1.051	—	—	—	—	0.391	23.48	0.31
—	—	—	—	100	1.131	1.042	1.016	0.400	24.01	1.39

* La cantidad total del P188 se determinó a partir de la cantidad estimada para tres réplicas tanto en la fase lipídica como en la fase acuosa para los cinco primeros puntos. Después se estimó la cantidad del P188 para tres réplicas en los puntos pares para las muestras tratadas a 4 °C y en los puntos impares para las muestras tratadas a 20 °C.

C.3 Agregación inducida por electrolitos

Los datos de la absorbancia de las dispersiones de lípidos medidas a 600 nm se reporta en la Tabla C-10 y la desviación estándar para tres mediciones diferentes se presenta en la Tabla C-11. El ensayo de floculación inducida por electrolitos se llevó a cabo solamente sobre las dispersiones enfriadas a 4 °C.

Tabla C-10. Absorbancia a 600 nm de las dispersiones de partículas lipídicas con la adición de Na₂SO₄.

Na ₂ SO ₄ mol · L ⁻¹	% TCC/ *Abs _{600 nm}										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0	0.895	0.741	0.666	0.622	0.561	0.432	0.448	0.486	0.409	0.400	0.895
0.15	0.803	0.651	0.600	0.533	0.479	0.363	0.368	0.416	0.338	0.336	0.803
0.3	0.739	0.605	0.551	0.483	0.429	0.324	0.328	0.368	0.296	0.295	0.739
0.45	0.760	0.646	0.583	0.487	0.421	0.307	0.309	0.345	0.277	0.277	0.760
0.6	1.390	1.342	1.276	1.197	1.122	0.680	0.688	0.678	0.671	0.643	1.390
0.75	1.323	1.275	1.230	1.158	1.081	0.784	0.777	0.774	0.766	0.746	1.323
0.9	1.096	1.041	1.004	0.932	0.871	0.718	0.713	0.702	0.687	0.689	1.096

*Los valores reportados corresponden al promedio para tres mediciones diferentes (S.D., n = 3) sobre cada dispersión enfriada a 4 °C.

Tal como se observa en la Tabla C-10, la absorbancia de todas las dispersiones aumenta por encima de 0.45 mol · L⁻¹ de Na₂SO₄ como resultado del incremento de su turbidez. No obstante, a partir de 0.75 mol · L⁻¹ de Na₂SO₄ la absorbancia disminuye debido a la separación de fases seguida tras la formación de los flóculos.

Tabla C-11. Desviación estándar para las absorbancias de las dispersiones de partículas lipídicas en el ensayo de floculación.

Na ₂ SO ₄ mol · L ⁻¹	% TCC/ *Abs _{600 nm}											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
0	0.023	0.021	0.030	0.005	0.026	0.019	0.016	0.025	0.029	0.011	0.015	
0.15	0.011	0.022	0.015	0.014	0.030	0.015	0.012	0.010	0.015	0.008	0.008	
0.3	0.010	0.027	0.018	0.009	0.026	0.010	0.004	0.008	0.009	0.015	0.007	
0.45	0.013	0.021	0.020	0.007	0.014	0.011	0.004	0.004	0.006	0.014	0.005	
0.6	0.054	0.032	0.037	0.066	0.085	0.065	0.029	0.049	0.037	0.023	0.028	
0.75	0.088	0.055	0.069	0.090	0.108	0.092	0.023	0.028	0.022	0.019	0.025	
0.9	0.048	0.024	0.048	0.084	0.071	0.072	0.025	0.023	0.024	0.014	0.030	

*Los valores reportados corresponden a la desviación estándar del promedio para tres mediciones diferentes (S.D., n = 3) sobre cada dispersión enfriada a 4 °C.

A medida que las dispersiones se hacen más inestables, la velocidad del proceso de floculación aumenta y, por consiguiente, el valor de absorbancia tiende a tener mayor variabilidad, lo que se ve reflejado en el valor de la desviación estándar a concentraciones mayores de 0.45 mol · L⁻¹ de Na₂SO₄.

Con el propósito de obtener un valor aproximado de la concentración de Na₂SO₄ requerida para inducir la floculación de las dispersiones lipídicas se realizó el cálculo de la segunda derivada mediante el método del punto medio a partir de los datos de concentración de Na₂SO₄ con respecto a la absorbancia a 600 nm (Tabla C-12).

Tabla C-12. Segunda derivada de la absorbancia con respecto al punto medio de la concentración de Na₂SO₄.

*Na ₂ SO ₄ mol · L ⁻¹	% TCC/**(Δ ₂ Abs/ΔC ₂)											
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
0.15	1.63	1.24	2.00	0.77	1.75	1.39	1.33	1.72	0.96	1.32	1.01	
0.3	4.58	3.78	3.87	3.60	2.41	1.83	0.98	0.98	1.10	0.99	1.07	
0.45	28.46	27.04	29.07	29.35	31.36	31.57	17.33	17.69	15.85	18.34	17.02	
0.6	-33.35	-30.92	-33.87	-32.83	-33.32	-33.01	-11.97	-12.93	-10.53	-13.26	-11.67	
0.75	-7.13	-7.14	-7.42	-7.99	-8.28	-7.48	-7.51	-6.77	-7.50	-7.75	-7.10	
0.9	-2.24	-1.94	-0.36	-0.24	0.09	0.30	-4.77	-4.13	-3.44	-4.04	-4.89	

Concentración en el punto medio de Na₂SO₄* versus la segunda derivada de la absorbancia con respecto al punto medio de la concentración de Na₂SO₄**.

En la Figura C-4 se muestra la segunda derivada de la absorbancia de las dispersiones con respecto al punto medio de la concentración de Na₂SO₄. El punto de corte para las dispersiones con hasta un 50 % de TCC se observa a una concentración de Na₂SO₄ aproximada de 0.523 mol · L⁻¹ y para las dispersiones con más del 60 % de TCC, el punto de corte se encuentra a una concentración aproximada de 0.538 mol · L⁻¹, es decir, se requiere menor cantidad de Na₂SO₄ para deshidratar estas últimas dispersiones.

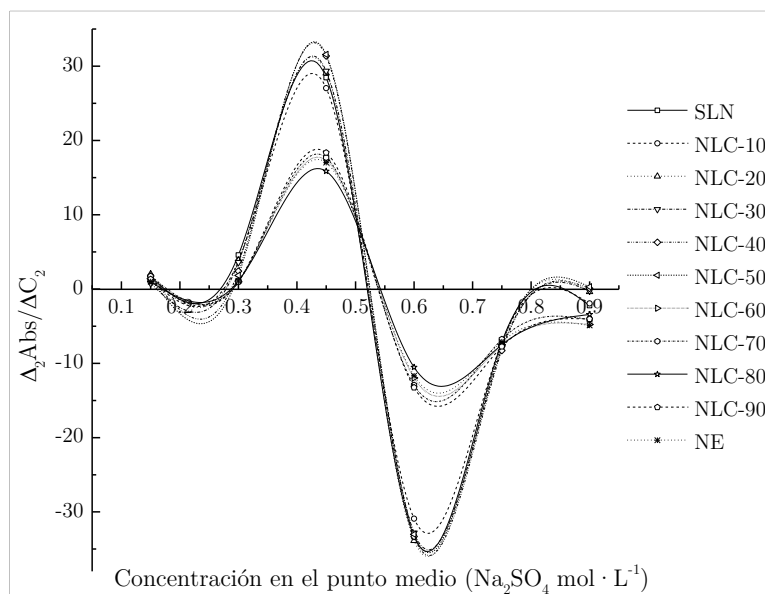


Figura C-4. Segunda derivada de la absorbancia con respecto al punto medio de la concentración de Na_2SO_4 .

C.4 Hidrofobicidad de superficie

Para el ensayo de hidrofobicidad se utilizaron el colorante hidrófobo rosa de Bengala (RB) y el colorante hidrófilo azul de Nilo (NB). En la Figura C-5 se muestran el espectro de absorción del RB y la respectiva curva de calibración desde $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la cuantificación del colorante unido a las dispersiones lipídicas. El espectro del RB en agua presenta un máximo de absorción de 545 nm con un hombro de menor intensidad hacia 510 nm (Figura C-5A).

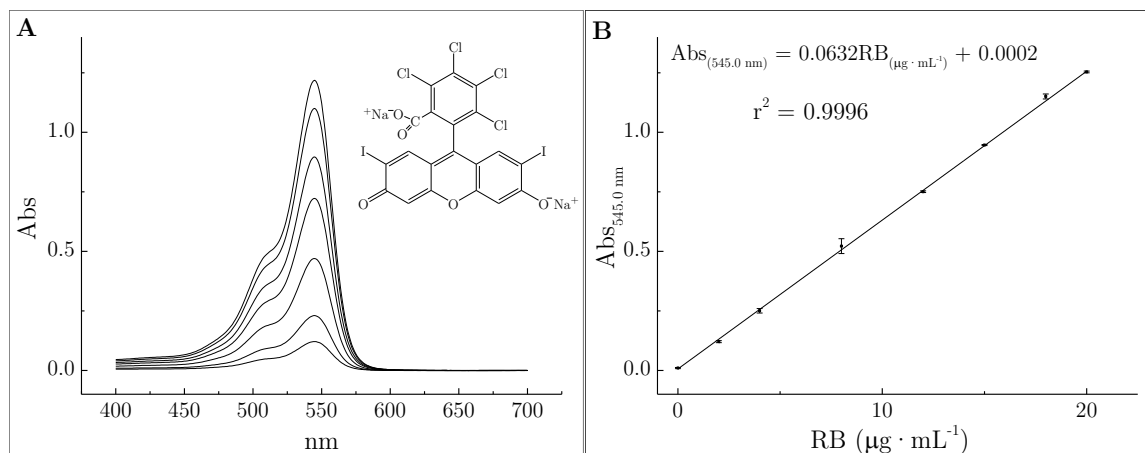


Figura C-5. Curva de calibración para la cuantificación del rosa de Bengala.

El coeficiente de correlación estimado para la curva de calibración fue de 0.9996 (Figura C-5B), el que indica adecuada linealidad en el rango de concentraciones evaluado. La curva de calibración se construyó a partir del promedio \pm la desviación estándar para dos muestras (S.D., $n = 2$).

En la Figura C-6A se muestra el espectro de absorción del RB frente a cantidades crecientes de nanopartículas desde 0.25 mg hasta 1.50 mg para la dispersión preparada con 100 % de MMM enfriada a 4 °C. Los espectros obtenidos para el resto de las dispersiones presentaron el mismo comportamiento. A medida que la concentración de nanopartículas aumenta, disminuye la absorbancia del RB debido a que una mayor cantidad de RB se une a las nanopartículas.

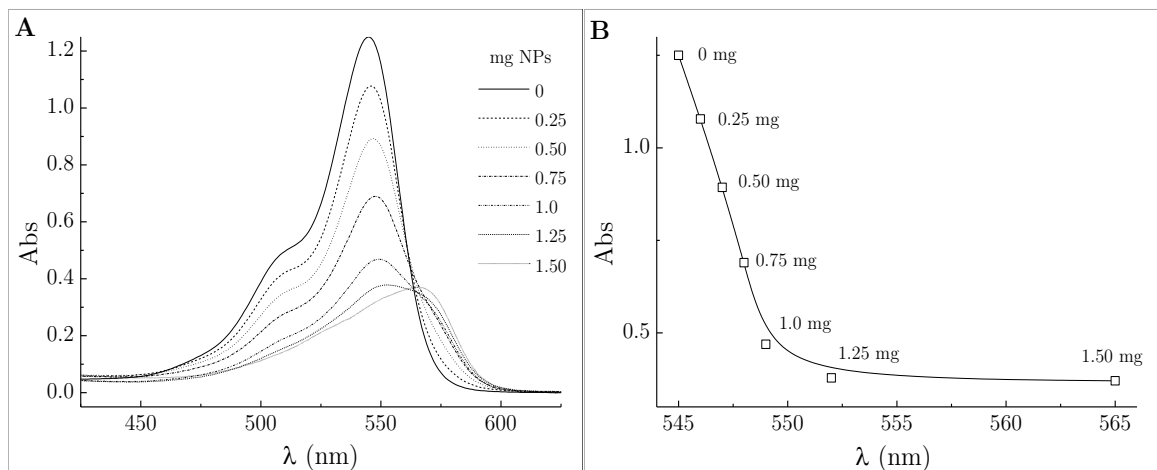


Figura C-6. Adsorción del rosa de Bengala en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas lipídicas.

En un estudio previo se reportó que el corrimiento de la longitud de onda de máxima absorción (λ_{\max}) hacia el rojo en presencia de nanopartículas lipídicas, como el observado en la Figura C-6B, y fue atribuido a la formación de agregados supramoleculares entre el RB con el bromuro de cetiltrimetilamonio usado como agente tensioactivo (Doktorovova et al., 2012). Sin embargo, puesto que el agente tensioactivo usado en el presente estudio fue P188 y los espectros de absorción en el visible del RB presentan el mismo comportamiento, es más probable suponer que en presencia de las nanopartículas lipídicas el corrimiento hacia el rojo de λ_{\max} sea debido al cambio en el ambiente químico provocado por la unión del colorante con las nanopartículas a medida que el RB pasa de un ambiente altamente hidrófilo en el agua en donde puede establecer interacciones tipo puentes de hidrógeno, a un

ambiente altamente hidrófobo en la superficie o en el interior de las nanopartículas (Islam y Ito, 1999).

El cambio en el ambiente químico a medida que el RB se une a las nanopartículas también se ve reflejado en la desaparición progresiva del hombro hacia 510 nm del espectro. Puesto que la intensidad relativa de dicho hombro está asociada con la cantidad de agregados, particularmente la formación de dímeros del colorante en el medio de disolución en función de la concentración (Valdes-Aguilera y Neckers, 1989, 1988), la reducción del hombro es un indicador adicional de la disminución de la concentración del RB en el agua a medida que se une a las nanopartículas. A concentraciones mayores de 1.0 mg de nanopartículas la absorbancia parece mantenerse constante, es decir, que probablemente a esa concentración de nanopartículas la concentración del colorante se agota y el espectro de absorbancia observado es debido al RB unido a las nanopartículas.

En las Tabla C-13 y Tabla C-14 se muestran los datos del RB libre en el libre de dispersión y unido a las nanopartículas. El gráfico de Scatchard se construye a partir de la relación entre el RB unido a las nanopartículas respecto al RB libre (Figura C-7). La constante de adsorción o constante de unión k_b se obtiene a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva.

Tabla C-13. Rosa de Bengala libre en el medio de dispersión.

NPs mg	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Rosa de Bengala libre (mmol · L ⁻¹)										
0.25	0.01747	0.01745	0.01740	0.01732	0.01734	0.01729	0.01724	0.01721	0.01721	0.01716	0.01714
0.50	0.01440	0.01414	0.01409	0.01401	0.01373	0.01362	0.01362	0.01352	0.01346	0.01333	0.01336
0.75	0.01092	0.01079	0.01011	0.00988	0.00962	0.00941	0.00928	0.00920	0.00910	0.00900	0.00897
1.00	0.00756	0.00668	0.00613	0.00556	0.00512	0.00462	0.00437	0.00419	0.00393	0.00371	0.00354
1.25	0.00611	0.00538	0.00492	0.00437	0.00405	0.00377	0.00336	0.00312	0.00271	0.00231	0.00224
1.50	0.00640	0.00566	0.00514	0.00458	0.00419	0.00393	0.00367	0.00330	0.00283	0.00252	0.00236

Tabla C-14. Datos de absorción del rosa de Bengala por mg de nanopartículas.

NPs mg	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Rosa de Bengala unido mmol L ⁻¹ /mg de NPs										
0.25	0.0170	0.0171	0.0174	0.0179	0.0178	0.0181	0.0185	0.0187	0.0187	0.0190	0.0191
0.50	0.0177	0.0185	0.0186	0.0189	0.0197	0.0201	0.0201	0.0204	0.0206	0.0210	0.0209
0.75	0.0188	0.0190	0.0204	0.0209	0.0214	0.0218	0.0221	0.0223	0.0225	0.0227	0.0227
1.00	0.0191	0.0204	0.0212	0.0221	0.0228	0.0235	0.0240	0.0242	0.0246	0.0250	0.0252
1.25	0.0170	0.0179	0.0184	0.0191	0.0195	0.0198	0.0204	0.0207	0.0212	0.0216	0.0217
1.50	0.0139	0.0146	0.0152	0.0157	0.0161	0.0164	0.0167	0.0171	0.0175	0.0178	0.0180

La parte lineal de la curva se encuentra a concentraciones entre 0.25 mg y 1.0 mg de nanopartículas. A concentraciones mayores, la absorbancia medida ya no corresponde a la absorbancia del RB libre sino a la absorbancia del RB unido a las nanopartículas y por lo tanto, no es útil para estimar k_b .

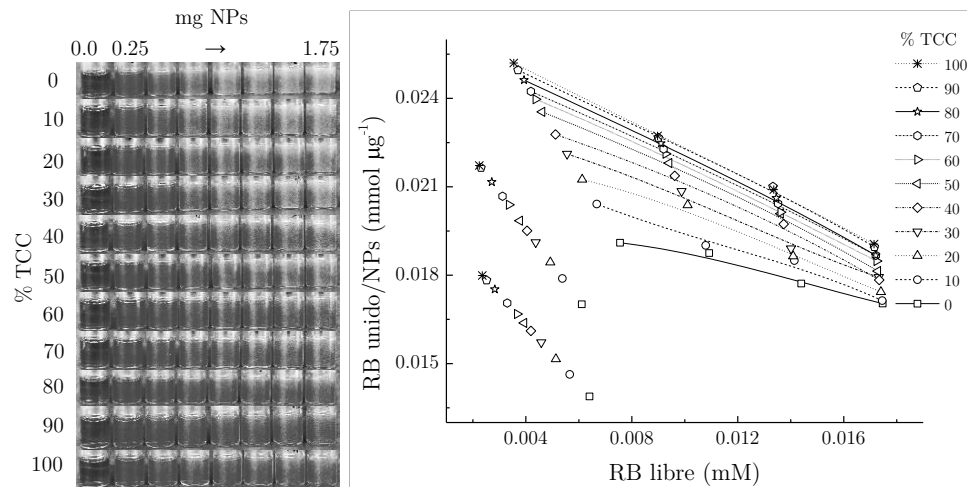


Figura C-7. Gráfico de Scatchard para el rosa de Bengala.

Las constantes de la parte lineal de las curvas de la Figura C-7 se presentan en la Tabla C-15. Cuanto más pronunciada es la pendiente, mayor cantidad de Rosa de Bengala estará unido a la partícula, por lo tanto, ésta será más hidrófoba.

Tabla C-15. Constantes de unión del rosa de Bengala calculadas a partir del gráfico de Scatchard.

	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
$-K_b$ ($\text{mL} \cdot \text{g}^{-1}$)	0.217	0.291	0.348	0.368	0.401	0.422	0.429	0.426	0.445	0.439	0.448
r^2	0.969	0.978	0.983	0.990	0.987	0.993	0.998	0.998	0.997	0.996	0.999

La reducción del RB en la fase acuosa se observa en el panel izquierdo de la Figura C-7. No obstante, a una concentración de 1.75 mg de nanopartículas no fue posible medir la absorbancia debido a la elevada turbidez de las muestras. Debido al intenso color del RB en medios hidrófobos, la figura fue editada en escala de grises para evidenciar la unión entre el colorante y la nanopartícula.

De otro lado, en la Figura C-8 se muestran el espectro de absorción del NB y la respectiva curva de calibración desde $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ hasta $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ para la cuantificación del colorante unido a las dispersiones lipídicas. El espectro del NB en

agua presenta dos máximos de absorción, uno a 595 nm y otro a 635 nm (Figura C-8A).

El coeficiente de correlación estimado para la curva de calibración fue de 0.9998 (Figura C-8B), el que indica adecuada linealidad en el rango de concentraciones evaluado. La curva de calibración se construyó a partir del promedio \pm la desviación estándar para dos muestras (S.D., $n = 2$).

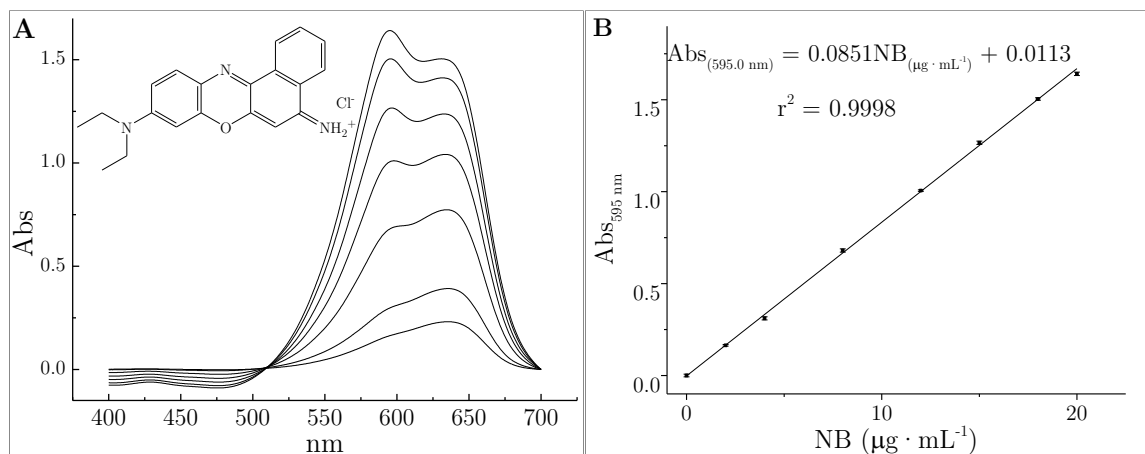


Figura C-8. Curva de calibración para la cuantificación del azul de Nilo.

En la Figura C-9A se muestra el espectro de absorción del azul de Nilo frente a cantidades crecientes de nanopartículas desde 0.25 mg hasta 1.50 mg para la dispersión preparada con 100 % de MMM enfriada a 4 °C. Los espectros obtenidos para el resto de las dispersiones presentaron el mismo comportamiento. Tal como se observa para el rosa de Bengala, a medida que la concentración de nanopartículas aumenta, disminuye la absorbancia del NB debido a que una mayor cantidad de NB se une a las nanopartículas.

La longitud de onda de máxima de absorción de la Figura C-9B muestran un ligero desplazamiento batocrómico en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas. Contrario al rosa de Bengala, el azul de Nilo muestra máximos de absorción y emisión a mayores longitudes de onda a medida que aumenta la polaridad del disolvente (Jose y Burgess, 2006; Martinez y Henary, 2016). Por lo tanto, el desplazamiento

batocrómico del azul de Nilo en presencia de las nanopartículas sugiere que el colorante se encuentra en ambientes más polares. Es decir, la presencia de nanopartículas podría provocar un incremento en la energía de cohesión del agua haciéndola más hidrofobizante con las nanopartículas (van Oss, 2008b) y por consiguiente, más hidrofilizante con las moléculas del azul de Nilo. No obstante, también es probable que a elevadas cantidades de nanopartículas el azul de Nilo se pueda alojar en los segmentos hidrófilos PEO del P188 más expuestos de las nanopartículas.

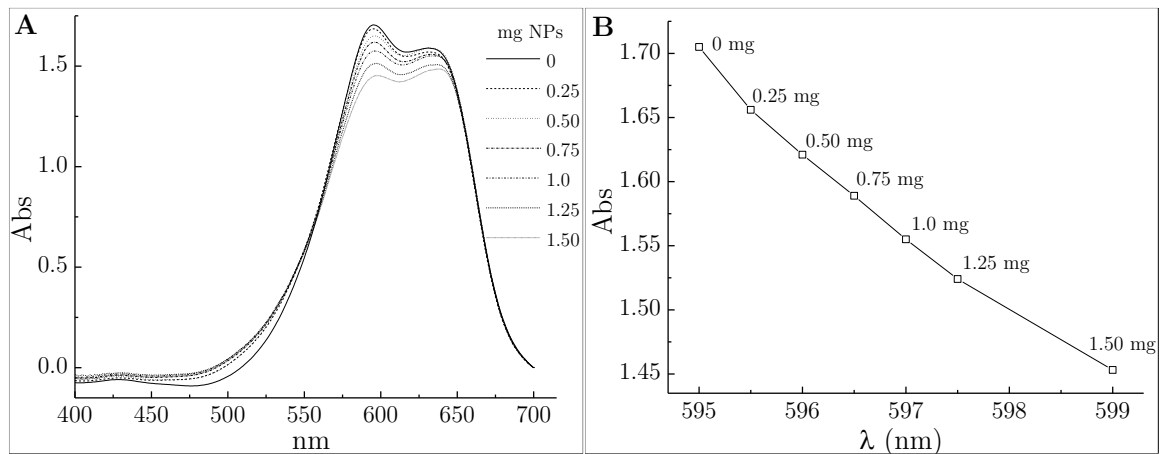


Figura C-9. Adsorción del azul de Nilo en presencia de cantidades crecientes de nanopartículas lipídicas.

En las Tablas C-16 y C-17 se muestran los datos del NB libre en el medio de dispersión y unido a las nanopartículas. El gráfico de Scatchard se construye a partir de la relación entre el NB unido a las nanopartículas respecto al NB libre (Figura C-7). La constante de adsorción o constante de unión k_b se obtiene a partir de la pendiente de la parte lineal de la curva.

Tabla C-16. Azul de Nilo libre en el medio de dispersión.

NPs mg	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0.25	0.05585	0.05602	0.05622	0.05635	0.05656	0.05669	0.05692	0.05709	0.05729	0.05743	0.05769
0.50	0.05435	0.05465	0.05485	0.05538	0.05572	0.05619	0.05666	0.05686	0.05706	0.05729	0.05763
0.75	0.05277	0.05341	0.05398	0.05451	0.05495	0.05538	0.05582	0.05625	0.05676	0.05706	0.05743
1.00	0.05116	0.05207	0.05270	0.05347	0.05408	0.05455	0.05522	0.05572	0.05619	0.05662	0.05699
1.25	0.04956	0.05056	0.05160	0.05244	0.05324	0.05388	0.05445	0.05502	0.05565	0.05602	0.05645
1.50	0.04778	0.04919	0.05039	0.05147	0.05234	0.05307	0.05374	0.05445	0.05498	0.05542	0.05602

Tabla C-17. Datos de absorción del NB por mg de nanopartículas.

NPs mg	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
	Azul de Nilo unido mmol L ⁻¹ /mg de NPs										
0.25	0.0076	0.0066	0.0054	0.0046	0.0034	0.0026	0.0012	0.0002	-0.0010	-0.0018	-0.0035
0.50	0.0083	0.0074	0.0068	0.0052	0.0042	0.0028	0.0014	0.0008	0.0002	-0.0005	-0.0015
0.75	0.0087	0.0074	0.0063	0.0052	0.0043	0.0035	0.0026	0.0017	0.0007	0.0001	-0.0006
1.00	0.0089	0.0076	0.0066	0.0055	0.0046	0.0039	0.0029	0.0021	0.0014	0.0007	0.0002
1.25	0.0091	0.0079	0.0066	0.0056	0.0047	0.0039	0.0032	0.0025	0.0018	0.0013	0.0008
1.50	0.0093	0.0079	0.0067	0.0056	0.0048	0.0040	0.0034	0.0027	0.0021	0.0017	0.0011

Para el caso del azul de Nilo, la parte lineal de la curva corresponde a concentraciones entre 0.75 mg y 1.50 mg de nanopartículas. A concentraciones menores, la absorbancia registrada para las dispersiones conteniendo proporciones mayores al 50 % de TCC fue mayor que la de la muestra control y por lo tanto, no pueden ser consideradas para estimar k_b .

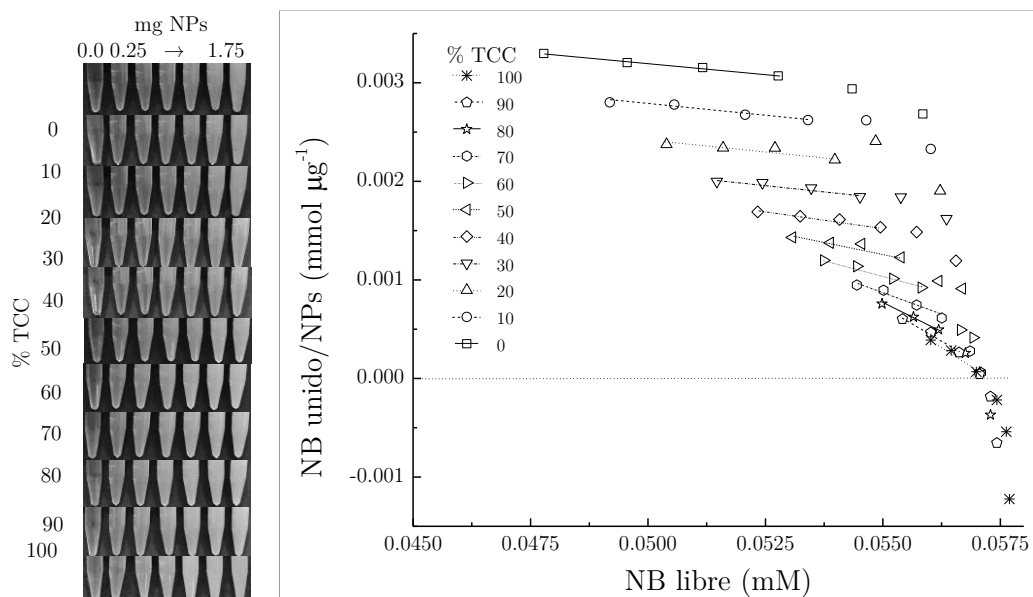


Figura C-10. Gráfico de Scatchard para el azul de Nilo.

Las constantes de la parte lineal de las curvas de la Figura C-10 se presentan en la Tabla C-18. Cuanto más pronunciada es la pendiente, mayor cantidad de azul de Nilo estará unido a la partícula, por lo tanto, ésta será más hidrófila.

Tabla C-18. Constantes de unión del NB calculadas a partir del gráfico de Scatchard.

	% TCC										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
$-K_b$ (mL · g ⁻¹)	0.088	0.092	0.079	0.103	0.115	0.151	0.246	0.354	0.521	0.635	0.806
r^2	0.989	0.942	0.838	0.890	0.968	0.866	0.972	0.946	0.966	0.972	0.962

En el panel izquierdo de la Figura C-10 se evidencia el aumento progresivo de la unión del azul de Nilo a las nanopartículas a partir de una proporción de TCC superior al 50 %, es decir, en aquellas dispersiones en las que la matriz se encuentra en estado líquido, lo que sugiere que el colorante se adsorbe en los segmentos hidrófilos PEO del P188 o posiblemente se absorbe en el interior de la matriz.

D. Datos primarios para la determinación del comportamiento de liberación

D.1 Ensayo de compatibilidad entre el P188 y los parabenos

Los resultados del ensayo de compatibilidad del metilparabeno y el propilparabeno con el P188 usado como agente estabilizante no sugiere incompatibilidad entre ellos. Suele considerarse que los parabenos son incompatibles con el P188 dependiendo de la concentración relativa de ambos (Rowe et al., 2009). No obstante, en ninguno de los dos tipos de prueba la presencia de P188 parece afectar la absorbancia a 255.2 nm de los parabenos (Figuras D-1B hasta D-1H) en comparación con los valores de absorbancia obtenidos sin la presencia del Poloxamer (Figuras D-1A y D-1F).

Lo mismo puede decirse de los espectros de absorción en la región de 220 nm a 350 nm. En este sentido, teniendo en cuenta que el P188 no forma micelas a temperatura ambiente (Alexandridis, 1997; Alexandridis y Alan Hatton, 1995), es posible suponer que las interacciones en solución presentes entre las moléculas de los parabenos con las moléculas del P188 no afectan de manera sustancial la concentración del metil y el propilparabeno libre con respecto a las cantidades asociadas a las nanopartículas.

En general, se acepta que la actividad antimicrobiana de los parabenos se reduce considerablemente en la presencia de agentes estabilizantes no iónicos como los polisorbatos, como resultado de la micelización (Patel y Kostenbauder, 1958). Respecto al Tween® 20 usado como control positivo, nuestros resultados indican que por lo menos a una concentración de 2.5 % p/v el Tween® 20 tiene poco efecto sobre el espectro y los valores la absorbancia en la región de 230 nm a 350 nm del metil y el propilparabeno (Figuras D-1D y D-1I). Sin embargo, si se observa efecto sobre la

absorción en la región del ultravioleta a concentraciones superiores al 2.5 % p/v (Figuras D-1E y D-1J).

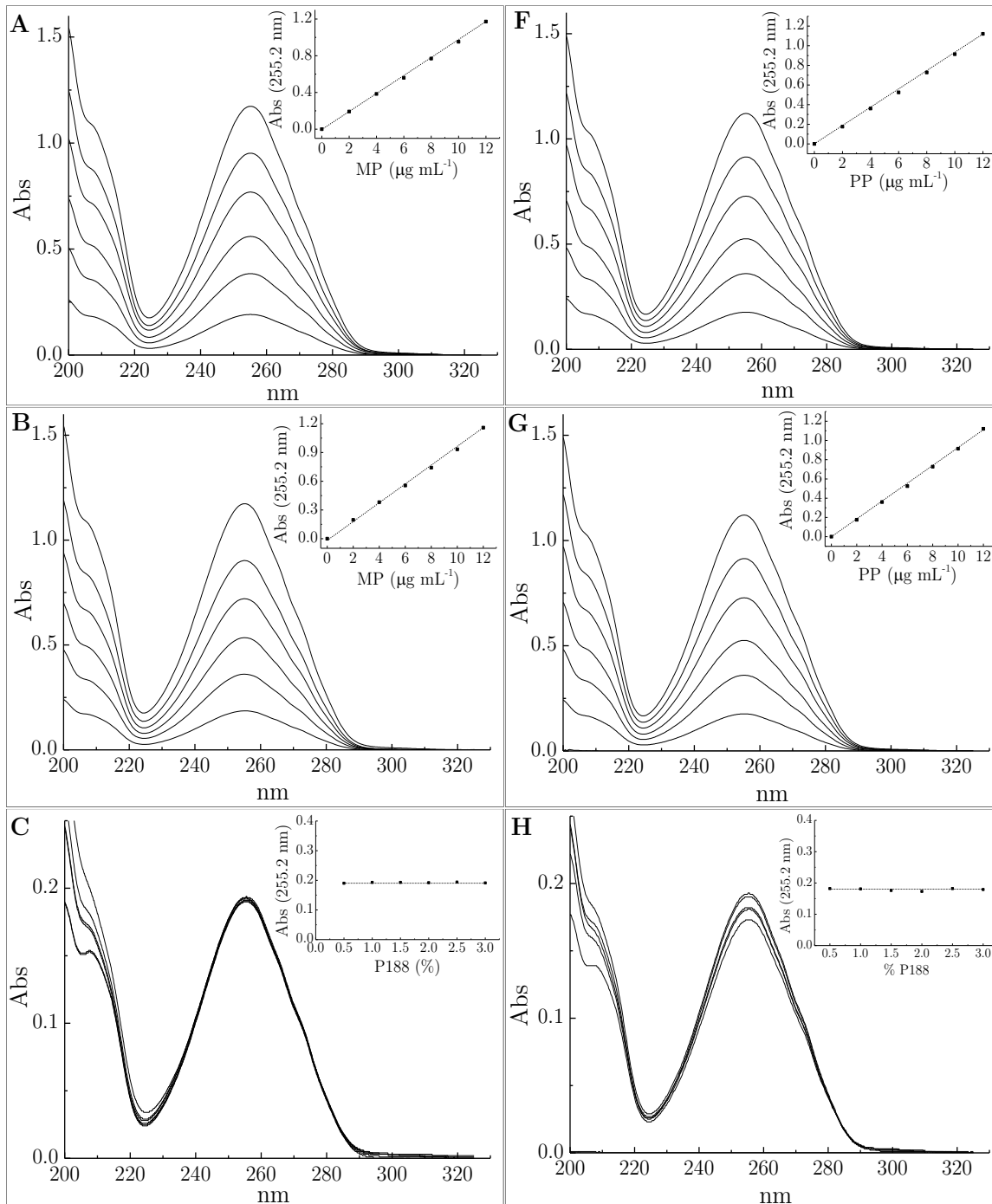


Figura D-1. Compatibilidad de los parabenos con P188 y T20.

Izquierda MP, Derecha PP. A y F MP o PP desde 0 hasta $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua, B y G en P188 2.5 % y D e I en T20 2.5 %; C y H y E y J $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de MP o PP en P188 o Tween®20 desde 0.5 % hasta 3.0 %.

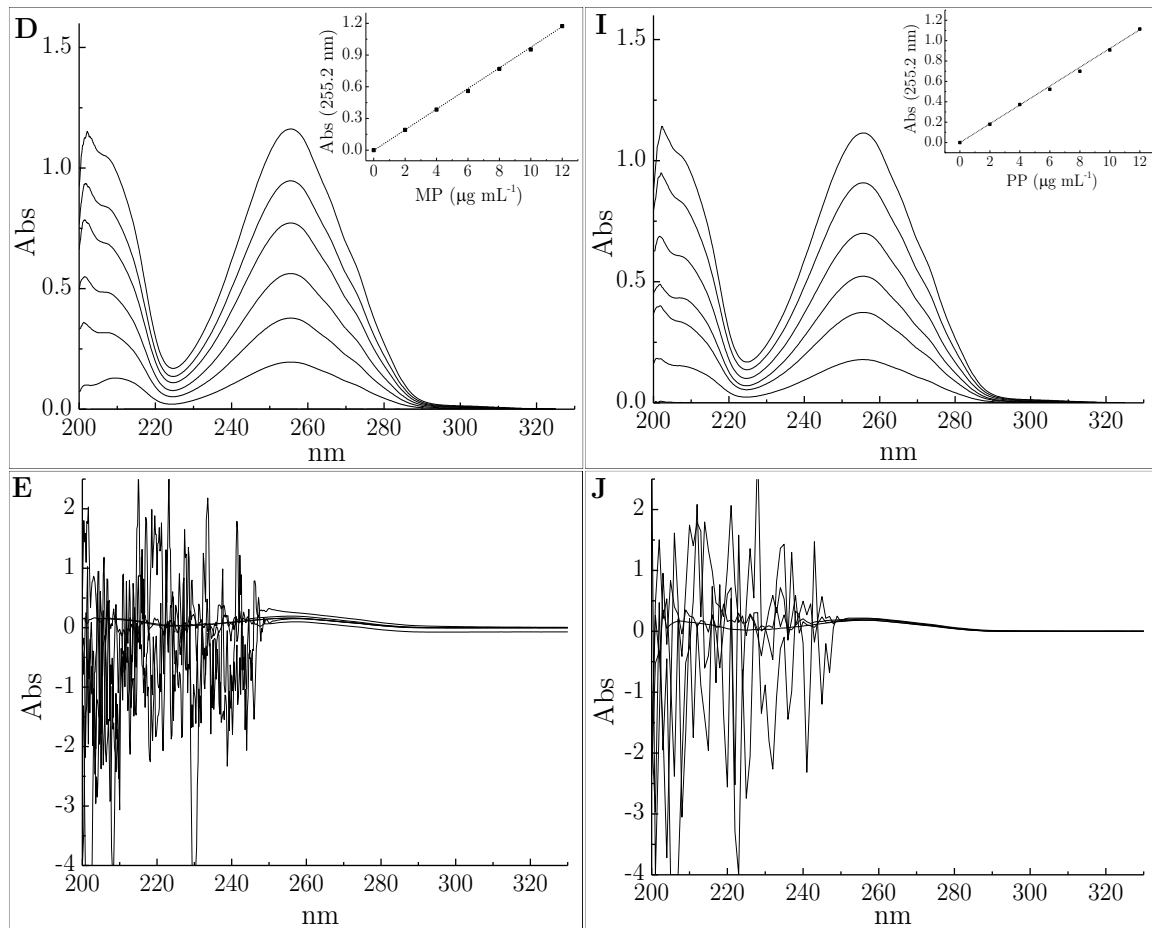


Figura D-1.(Continuación). Compatibilidad de parabenos con P188 y T20.

Izquierda MP, Derecha PP. A y F MP o PP desde 0 hasta $12 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua, B y G en P188 al 2.5 % y D e I en Tween@20 al 2.5 %; C y H y E y J $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de MP o PP en P188 o Tween@20 desde 0.5 % hasta 3.0 %.

No obstante, en la región por debajo de 220 nm de los espectros del metil y propilparabeno en Tween® 20 al 2.5 % ($\sim 20.37 \text{ mM}$) se observa una clara diferencia con respecto a los espectros obtenidos en agua o en P188, resultado de la micelización del Tween® 20 a concentraciones superiores a $0.011\text{--}0.042 \text{ mM}$ (Patist et al., 2000).

D.2 Estandarización de la metodología analítica para la cuantificación de los parabenos

La estandarización de la metodología analítica mediante espectrofotometría en el ultravioleta se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de la Conferencia

Internacional sobre Armonización, ICH (ICH, 2005). La longitud de onda de máxima absorción, λ_{max} , en agua para el metil y el propilparabeno es de 255.2 nm (Figuras D-2A y D-2B).

Para determinar la linealidad y el rango de la metodología analítica se establecieron 8 niveles de concentración realizando entre 3 y 5 réplicas de acuerdo con la Tabla D-1 para un total de 32 determinaciones para cada parabeno. Las determinaciones se llevaron a cabo de manera aleatoria y no de manera creciente para obtener un análisis estadístico válido.

Tabla D-1. Linealidad y rango de la metodología analítica por UV.

Punto	Nivel de concentración	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Abs _{255.2 nm}	Punto	Nivel de concentración	Concentración ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Abs _{255.2 nm}
1	1	0.00016	0.01557	17	5	0.006	0.58769
2	1	0.00016	0.01583	18	5	0.006	0.58941
3	1	0.00016	0.01643	19	5	0.006	0.58471
4	1	0.00016	0.01651	20	6	0.006	0.58261
5	1	0.00016	0.01690	21	6	0.006	0.58622
6	2	0.0008	0.07762	22	6	0.008	0.77922
7	2	0.0008	0.07968	23	6	0.008	0.78880
8	2	0.0008	0.07984	24	6	0.008	0.78120
9	3	0.0020	0.19268	25	7	0.010	0.97193
10	3	0.0020	0.19526	26	7	0.010	0.97573
11	3	0.0020	0.20390	27	7	0.010	0.96928
12	3	0.0020	0.19421	28	8	0.012	1.17242
13	3	0.0020	0.19506	29	8	0.012	1.17468
14	4	0.0040	0.38731	30	8	0.012	1.16989
15	4	0.0040	0.38752	31	8	0.012	1.17355
16	4	0.0040	0.38977	32	8	0.012	1.16722

Las curvas de calibración para los parabenos se muestran en la Figura D-2 y representan la relación entre la concentración de las soluciones acuosas de cada parabeno en $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ con respecto a la absorbancia a 255.2 nm.

Para confirmar que la respuesta de la absorbancia con respecto a la concentración de los parabenos se ajusta a un modelo lineal, se llevó a cabo un análisis de varianza ANOVA utilizando el estadístico t de Student para evaluar la pendiente y el intercepto de las curvas de calibración de la Figura D-2 con un grado de significancia, α , de 0.05.

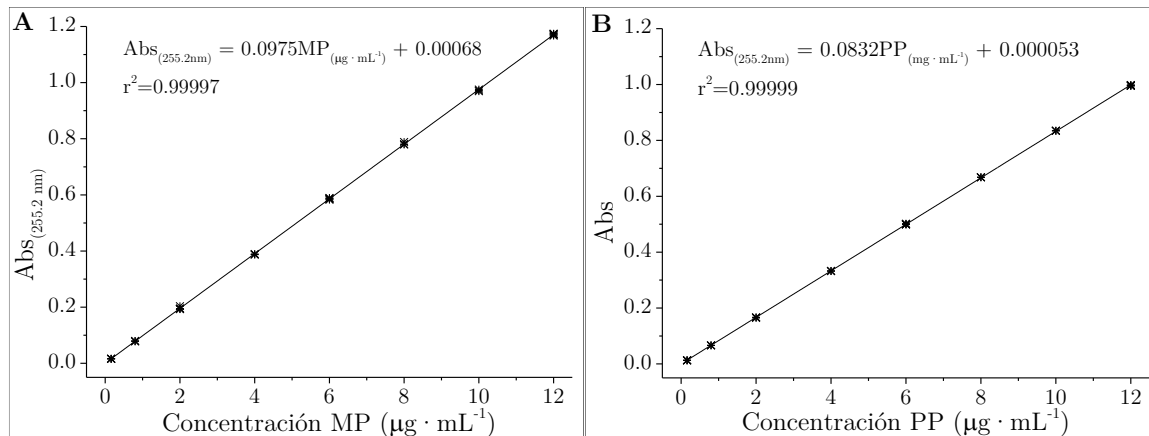


Figura D-2. Relación entre la concentración acuosa de parabenos y la absorbancia a 255.2 nm.
 A: Curva de calibración para el metilparabeno y B: Curva de calibración para el propilparabeno.

Los resultados del análisis de ANOVA se presentan en la Tabla D-2. Dado que el valor obtenido para el F_{cal} es mayor que el valor para F_{tab} , no se acepta la hipótesis nula, es decir, la variabilidad de los datos en el modelo no es estadísticamente significativa y se puede concluir que la relación entre la concentración de ambos parabenos en agua y la absorbancia medida a 255.2 nm presenta un comportamiento lineal.

Tabla D-2. Análisis de varianza (ANOVA) para los parabenos.

Metilparabeno							
	GL	SC	CM	H_0	Condición	F_{cal}	F_{tab}
Regresión	1	5.39	5.39	La variabilidad del modelo de regresión es estadísticamente significativa.	$F_{cal} > F_{tab}$ No se acepta la hipótesis nula.	543126.67	4.17
Error	30	2.97×10^{-4}	9.93×10^{-6}				
Total	31	5.39					
Propilparabeno							
	GL	SC	CM	H_0	Condición	F_{cal}	F_{tab}
Regresión	1	3.93	3.93	La variabilidad del modelo de regresión es estadísticamente significativa.	$F_{cal} > F_{tab}$ No se acepta la hipótesis nula.	1.38 E06	4.17
Error	30	8.54×10^{-5}	2.84×10^{-6}				
Total	31	3.93					

Además, dada la equivalencia entre la suma de cuadrados total y la suma de cuadrados de la regresión (SC), es posible afirmar que la línea de regresión pasa por todas las observaciones, en consecuencia, el modelo explica toda la variabilidad de los datos. De otro lado, la diferencia entre el valor del error de la suma de cuadrados entre el

metilparabeno y el propilparabeno indica que los datos están más dispersos con respecto a la línea de regresión en el metilparabeno que en el propilparabeno, probablemente debido a variaciones introducidas por el operario durante la realización del ensayo. Los parámetros estadísticos para el análisis de la linealidad de la metodología de cuantificación de los parabenos se muestran en la Tabla D-3.

Tabla D-3. Análisis de la linealidad de la metodología UV para la cuantificación de los parabenos.

Metilparabeno		
Suma de cuadrados de los residuos	2.98×10 ⁻⁴	
<i>r</i> de Pearson	0.99997	
Ajuste de <i>r</i> cuadrado	0.99994	
	Valor	Error estándar
Intercepto	6.83×10 ⁻⁴	8.94×10 ⁻⁴
Pendiente	0.0975	1.33×10 ⁻⁴
Propilparabeno		
Suma de cuadrados de los residuos	8.54×10 ⁻⁵	
<i>r</i> de Pearson	0.99999	
Ajuste de <i>r</i> cuadrado	0.99998	
	Valor	Error estándar
Intercepto	5.30×10 ⁻⁵	4.79×10 ⁻⁴
Pendiente	0.08323	7.08×10 ⁻⁵

Los resultados de la prueba *t* de Student de dos colas para el intercepto y la pendiente con un intervalo de confianza del 95 % se muestra en la Tabla D-4.

Tabla D-4. Parámetros estadísticos para la linealidad de la metodología UV para la cuantificación de los parabenos.

Propilparabeno				
Coefficiente	H ₀	Condición	<i>t</i> _{cal}	<i>t</i> _{tab}
Pendiente	$\beta = 0$	$t_{cal} > t_{tab}$ no se acepta la hipótesis nula	736.97	2.04
Intercepto	$\alpha = 0$	$t_{cal} < t_{tab}$ no se acepta la hipótesis nula	0.76	2.04
Metilparabeno				
Coefficiente	H ₀	Condición	<i>t</i> _{cal}	<i>t</i> _{tab}
Pendiente	$\beta = 0$	$t_{cal} > t_{tab}$ no se acepta la hipótesis nula	1175.02	2.04
Intercepto	$\alpha = 0$	$t_{cal} < t_{tab}$ no se acepta la hipótesis nula	0.11	2.04

La prueba de proporcionalidad indica que el intercepto no es significativamente diferente de cero ya que $t_{cal} < t_{tab} = 2.04$. Respecto a la pendiente, no se acepta la hipótesis nula indicando que la pendiente es diferente de cero, es decir, si no existiera una relación proporcional entre las variables la pendiente sería constante y por tanto igual a 0. Finalmente, los coeficientes de determinación indican que por lo menos, el

99.99 % de variabilidad de las absorbancias se debe a las diferentes concentraciones utilizadas en el ensayo y no al azar. Por lo tanto, el modelo lineal se ajusta adecuadamente a los datos. Los resultados del análisis de precisión de la metodología se muestran en la Tabla D-5. En este caso, dado que el G_{cal} es menor se acepta la hipótesis nula indicando que no hay diferencias significativas en las varianzas de las lecturas con un intervalo de confianza del 95 %. Uno de los criterios de aceptación es el coeficiente de variación promedio ponderado el cual normalmente oscila entre el 2 % o 3 %.

Tabla D-5. Evaluación de la precisión de la metodología analítica UV para la cuantificación de los parabenos.

Metilparabeno							
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Promedio	SD	% CV	H_0	Condición	G_{cal}	G_{tab}
0.16	0.01594	4.41×10^{-4}	2.77	No hay	$G_{cal} > G_{tab}$	0,7365	0,8709
4	0.38731	1.36×10^{-3}	0.35	diferencias	no se acepta		
12	1.17233	2.40×10^{-3}	0.20	significativas en las varianzas	la hipótesis nula		
Propilparabeno							
Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Promedio	SD	% CV	H_0	Condición	G_{cal}	G_{tab}
0.16	0.0339	6.38×10^{-4}	4.77	No hay	$G_{cal} > G_{tab}$	0,6746	0,8709
4	0.33237	7.67×10^{-4}	0.23	diferencias	no se acepta		
12	0.99653	1.44×10^{-3}	0.14	significativas en las varianzas	la hipótesis nula		

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon de acuerdo con las Ecuaciones D-1 y D-2:

$$LD = \frac{a + 3S_a}{b \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación D-1}$$

$$LC = \frac{a + 10S_a}{b \cdot \sqrt{n}} \quad \text{Ecuación D-2}$$

Los límites de detección obtenidos para el metilparabeno y el propilparabeno son de $6.10 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ y $3.1 \times 10^{-1} \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Mientras que los límites de cuantificación son de $0.017 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-3}$ y $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectivamente. Los valores obtenidos para el límite de cuantificación para ambos parabenos son por lo menos 1 % de la cantidad de parabenos durante la dilución para llevar a cabo los estudios de liberación, esto es $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Por lo tanto, la metodología empleada es

suficiente para cuantificar mínimas cantidades liberadas durante el ensayo. En la Tabla D-6 se presentan los valores de la capacidad de incorporación (DL) para las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo parabenos enfriadas a 4 °C y a 20 °C. La capacidad de incorporación aumenta en función de la proporción de TCC en las nanopartículas. También es mayor en las dispersiones enfriadas a 20 °C (nanoemulsiones) y en las dispersiones conteniendo propilparabeno.

Tabla D-6. Capacidad de incorporación (DL) del metil y el propilparabeno en las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C y a 20 °C.

% TCC	Metilparabeno						Propilparabeno					
	4 °C			20 °C			4 °C			20 °C		
	DL	S.D.	*% MP	DL	S.D.	*% MP	DL	S.D.	*% PP	DL	S.D.	*% PP
0	2.20	0.08	43.9	2.67	0.12	53.4	3.98	0.01	79.7	4.20	0.04	83.9
20	2.32	0.04	46.3	2.70	0.06	54.0	4.06	0.02	81.2	4.24	0.05	84.7
30	2.51	0.07	50.2	2.81	0.04	56.1	4.14	0.01	82.8	4.29	0.04	85.8
40	2.67	0.09	53.4	2.87	0.09	57.4	4.24	0.04	84.8	4.35	0.02	86.9
50	2.78	0.07	55.6	2.90	0.10	57.9	4.30	0.02	86.0	4.36	0.04	87.2
60	2.92	0.03	58.3	—	—	—	4.41	0.05	88.1	—	—	—
70	—	—	—	3.03	0.07	60.5	—	—	—	4.45	0.01	89.0
80	3.04	0.06	60.8	—	—	—	4.47	0.02	89.5	—	—	—
90	—	—	—	3.11	0.12	62.2	—	—	—	4.53	0.01	90.6
100	3.18	0.06	63.5	—	—	—	4.53	0.01	90.6	—	—	—

*Corresponde al porcentaje de parabeno respecto al 5 % colocado inicialmente en la dispersión.

En la Tabla D-7 se presentan los valores de la eficiencia de encapsulación para las dispersiones de nanopartículas lipídicas conteniendo parabenos enfriadas a 4 °C y a 20 °C. La eficiencia de encapsulación conserva el mismo comportamiento que el de la capacidad de incorporación.

Tabla D-7. Eficiencia de encapsulación (EE) del metil y el propilparabeno en las dispersiones de nanopartículas lipídicas enfriadas a 4 °C y a 20 °C.

% TCC	Metilparabeno				Propilparabeno			
	4 °C		20 °C		4 °C		20 °C	
	EE	S.D.	EE	S.D.	EE	S.D.	EE	S.D.
0	47.8	1.9	58.4	2.6	87.2	0.1	92.1	1.0
20	51.0	1.0	59.6	1.5	88.2	0.5	92.2	1.2
30	53.1	1.5	59.7	0.9	89.0	0.3	92.3	0.9
40	56.0	2.0	60.2	1.9	90.0	1.0	92.4	0.4
50	58.2	1.6	60.7	2.2	91.1	0.4	92.5	0.8
60	61.1	0.6	—	—	91.6	1.0	—	—
70	—	—	62.1	1.4	—	—	92.7	0.3
80	63.3	1.2	—	—	92.8	0.4	—	—
90	—	—	63.4	2.4	—	—	93.0	0.1
100	65.3	1.3	—	—	93.1	0.1	—	—

En las Tablas D-8 y D-9 se presentan los valores de liberación del metil y el propilparabeno a partir de las dispersiones de nanopartículas lipídicas, obtenidos mediante el método de ultrafiltración/centrifugación desde las dispersiones enfriadas a 4 °C y en la Tabla D-10 se reportan los valores correspondientes para las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 20 °C.

Tabla D-8. Cantidad liberada de metilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C.

% TCC		0		20		40		60		80		100	
Tiempo (h)	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	
0	52.2	0.3	46.9	0.5	41.8	1.0	37.9	0.2	36.5	0.3	34.9	0.1	
1	94.5	0.2	92.8	0.7	91.3	0.6	90.0	0.4	88.2	0.7	87.3	0.4	
6	94.3	0.1	92.6	0.9	90.4	0.2	88.8	0.8	86.9	0.2	85.5	0.3	
9	93.6	0.8	91.6	1.0	89.8	0.7	87.8	0.8	86.2	0.8	84.8	0.4	
12	92.8	0.7	91.1	0.7	89.1	0.3	87.1	0.3	85.1	0.5	83.6	0.1	
24	92.7	1.1	90.3	0.8	88.7	1.0	86.7	1.0	85.3	0.5	83.8	0.1	

Tabla D-9. Cantidad liberada de propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C.

% TCC		0		20		40		60		80		100	
Tiempo (h)	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	
0	12.8	0.2	11.0	0.1	8.9	0.2	7.3	0.2	6.9	0.1	6.7	0.2	
1	68.6	0.8	66.3	0.8	63.6	0.5	61.2	0.9	57.9	0.7	53.8	0.5	
6	67.9	0.8	65.2	0.5	63.0	0.3	60.5	0.7	56.7	0.5	52.1	0.4	
9	66.5	0.2	64.5	1.4	62.3	0.3	59.6	0.5	55.9	0.5	51.1	0.4	
12	65.1	1.7	63.2	0.8	61.2	0.7	58.6	0.6	55.2	0.9	50.8	0.1	
24	64.3	1.1	62.3	0.6	60.2	2.6	57.3	0.6	54.1	0.2	49.4	0.2	

Tabla D-10. Cantidad liberada de metil y propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 20 °C.

% TCC		Metilparabeno						Propilparabeno					
		0		20		40		0		10		20	
Tiempo (h)	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	
0	41.6	0.1	40.3	0.3	39.3	0.1	7.9	0.2	7.7		7.5	0.4	
1	93.6	0.4	91.9	0.6	90.6	0.1	67.4	0.7	64.3	0.2	59.9	0.1	
6	92.9	1.1	91.0	0.5	89.9	0.8	66.4	0.6	63.1	0.4	59.7	0.6	
9	91.9	0.3	89.9	0.6	88.8	0.5	65.3	0.5	62.3	0.5	58.9	0.5	
12	91.6	0.7	89.6	0.6	88.3	0.8	63.9	0.8	60.9	0.6	57.8	0.3	
24	90.6	0.3	89.1	0.5	88.3	1.0	62.8	1.0	59.7	0.4	56.4	0.4	

En la Tabla D-11 se presentan los porcentajes de metil y propilparabeno liberados a partir de las nanopartículas enfriadas a 4 °C, obtenidos después de sustraer la cantidad libre de parabenos en las dispersiones y en la Tabla D-12 se reportan los correspondientes valores para las nanopartículas enfriadas a 20 °C.

Tabla D-11. Cantidad liberada de metil y propilparabeno a partir de las nanopartículas enfriadas a 4 °C obtenida después de sustraer la cantidad libre en la dispersión.

% TCC	0	20	40	60	80	100	0	20	40	60	80	100
Tiempo (h)	Metilparabeno						Propilparabeno					
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	42.2	46.0	49.5	52.0	51.6	52.3	55.8	55.3	54.7	54.0	51.0	47.0
6	42.1	45.7	48.6	50.9	50.4	50.5	55.2	54.1	54.2	53.2	49.8	45.4
9	41.4	44.7	48.0	49.9	49.6	49.9	53.8	53.5	53.5	52.3	49.0	44.4
12	40.6	44.2	47.4	49.2	48.5	48.7	52.4	52.2	52.3	51.3	48.2	44.1
24	40.4	43.4	47.0	48.8	48.7	48.9	51.5	51.3	51.3	50.1	47.1	42.7

Tabla D-12. Cantidad liberada de metil y propilparabeno a partir de las nanopartículas enfriadas a 20 °C obtenida después de sustraer la cantidad libre en la dispersión.

% TCC	100	80	60	100	80	60
Tiempo (h)	Metilparabeno			Propilparabeno		
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	52.0	51.6	51.4	59.5	56.6	52.4
6	51.3	50.7	50.7	58.5	55.4	52.2
9	50.4	49.6	49.5	57.4	54.6	51.4
12	50.0	49.3	49.0	56.0	53.2	50.3
24	49.0	48.7	49.0	54.9	52.0	48.9

En la Tabla D-13 se presentan los porcentajes liberados de metil y propilparabeno a partir de las nanopartículas enfriadas a 4 °C usando como medio de liberación P188 al 2.5 % p/v.

Tabla D-13. Cantidad liberada de metil y propilparabeno durante 24 h a partir de las dispersiones de nanopartículas enfriadas a 4 °C usando como medio de liberación P188 al 2.5 % p/v.

% TCC	0		20		100		0		20		100	
	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.	%	S.D.
Tiempo (h)	Metilparabeno						Propilparabeno					
0	52.2	0.3	39.4	0.1	35.0	0.2	12.8	0.3	11.0	0.1	6.7	0.3
1	95.0	0.5	92.1	0.7	87.1	0.2	68.5	0.5	66.4	0.6	54.0	0.6
3	94.2	0.6	92.1	1.3	85.1	0.8	68.3	0.4	65.1	0.4	52.1	0.3
12	92.5	1.0	86.3	0.4	80.0	0.5	64.0	0.2	61.2	0.4	49.6	0.5

Referencias

- Abdelbary, G., Fahmy, R.H., 2009. Diazepam-loaded solid lipid nanoparticles: Design and characterization. *AAPS PharmSciTech* 10, 211–219. doi:10.1208/s12249-009-9197-2
- Aditya, N.P., Macedo, A.S., Doktorovova, S., Souto, E.B., Kim, S., Chang, P.-S., Ko, S., 2014. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: A comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 115–121. doi:10.1016/j.lwt.2014.04.058
- Aditya, N.P., Shim, M., Lee, I., Lee, Y., Im, M.H., Ko, S., 2013. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: In vitro digestion and antiprostata cancer activity. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1878–1883. doi:10.1021/jf305143k
- Ahlin, P., Kristl, J., Pečar, S., Štrancar, J., Šentjurc, M., 2003. The effect of lipophilicity of spin-labeled compounds on their distribution in solid lipid nanoparticle dispersions studied by electron paramagnetic resonance. *J. Pharm. Sci.* 92, 58–66. doi:10.1002/jps.10277
- Ahlin, P., Kristl, J., Šentjurc, M., Štrancar, J., Pečar, S., 2000. Influence of spin probe structure on its distribution in SLN dispersions. *Int. J. Pharm.* 196, 241–244. doi:10.1016/S0378-5173(99)00431-7
- Akanda, M.H., Rai, R., Slipper, I.J., Chowdhry, B.Z., Lamprou, D., Getti, G., Douroumis, D., 2015. Delivery of retinoic acid to LNCap human prostate cancer cells using solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 493, 161–171. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.07.042
- Alexandridis, P., 1997. Poly(ethylene oxide)/poly(propylene oxide) block copolymer surfactants. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2, 478–489. doi:10.1016/S1359-0294(97)80095-7
- Alexandridis, P., Alan Hatton, T., 1995. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: Thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 96, 1–46. doi:10.1016/0927-7757(94)03028-X
- Alexandridis, P., Holzwarth, J.F., Hatton, T.A., 1994. Micellization of poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) triblock copolymers in aqueous solutions: thermodynamics of copolymer association. *Macromolecules* 27, 2414–2425. doi:10.1021/ma00087a009
- Almeida, A.J., Runge, S., Müller, R.H., 1997. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of production parameters. *Int. J. Pharm.* 149, 255–265. doi:10.1016/S0378-5173(97)04885-0

- Almeida, A.J., Souto, E.B., 2007. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 478–490. doi:10.1016/j.addr.2007.04.007
- Anantachaisilp, S., Smith, S.M., Treetong, A., Pratontep, S., Puttipatkhachorn, S., Ruktanonchai, U.R., 2010. Chemical and structural investigation of lipid nanoparticles: Drug-lipid interaction and molecular distribution. *Nanotechnology* 21, 125102. doi:10.1088/0957-4484/21/12/125102
- Andrade, L.M., de Fátima Reis, C., Maione-Silva, L., Anjos, J.L. V., Alonso, A., Serpa, R.C., Marreto, R.N., Lima, E.M., Taveira, S.F., 2014. Impact of lipid dynamic behavior on physical stability, in vitro release and skin permeation of genistein-loaded lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 40–47. doi:10.1016/j.ejpb.2014.04.015
- Aronson, J.K. (Ed.), 2015. *Meyler's side effects of drugs. The international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions*, 15a ed. Elsevier Science, Oxford.
- ASTM, 2018. E2865-12(2018), Standard guide for measurement of electrophoretic mobility and zeta potential of nanosized biological materials. doi:10.1520/E2865-12R18
- ASTM, 2017. D445-17a, Standard guide for kinematic viscosity of transparent and opaque liquids (and calculation of dynamic viscosity). doi:10.1520/D0445-17A
- ASTM, 2015a. E2865-12, Standard guide for measurement of electrophoretic mobility and zeta potential of nanosized biological materials. doi:10.1520/E2865-12.2
- ASTM, 2015b. E2490-09, Standard guide for measurement of particle size distribution of nanomaterials in suspension by photon correlation spectroscopy (PCS). doi:10.1520/E2490-09.2
- Attama, A.A., Reichl, S., Müller-Goymann, C.C., 2008. Diclofenac sodium delivery to the eye: In vitro evaluation of novel solid lipid nanoparticle formulation using human cornea construct. *Int. J. Pharm.* 355, 307–313. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.12.007
- Bacle, A., Gautier, R., Jackson, C.L., Fuchs, P.F.J., Vanni, S., 2017. Interdigitation between Triglycerides and Lipids Modulates Surface Properties of Lipid Droplets. *Biophys. J.* 112, 1417–1430. doi:10.1016/j.bpj.2017.02.032
- Baek, J.-S., Cho, C.-W., 2015a. Controlled release and reversal of multidrug resistance by co-encapsulation of paclitaxel and verapamil in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 478, 617–624. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.018
- Baek, J.-S., Cho, C.W., 2015b. Comparison of solid lipid nanoparticles for encapsulating paclitaxel or docetaxel. *J. Pharm. Investig.* 45, 625–631. doi:10.1007/s40005-015-0182-3
- Baek, J.-S., Kim, B.-S., Puri, A., Kumar, K., Cho, C.-W., 2016. Stability of paclitaxel-loaded solid lipid nanoparticles in the presence of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Arch. Pharm. Res.* 39, 785–793. doi:10.1007/s12272-016-0753-5
- Baek, J.-S., Shin, S.-C., Cho, C.-W., 2012. Effect of lipid on physicochemical properties of solid lipid nanoparticle of paclitaxel. *J. Pharm. Investig.* 42, 279–283. doi:10.1007/s40005-012-0038-z

- Baker, J.A., Pearson, R.A., Berg, J.C., 1989. Influence of particle curvature on polymer adsorption layer thickness. *Langmuir* 5, 339–342. doi:10.1021/la00086a008
- Ban, C., Lim, S., Chang, P.-S.S., Choi, Y.J., 2014. Enhancing the stability of lipid nanoparticle systems by sonication during the cooling step and controlling the liquid oil content. *J. Agric. Food Chem.* 62, 11557–11567. doi:10.1021/jf503489v
- Banerjee, S., Roy, S., Bhaumik, K.N., Pillai, J., 2019. Mechanisms of the effectiveness of lipid nanoparticle formulations loaded with anti-tubercular drugs combinations toward overcoming drug bioavailability in tuberculosis. *J. Drug Target.* 0, 1–15. doi:10.1080/1061186X.2019.1613409
- Battaglia, L., Gallarate, M., Cavalli, R., Trotta, M., 2010. Solid lipid nanoparticles produced through a coacervation method. *J. Microencapsul.* 27, 78–85. doi:10.3109/02652040903031279
- Beloqui, A., Solinís, M.Á., Rodríguez-Gascón, A., Almeida, A.J., Prést, V., 2016. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 12, 143–161. doi:10.1016/j.nano.2015.09.004
- Benita, S., Klang, S., 1998. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration emulsions, en: Benita, S. (Ed.), *Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery*. CRC Press, London, p. 352. doi:10.1201/9780367810528
- Berchane, N.S., Jebrail, F.F., Carson, K.H., Rice-Ficht, A.C., Andrews, M.J., 2006. About mean diameter and size distributions of poly(lactide-co-glycolide) (PLG) microspheres. *J. Microencapsul.* 23, 539–552. doi:10.1080/02652040600776440
- Bernkop-Schnürch, A., Jalil, A., 2018. Do drug release studies from SEDDS make any sense? *J. Control. Release* 271, 55–59. doi:10.1016/j.jconrel.2017.12.027
- Berton-Carabin, C.C., Coupland, J.N., Elias, R.J., 2013. Effect of the lipophilicity of model ingredients on their location and reactivity in emulsions and solid lipid nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 431, 9–17. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.04.016
- Bhatt, S., Sharma, J., Singh, M., Saini, V., 2018. Solid lipid nanoparticles: A promising technology for delivery of poorly water-soluble drugs. *Acta Pharm. Sci.* 56, 27–49. doi:10.23893/1307-2080.APS.05616
- Bhattacharjee, S., 2016. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release* 235, 337–351. doi:10.1016/j.jconrel.2016.06.017
- Blaschke, T., Kankate, L., Kramer, K.D., 2007. Structure and dynamics of drug-carrier systems as studied by paelectric spectroscopy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 403–10. doi:10.1016/j.addr.2007.04.003
- Boettinger, W.J., Kattner, U.R., Moon, K.-W., Perepezko, J.H., 2007. DTA and heat-flux DSC measurements of alloy melting and freezing, en: Zhao, J.-C. (Ed.), *Methods for Phase Diagram Determination*. Elsevier, Oxford, pp. 151–221. doi:10.1016/B978-008044629-5/50005-7
- Boreham, A., Volz, P., Peters, D., Keck, C.M., Alexiev, U., 2017. Determination of nanostructures and

- drug distribution in lipid nanoparticles by single molecule microscopy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 110, 31–38. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.020
- Bouzidi, L., Boodhoo, M. V., Kutek, T., Filip, V., Narine, S.S., 2010. The binary phase behavior of 1,3-dilauroyl-2-stearoyl-sn-glycerol and 1,2-dilauroyl-3-stearoyl-sn-glycerol. *Chem. Phys. Lipids* 163, 607–629. doi:10.1016/j.chemphyslip.2010.05.002
- Boyd, B.J., 2003. Characterisation of drug release from cubosomes using the pressure ultrafiltration method. *Int. J. Pharm.* 260, 239–247. doi:10.1016/S0378-5173(03)00262-X
- Braem, C., Blaschke, T., Panek-Minkin, G., Herrmann, W., Schlupp, P., Paepenmüller, T., Müller-Goymann, C.C., Mehnert, W., Bittl, R., Schäfer-Korting, M., Kramer, K.D., 2007. Interaction of drug molecules with carrier systems as studied by piezoelectric spectroscopy and electron spin resonance. *J. Control. Release* 119, 128–135. doi:10.1016/j.jconrel.2007.01.017
- Bresson, S., El Marssi, M., Khelifa, B., 2006. Conformational influences of the polymorphic forms on the CO and C-H stretching modes of five saturated monoacid triglycerides studied by Raman spectroscopy at various temperatures. *Vib. Spectrosc.* 40, 263–269. doi:10.1016/j.vibspec.2005.11.001
- Bresson, S., El Marssi, M., Khelifa, B., 2005. Raman spectroscopy investigation of various saturated monoacid triglycerides. *Chem. Phys. Lipids* 134, 119–129. doi:10.1016/j.chemphyslip.2004.12.009
- Bricarello, D.A., Pan, Y., Nitin, N., 2015. Interactions between the lipid core and the phospholipid interface in emulsions and solid lipid nanoparticles. *Food Biophys.* 10, 466–473. doi:10.1007/s11483-015-9413-4
- Bunjes, H., 2011. Structural properties of solid lipid based colloidal drug delivery systems. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 405–411. doi:10.1016/j.cocis.2011.06.007
- Bunjes, H., 2010. Lipid nanoparticles for the delivery of poorly water-soluble drugs. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 1637–1645. doi:10.1111/j.2042-7158.2010.01024.x
- Bunjes, H., 2004. Characterization of solid lipid nano- and microparticles, en: Nastruzzi, C. (Ed.), *Lipospheres in drug targets and delivery*. CRC Press, pp. 41–66. doi:10.1201/9780203505281.ch3
- Bunjes, H., Drechsler, M., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2001. Incorporation of the model drug ubidecarenone into solid lipid nanoparticles. *Pharm. Res.* 18, 287–93. doi:10.1023/A:1011042627714
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., 2005. Saturated phospholipids promote crystallization but slow down polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *J. Control. Release* 107, 229–243. doi:10.1016/j.jconrel.2005.06.004
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2003. Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 92, 1509–1520. doi:10.1002/jps.10413
- Bunjes, H., Koch, M.H.J., Westesen, K., 2000. Effect of particle size on colloidal solid triglycerides. *Langmuir* 16, 5234–5241. doi:10.1021/la990856l

- Bunjes, H., Steiniger, F., Richter, W., 2007. Visualizing the structure of triglyceride nanoparticles in different crystal modifications. *Langmuir* 23, 4005–4011. doi:10.1021/la062904p
- Bunjes, H., Unruh, T., 2007. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 379–402. doi:10.1016/j.addr.2007.04.013
- Bunjes, H., Westesen, K., Koch, M.H.J., 1996. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 129, 159–173. doi:10.1016/0378-5173(95)04286-5
- Burgess, D.J., Hussain, A.S., Ingallinera, T.S., Chen, M.L., 2002. Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: Workshop report. *AAPS PharmSci* 4. doi:10.1208/ps040205
- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Başaran, E., Yenilmez, E., Yazan, Y., 2016a. Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 109, 174–183. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.017
- Büyükköroğlu, G., Şenel, B., Gezgin, S., Dinh, T., 2016b. The simultaneous delivery of paclitaxel and Herceptin® using solid lipid nanoparticles: In vitro evaluation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 35, 98–105. doi:10.1016/j.jddst.2016.06.010
- Cárdenas, Z.J., Jiménez, D.M., Delgado, D.R., Almanza, O.A., Jouyban, A., Martínez, F., Acree, W.E., 2017. Solubility and preferential solvation of some n-alkyl-parabens in methanol+water mixtures at 298.15K. *J. Chem. Thermodyn.* 108, 26–37. doi:10.1016/j.jct.2017.01.005
- Carrillo, C., Sánchez-Hernández, N., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Suñé-Negre, J.M., Ticó, J.R., Suñé, C., Miñarro, M., 2013. DNA delivery via cationic solid lipid nanoparticles (SLNs). *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 157–165. doi:10.1016/j.ejps.2013.02.011
- Carstensen, H., Müller, B.W., Müller, R.H., 1991. Adsorption of ethoxylated surfactants on nanoparticles. I. Characterization by hydrophobic interaction chromatography. *Int. J. Pharm.* 67, 29–37. doi:10.1016/0378-5173(91)90262-M
- Casadei, M.A., Cerreto, F., Cesa, S., Giannuzzo, M., Feeney, M., Marianecchi, C., Paolicelli, P., 2006. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: A new drug delivery system for oral formulations. *Int. J. Pharm.* 325, 140–6. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.06.012
- Cattoz, B., Cosgrove, T., Crossman, M., Prescott, S.W., 2012. Surfactant-mediated desorption of polymer from the nanoparticle interface. *Langmuir* 28, 2485–2492. doi:10.1021/la204512d
- Cavalli, R., Caputo, O., Eugenia, M., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R., 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 148, 47–54. doi:10.1016/S0378-5173(96)04822-3
- Cavalli, R., Caputo, O., Gasco, M.R., 1993. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *Int. J. Pharm.* 89, 0–3. doi:10.1016/0378-5173(93)90313-5
- Cerreto, F., Paolicelli, P., Cesa, S., Amara, H.M.A., D’Auria, F.D., Simonetti, G., Casadei, M.A., 2013.

- Solid lipid nanoparticles as effective reservoir systems for long-term preservation of multidose formulations. *AAPS PharmSciTech* 14, 847–853. doi:10.1208/s12249-013-9972-y
- Chaban, V. V., Khandelia, H., 2014. Lipid structure in triolein lipid droplets. *J. Phys. Chem. B* 118, 10335–10340. doi:10.1021/jp503223z
- Chantaburanan, T., Teeranachaideekul, V., Chantasart, D., Jintapattanakit, A., Junyaprasert, V.B., 2017. Effect of binary solid lipid matrix of wax and triglyceride on lipid crystallinity, drug-lipid interaction and drug release of ibuprofen-loaded solid lipid nanoparticles (SLN) for dermal delivery. *J. Colloid Interface Sci.* 504, 247–256. doi:10.1016/j.jcis.2017.05.038
- Chapman, D., 1962. The polymorphism of glycerides. *Chem. Rev.* 62, 433–456. doi:10.1021/cr60219a003
- Charcosset, C., El-Harati, A., Fessi, H., 2005. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *J. Control. release* 108, 112–20. doi:10.1016/j.jconrel.2005.07.023
- Charoenputtakun, P., Li, S.K., Ngawhirunpat, T., 2015. Iontophoretic delivery of lipophilic and hydrophilic drugs from lipid nanoparticles across human skin. *Int. J. Pharm.* 495, 318–328. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.08.094
- Chidambaram, N., Burgess, D.J., 1999. A novel in vitro release method for submicron-sized dispersed systems. *AAPS PharmSci* 1, 1–9. doi:10.1208/ps010311
- Chirio, D., Gallarate, M., Peira, E., Battaglia, L., Muntoni, E., Riganti, C., Biasibetti, E., Capucchio, M.T., Valazza, A., Panciani, P., Lanotte, M., Annovazzi, L., Caldera, V., Mellai, M., Filice, G., Corona, S., Schiffer, D., 2014. Positive-charged solid lipid nanoparticles as paclitaxel drug delivery system in glioblastoma treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 88, 746–758. doi:10.1016/j.ejpb.2014.10.017
- Chirio, D., Gallarate, M., Peira, E., Battaglia, L., Serpe, L., Trotta, M., 2011. Formulation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles produced by fatty acids coacervation technique. *J. Microencapsul.* 28, 537–548. doi:10.3109/02652048.2011.590615
- Clares, B., Calpena, A.C., Parra, A., Abrego, G., Alvarado, H., Fanguero, J.F., Souto, E.B., 2014. Nanoemulsions (NEs), liposomes (LPs) and solid lipid nanoparticles (SLNs) for retinyl palmitate: Effect on skin permeation. *Int. J. Pharm.* 473, 591–598. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.001
- Czamara, K., Majzner, K., Pacia, M.Z., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., 2015. Raman spectroscopy of lipids: A review. *J. Raman Spectrosc.* 46, 4–20. doi:10.1002/jrs.4607
- Da Silva, E., Bresson, S., Rousseau, D., 2009. Characterization of the three major polymorphic forms and liquid state of tristearin by Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 157, 113–119. doi:10.1016/j.chemphyslip.2008.11.002
- Da Silva, E., Rousseau, D., 2010. Raman spectroscopy for the study of molecular order, thermodynamics, and solid-liquid transitions in triacylglycerols, en: Li-Chan, E.C.Y. (Ed.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, pp. 1–17.

doi:10.1002/0470027320.s8947

- Da Silva, E., Rousseau, D., 2008. Molecular order and thermodynamics of the solid-liquid transition in triglycerides via Raman spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 10, 4606–4613. doi:10.1039/b717412h
- Dahan, A., Hoffman, A., 2007. The effect of different lipid based formulations on the oral absorption of lipophilic drugs: The ability of in vitro lipolysis and consecutive ex vivo intestinal permeability data to predict in vivo bioavailability in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 96–105. doi:10.1016/j.ejpb.2007.01.017
- Dan, N., 2016. Compound release from nanostructured lipid carriers (NLCs). *J. Food Eng.* 171, 37–43. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.10.005
- Dan, N., 2014. Nanostructured lipid carriers: Effect of solid phase fraction and distribution on the release of encapsulated materials. *Langmuir* 30, 13809–13814. doi:10.1021/la5030197
- Das, S., Ng, W.K., Tan, R.B.H., 2012. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 139–151. doi:10.1016/j.ejps.2012.05.010
- Davis, S., Haldipur, J., Zhao, Y., Dan, N., Pan, Y., Nitin, N., Tikekar, R. V., 2015. Effect of distribution of solid and liquid lipid domains on transport of free radicals in nanostructured lipid carriers. *LWT - Food Sci. Technol.* 64, 14–17. doi:10.1016/j.lwt.2015.05.013
- De Souza, A.L.R., Andreani, T., Nunes, F.M., Cassimiro, D.L., De Almeida, A.E., Ribeiro, C.A., Sarmiento, V.H.V., Gremião, M.P.D., Silva, A.M., Souto, E.B., 2012. Loading of praziquantel in the crystal lattice of solid lipid nanoparticles: Studies by DSC and SAXS. *J. Therm. Anal. Calorim.* 108, 353–360. doi:10.1007/s10973-011-1871-4
- Delgado, A. V, González-Caballero, F., Hunter, R.J., Koopal, L.K., Lyklema, J., 2005. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 77, 1753–1805. doi:10.1351/pac200577101753
- Deshpande, A., Mohamed, M., Daftardar, S.B., Patel, M., Boddur, S.H.S., Nesamony, J., 2017. Chapter 12 – Solid Lipid Nanoparticles in Drug Delivery: Opportunities and Challenges, en: *Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices*. pp. 291–330. doi:10.1016/B978-0-323-42978-8.00012-7
- Devani, M.J., Ashford, M., Craig, D.Q.M., 2005. The development and characterisation of triglyceride-based ‘spontaneous’ multiple emulsions. *Int. J. Pharm.* 300, 76–88. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.05.011
- Doktorovova, S., Shegokar, R., Martins-Lopes, P., Silva, A.M., Lopes, C.M., Müller, R.H., Souto, E.B., 2012. Modified Rose Bengal assay for surface hydrophobicity evaluation of cationic solid lipid nanoparticles (cSLN). *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 606–612. doi:10.1016/j.ejps.2011.12.016

- Domalski, E.S., Hearing, E.D., 1996. Heat Capacities and Entropies of Organic Compounds in the Condensed Phase. Volume III. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 25, 1–525. doi:10.1063/1.555985
- Domb, A.J., 1995. Long acting injectable oxytetracycline-liposphere formulations. *Int. J. Pharm.* 124, 271–278. doi:10.1016/0378-5173(95)00098-4
- Dong, Y. Da, Boyd, B.J., 2011. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. *Int. J. Pharm.* 417, 101–111. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.01.022
- Dong, X., Mattingly, C.A., Tseng, M., Cho, M., Adams, V.R., Mumper, R.J., 2009. Development of new lipid-based paclitaxel nanoparticles using sequential simplex optimization. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 9–17. doi:10.1016/j.ejpb.2008.11.012
- Dong, Y., Ng, W.K., Shen, S., Kim, S., Tan, R.B.H., 2012. Solid lipid nanoparticles: Continuous and potential large-scale nanoprecipitation production in static mixers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 94, 68–72. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.01.018
- Douaire, M., di Bari, V., Norton, J.E., Sullo, A., Lillford, P., Norton, I.T., 2014. Fat crystallisation at oil–water interfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 203, 1–10. doi:10.1016/j.cis.2013.10.022
- Dyett, B., Zychowski, L., Bao, L., Meikle, T.G., Peng, S., Yu, H., Li, M., Strachan, J., Kirby, N., Logan, A., Conn, C.E., Zhang, X., 2018. Crystallization of femtoliter surface droplet arrays revealed by synchrotron small-angle X-ray scattering. *Langmuir* 34, 9470–9476. doi:10.1021/acs.langmuir.8b01252
- Eckert, K.A., Dasgupta, S., Selge, B., Ay, P., 2016. Solid liquid phase diagrams of binary fatty acid mixtures - palmitic/stearic with oleic/linoleic/linolenic acid mixture. *Thermochim. Acta* 630, 50–63. doi:10.1016/j.tca.2016.02.008
- Fadda, P., Monduzzi, M., Caboi, F., Piras, S., Lazzari, P., 2013. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: Influence of microemulsion microstructure. *Int. J. Pharm.* 446, 166–175. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.02.027
- Fang, G., Tang, B., Chao, Y., Xu, H.H., Gou, J., Zhang, Y., Xu, H.H., Tang, X., 2015. Cysteine-functionalized nanostructured lipid carriers for oral delivery of docetaxel: A permeability and pharmacokinetic study. *Mol. Pharm.* 12, 2384–2395. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00081
- Fang, J.Y., Fang, C.L., Liu, C.H., Su, Y.H., 2008. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70, 633–640. doi:10.1016/j.ejpb.2008.05.008
- Farboud, E.S., Nasrollahi, S.A., Tabbakhi, Z., 2011. Novel formulation and evaluation of a Q10-loaded solid lipid nanoparticle cream: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Nanomedicine* 6, 611–617. doi:10.2147/IJN.S16815
- Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., Shahidi, F., 2013. Hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers for food fortification: Preparation, characterization, and modeling. *Food Bioprocess Technol.* 6, 1464–1475. doi:10.1007/s11947-012-0845-2

- Fazly Bazzaz, B.S., Khameneh, B., Zarei, H., Golmohammadzadeh, S., 2016. Antibacterial efficacy of rifampin loaded solid lipid nanoparticles against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Microb. Pathog.* 93, 137–44. doi:10.1016/j.micpath.2015.11.031
- Feng, Y., Grant, D.J.W., 2006. Influence of crystal structure on the compaction properties of n-alkyl 4-hydroxybenzoate esters (parabens). *Pharm. Res.* 23, 1608–1616. doi:10.1007/s11095-006-0275-9
- Finke, J.H., Richter, C., Gothsch, T., Kwade, A., Büttgenbach, S., Müller-Goymann, C.C., 2014. Coumarin 6 as a fluorescent model drug: How to identify properties of lipid colloidal drug delivery systems via fluorescence spectroscopy? *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1234–1246. doi:10.1002/ejlt.201300413
- Fischer, K., Schmidt, M., 2016. Pitfalls and novel applications of particle sizing by dynamic light scattering. *Biomaterials* 98, 79–91. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.05.003
- Fontenele, D.M.A., Bandan, R.A.P.B., Guenter, K.T., Gioielli, L.A., Grimaldi, R., Cardoso, L.P., Guaraldo, G.L.A., 2015. Advances in lipids crystallization technology, en: *Advanced Topics in Crystallization*. InTech, pp. 105–132. doi:10.5772/59767
- Forster, S., Buckton, G., Beezer, A.E., 1991. The importance of chain length on the wettability and solubility of organic homologs. *Int. J. Pharm.* 72, 29–34. doi:10.1016/0378-5173(91)90377-Z
- Foubert, I., Vanhoutte, B., Dewettinck, K., 2004. Temperature and concentration dependent effect of partial glycerides on milk fat crystallization. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 531–539. doi:10.1002/ejlt.200400979
- Freitas, C., Müller, R.H., 1999. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 47, 125–132. doi:10.1016/S0939-6411(98)00074-5
- Freitas, C., Müller, R.H., 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN®) dispersions. *Int. J. Pharm.* 168, 221–229. doi:10.1016/S0378-5173(98)00092-1
- Friedrich, I., Müller-Goymann, C., 2003. Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56, 111–119. doi:10.1016/S0939-6411(03)00043-2
- Gandolfo, F.G., Bot, A., Flöter, E., 2003. Phase diagram of mixtures of stearic acid and stearyl alcohol. *Thermochim. Acta* 404, 9–17. doi:10.1016/S0040-6031(03)00086-8
- Ganesan, P., Narayanasamy, D., 2017. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain. Chem. Pharm.* 6, 37–56. doi:10.1016/j.scp.2017.07.002
- Gao, S., McClements, D.J., 2016. Formation and stability of solid lipid nanoparticles fabricated using

- phase inversion temperature method. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 499, 79–87. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.03.065
- García-Fuentes, M., Alonso, M.J., Torres, D., 2005. Design and characterization of a new drug nanocarrier made from solid-liquid lipid mixtures. *J. Colloid Interface Sci.* 285, 590–598. doi:10.1016/j.jcis.2004.10.012
- García-Fuentes, M., Torres, D., Martín-Pastor, M., Alonso, M.J., 2004. Application of NMR spectroscopy to the characterization of PEG-stabilized lipid nanoparticles. *Langmuir* 20, 8839–8845. doi:10.1021/la049505j
- Garg, A., Singh, S., 2011. Enhancement in antifungal activity of eugenol in immunosuppressed rats through lipid nanocarriers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 87, 280–288. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.05.030
- Gasco, M.R., 2007. Lipid nanoparticles: Perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 377–378. doi:10.1016/j.addr.2007.05.004
- Gasco, M.R., 1993. Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution. U.S. Patent No. 5,250,236.
- Gastaldi, L., Battaglia, L., Peira, E., Chirio, D., Muntoni, E., Solazzi, I., Gallarate, M., Dosio, F., 2014. Solid lipid nanoparticles as vehicles of drugs to the brain: Current state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 433–444. doi:10.1016/j.ejpb.2014.05.004
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69, 1–9. doi:10.1016/j.ejpb.2007.08.001
- Gehrer, S., Schmiele, M., Westermann, M., Steiniger, F., Unruh, T., 2014. Liquid crystalline phase formation in suspensions of solid trimyristin nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 118, 11387–11396. doi:10.1021/jp506787v
- Ghebeh, H., Handa-Corrigan, A., Butler, M., 1998. Development of an assay for the measurement of the surfactant pluronic F-68 in mammalian cell culture medium. *Anal. Biochem.* 262, 39–44. doi:10.1006/abio.1998.2750
- Giordano, F., Bettini, R., Donini, C., Gazzaniga, A., Caira, M.R., Zhang, G.G.Z., Grant, D.J.W., 1999. Physical properties of parabens and their mixtures: Solubility in water, thermal behavior, and crystal structures. *J. Pharm. Sci.* 88, 1210–1216. doi:10.1021/js9900452
- Göke, K., Bunjes, H., 2018. Carrier characteristics influence the kinetics of passive drug loading into lipid nanoemulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 126, 132–139. doi:10.1016/j.ejpb.2017.08.004
- Göke, K., Roese, E., Arnold, A., Kuntsche, J., Bunjes, H., 2016. Control over particle size distribution by autoclaving poloxamer-stabilized trimyristin nanodispersions. *Mol. Pharm.* 13, 3187–3195. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00395
- Göke, K., Roese, E., Bunjes, H., 2018. Heat treatment of poloxamer-stabilized triglyceride

- nanodispersions: Effects and underlying mechanism. *Mol. Pharm.* 15, 3111–3120. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.8b00202
- Gordillo-Galeano, A., Mora-Huertas, C.E., 2018. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 133, 285–308. doi:S0939641118310610
- Granero, G.E., Ramachandran, C., Amidon, G.L., 2005. Dissolution and solubility behavior of fenofibrate in sodium lauryl sulfate solutions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 31, 917–922. doi:10.1080/03639040500272108
- Gregoriadis, G., Senior, J., Poste, G., 1986. Targeting of drugs with synthetic systems. Springer US, Boston, MA. doi:10.1007/978-1-4684-5185-6
- Güney, G., Kutlu, H.M., Genç, L., 2014. Preparation and characterization of ascorbic acid loaded solid lipid nanoparticles and investigation of their apoptotic effects. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 121, 270–280. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.008
- Guo, T., Zhang, Y., Zhao, J., Zhu, C., Feng, N., 2015. Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from *Aconitum sinomontanum*. *J. Nanobiotechnology* 13, 1–14. doi:10.1186/s12951-015-0107-3
- Güres, S., Siepmann, F., Siepmann, J., Kleinebudde, P., 2012. Drug release from extruded solid lipid matrices: Theoretical predictions and independent experiments. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 122–129. doi:10.1016/j.ejpb.2011.10.002
- Haag, S.F., Chen, M., Peters, D., Keck, C.M., Taskoparan, B., Fahr, A., Teutloff, C., Bittl, R., Lademann, J., Schäfer-Korting, M., Meinke, M.C., 2011. Nanostructured lipid carriers as nitroxide depot system measured by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 421, 364–369. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.10.009
- Hagemann, J.W., Rothfus, J.A., 1983. Polymorphism and transformation energetics of saturated monoacid triglycerides from differential scanning calorimetry and theoretical modeling. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 1123–1131. doi:10.1007/BF02671340
- Heiati, H., Phillips, N.C., Tawashi, R., 1996. Evidence for phospholipid bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipid and triglyceride. *Pharm. Res.* 13, 1406–1410. doi:10.1023/A:1016090420759
- Heiati, H., Tawashi, R., Phillips, N.C., 1998. Drug retention and stability of solid lipid nanoparticles containing azidothymidine palmitate after autoclaving, storage and lyophilization. *J. Microencapsul.* 15, 173–184. doi:10.3109/02652049809006847
- Helena de Abreu-Martins, H., Artiga-Artigas, M., Hilsdorf Piccoli, R., Martín-Belloso, O., Salvia-Trujillo, L., 2020. The lipid type affects the in vitro digestibility and β -carotene bioaccessibility of liquid or solid lipid nanoparticles. *Food Chem.* 311, 126024. doi:10.1016/j.foodchem.2019.126024

- Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., Decker, E.A., McClements, D.J., Weiss, J., 2009a. Impact of surfactant properties on oxidative stability of β -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* 57, 8033–8040. doi:10.1021/jf901682m
- Helgason, T., Awad, T.S., Kristbergsson, K., McClements, D.J., Weiss, J., 2009b. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Colloid Interface Sci.* 334, 75–81. doi:10.1016/j.jcis.2009.03.012
- Henneré, G., Prognon, P., Brion, F., Rosilio, V., Nicolis, I., 2009. Molecular dynamics simulation of a mixed lipid emulsion model: Influence of the triglycerides on interfacial phospholipid organization. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* 901, 174–185. doi:10.1016/j.theochem.2009.01.020
- Henriksen, I., Sande, S.A., Smistad, G., Ågren, T., Karlsen, J., 1995. In vitro evaluation of drug release kinetics from liposomes by fractional dialysis. *Int. J. Pharm.* 119, 231–238. doi:10.1016/0378-5173(94)00403-R
- Hernqvist, L., 1984. On the structure of triglycerides in the liquid state and fat crystallization. *Fette, Seifen, Anstrichm.* 86, 297–300. doi:10.1002/lipi.19840860802
- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., Benoît, J.P., 2003. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 24, 4283–4300. doi:10.1016/S0142-9612(03)00331-4
- Hiemenz, P.C., Rajagopalan, R., 1997. *Principles of Colloid and Surface Chemistry*, Third Edit. ed. CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300, Boca Raton, FL 33487-2742.
- Howard, M.D., Lu, X., Rinehart, J.J., Jay, M., Dziubla, T.D., 2011. Physicochemical characterization of nanotemplate engineered solid lipid nanoparticles. *Langmuir* 27, 1964–1971. doi:10.1021/la104262k
- Hsu, W.D., Violi, A., 2009. Order-disorder phase transformation of triacylglycerols: Effect of the structure of the aliphatic chains. *J. Phys. Chem. B* 113, 887–893. doi:10.1021/jp806440d
- Hu, F.-Q.Q., Jiang, S.-P.P., Du, Y.-Z.Z., Yuan, H., Ye, Y.-Q.Q., Zeng, S., 2006. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* 314, 83–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.040
- Hu, F.Q., Hong, Y., Yuan, H., 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *Int. J. Pharm.* 273, 29–35. doi:10.1016/j.ijpharm.2003.12.016
- Hu, F.Q., Jiang, S.P., Du, Y.Z., Yuan, H., Ye, Y.Q., Zeng, S., 2005. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 45, 167–73. doi:10.1016/j.colsurfb.2005.08.005
- ICH, 2005. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. *Int. Conf. Harmon.* 1994, 17.
- Illing, A., Unruh, T., 2004. Investigation on the flow behavior of dispersions of solid triglyceride nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 284, 123–131. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.07.017

- Inoue, T., Hisatsugu, Y., Yamamoto, R., Suzuki, M., 2004. Solid-liquid phase behavior of binary fatty acid mixtures: 1. Oleic acid/stearic acid and oleic acid/behenic acid mixtures. *Chem. Phys. Lipids* 127, 143–152. doi:10.1016/j.chemphyslip.2003.09.014
- Islam, S.D.M., Ito, O., 1999. Solvent effects on rates of photochemical reactions of rose bengal triplet state studied by nanosecond laser photolysis. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 123, 53–59. doi:10.1016/S1010-6030(99)00042-8
- Islan, G.A., Tornello, P.C., Abraham, G.A., Duran, N., Castro, G.R., 2016. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 143, 168–176. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.03.040
- ISO, 2012. Colloidal systems — Methods for zeta potential determination Part 2: Optical methods (ISO 13099-2:2012).
- ISO, 1996. Particle size analysis - Photon correlation spectroscopy (ISO 13321:1996).
- Iwahashi, M., Kasahara, Y., 2011. Dynamic molecular movements and aggregation structures of lipids in a liquid state. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 16, 359–366. doi:10.1016/j.cocis.2011.06.005
- Izquierdo, P., Esquena, J., Tadros, T.F., Dederen, C., Garcia, M.J., Azemar, N., Solans, C., 2002. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. *Langmuir* 18, 26–30. doi:10.1021/la010808c
- Jain, A., Singhai, P., Gurnany, E., Updhyay, S., Mody, N., 2013. Transferrin-tailored solid lipid nanoparticles as vectors for site-specific delivery of temozolomide to brain. *J. Nanoparticle Res.* 15. doi:10.1007/s11051-013-1518-4
- Jain, A.K., Jain, Ashay, Garg, N.K., Agarwal, A., Jain, Atul, Jain, S.A., Tyagi, R.K., Jain, R.K., Agrawal, H., Agrawal, G.P., 2014. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 121, 222–229. doi:10.1016/j.colsurfb.2014.05.041
- Jenning, V., Mäder, K., Gohla, S.H., 2000a. Solid lipid nanoparticles (SLNTM) based on binary mixtures of liquid and solid lipids: a ¹H-NMR study. *Int. J. Pharm.* 205, 15–21. doi:10.1016/S0378-5173(00)00462-2
- Jenning, V., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., Thünemann, A.F., Gohla, S.H., 2000b. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *Int. J. Pharm.* 199, 167–177. doi:10.1016/S0378-5173(00)00378-1
- Jores, K., Haberland, A., Wartewig, S., Mäder, K., Mehnert, W., 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and raman spectroscopy. *Pharm. Res.* 22, 1887–1897. doi:10.1007/s11095-005-7148-5
- Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., Mäder, K., 2004. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. *J.*

- Control. Release 95, 217–227. doi:10.1016/j.jconrel.2003.11.012
- Jores, K., Mehnert, W., Mäder, K., 2003. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles and on oil-loaded solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electron spin resonance study. *Pharm. Res.* 20, 1274–1283. doi:10.1023/A:1025065418309
- Jose, J., Burgess, K., 2006. Benzophenoxazine-based fluorescent dyes for labeling biomolecules. *Tetrahedron* 62, 11021–11037. doi:10.1016/j.tet.2006.08.056
- Jose, S., Anju, S.S., Cinu, T.A., Aleykutty, N.A., Thomas, S., Souto, E.B., 2014. In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery. *Int. J. Pharm.* 474, 6–13. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.003
- Joshi, M.D., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 71, 161–172. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.003
- Kabanov, A. V, Batrakova, E. V, Alakhov, V.Y., 2002. Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J. Control. Release* 82, 189–212. doi:10.1016/S0168-3659(02)00009-3
- Kalaycioglu, G.D., Aydogan, N., 2016. Preparation and investigation of solid lipid nanoparticles for drug delivery. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 510, 77–86. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.06.034
- Keck, C.M., Baisaeng, N., Durand, P., Prost, M., Meinke, M.C., Müller, R.H., 2014a. Oil-enriched, ultra-small nanostructured lipid carriers (usNLC): A novel delivery system based on flip-flop structure. *Int. J. Pharm.* 477, 227–235. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.10.029
- Keck, C.M., Kovačević, A.B., Müller, R.H., Savić, S., Vuleta, G., Milić, J., 2014b. Formulation of solid lipid nanoparticles (SLN): The value of different alkyl polyglucoside surfactants. *Int. J. Pharm.* 474, 33–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.08.008
- Kern, S.F., 1953. X-Ray Testing and Research on Pharmaceuticals. *Anal. Chem.* 25, 731–734. doi:10.1021/ac60077a013
- Khalil, R.M., Abd-Elbary, A., Kassem, M.A., Ghorab, M.M., Basha, M., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLCs) versus solid lipid nanoparticles (SLNs) for topical delivery of meloxicam. *Pharm. Dev. Technol.*
- 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* 6, 753–9. doi:10.1016/j.nano.2010.06.003
- Khurana, S., Bedi, P.M.S., Jain, N.K., 2013. Preparation and evaluation of solid lipid nanoparticles based nanogel for dermal delivery of meloxicam. *Chem. Phys. Lipids* 175–176, 65–72. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.07.010
- Kim, J.H., Kim, Y., Bae, K.H., Park, T.G., Lee, J.H., Park, K., 2015. Tumor-targeted delivery of paclitaxel using low density lipoprotein-mimetic solid lipid nanoparticles. *Mol. Pharm.* 12, 1230–

1241. doi:10.1021/mp500737y
- Kim, J.K., Park, J.S., Kim, C.K., 2010. Development of a binary lipid nanoparticles formulation of itraconazole for parenteral administration and controlled release. *Int. J. Pharm.* 383, 209–215. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.09.008
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F., 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron* 43, 85–103. doi:10.1016/j.micron.2011.07.014
- Kloek, W., Walstra, P., Van Vliet, T., 2000. Nucleation kinetics of emulsified triglyceride mixtures. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 643–652. doi:10.1007/s11746-000-0104-7
- Kovačević, A.B., Müller, R.H., Savić, S.D., Vuleta, G.M., Keck, C.M., 2014. Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 444, 15–25. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.12.023
- Kovačević, A.B., Savić, S.D., Vuleta, G.M., Müller, R.H., Keck, C.M., 2011. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int. J. Pharm.* 406, 163–72. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.12.036
- Kumar, N., Goindi, S., Saini, B., Bansal, G., 2014. Thermal characterization and compatibility studies of itraconazole and excipients for development of solid lipid nanoparticles. *J. Therm. Anal. Calorim.* 115, 2375–2383. doi:10.1007/s10973-013-3237-6
- Kumar, R., Yasir, M., Saraf, S.A., Gaur, P.K., Kumar, Y., Singh, A.P., 2013. Glyceryl monostearate based nanoparticles of mefenamic acid: Fabrication and in vitro characterization. *Drug Invent. Today* 5, 246–250. doi:10.1016/j.dit.2013.06.011
- Kumar, S., Randhawa, J.K., 2013. High melting lipid based approach for drug delivery: Solid lipid nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 1842–1852. doi:10.1016/j.msec.2013.01.037
- Kuntsche, J., Horst, J.C., Bunjes, H., 2011. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *Int. J. Pharm.* 417, 120–137. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.02.001
- Kuo, Y.-C., Chung, C.Y., 2011. Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 88, 682–90. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.07.060
- Kupetz, E., Bunjes, H., 2014. Lipid nanoparticles: Drug localization is substance-specific and achievable load depends on the size and physical state of the particles. *J. Control. Release* 189, 54–64. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.007
- Lacerda, S.P., Cerize, N.N.P., Ré, M.I., 2011. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. *Int. J. Cosmet. Sci.* 33, 312–321. doi:10.1111/j.1468-2494.2010.00626.x

- Larsen, S.W., Østergaard, J., Yaghmur, A., Jensen, H., Larsen, C., 2013. Use of in vitro release models in the design of sustained and localized drug delivery systems for subcutaneous and intra-articular administration. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 23, 315–324. doi:10.1016/S1773-2247(13)50048-7
- Lawler, P., Dimick, P., 2008. Crystallization and polymorphism of fats, en: Akoh, C.C., Min, D.B. (Eds.), *Food Lipids. Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. CRC Press, pp. 275–300. doi:10.1201/9781420046649.ch9
- Lee, A.G., 1977. Lipid phase transitions and phase diagrams II. Mixtures involving lipids. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 472, 285–344. doi:10.1016/0304-4157(77)90001-6
- Lee, M.-K., Lim, S.-J., Kim, C.-K., 2007. Preparation, characterization and in vitro cytotoxicity of paclitaxel-loaded sterically stabilized solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 28, 2137–2146. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.014
- Lee, S., Kwon, J.A., Park, K.H., Jin, C.M., Joo, J.B., Choi, I., 2018. Controlled drug release with surface-capped mesoporous silica nanoparticles and its label-free in situ Raman monitoring. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 131, 232–239. doi:10.1016/j.ejpb.2018.08.012
- Leonardi, A., Bucolo, C., Romano, G.L., Platania, C.B.M., Drago, F., Puglisi, G., Pignatello, R., 2014. Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 470, 133–140. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.04.061
- Leong, T.S.H., Wooster, T.J., Kentish, S.E., Ashokkumar, M., 2009. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrason. Sonochem.* 16, 721–727. doi:10.1016/j.ultsonch.2009.02.008
- Levy, M.Y., Benita, S., 1990. Drug release from submicronized o/w emulsion: a new in vitro kinetic evaluation model. *Int. J. Pharm.* 66, 29–37. doi:10.1016/0378-5173(90)90381-D
- Li, Q., Cai, T., Huang, Y., Xia, X., Cole, S., Cai, Y., 2017. A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. *Nanomaterials* 7, 122. doi:10.3390/nano7060122
- Li, R., Eun, J.S., Lee, M.-K., 2011. Pharmacokinetics and biodistribution of paclitaxel loaded in pegylated solid lipid nanoparticles after intravenous administration. *Arch. Pharm. Res.* 34, 331–337. doi:10.1007/s12272-011-0220-2
- Li, Z., Yu, L., Zheng, L., Geng, F., 2010. Studies on crystallinity state of puerarin loaded solid lipid nanoparticles prepared by double emulsion method. *J. Therm. Anal. Calorim.* 99, 689–693. doi:10.1007/s10973-009-0127-z
- Lim, S.J., Kim, C., 2002. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 243, 135–146. doi:10.1016/S0378-5173(02)00269-7
- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G., 1991a. Compounds containing the carbonyl group, en: Colthup, N.B. (Ed.), *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, New York, pp. 117–154. doi:10.1016/b978-0-08-057116-4.50015-8

- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G., 1991b. Aromatic and heteroaromatic rings, en: Colthup, N.B. (Ed.), *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, New York, pp. 277–306. doi:10.1016/b978-0-08-057116-4.50023-7
- Lin-Vien, D., Colthup, N.B., Fateley, W.G., Grasselli, J.G., 1991c. Alcohols and phenols, en: Colthup, N.B. (Ed.), *The Handbook of Infrared and Raman Characteristic Frequencies of Organic Molecules*. Academic Press, New York, pp. 45–60. doi:10.1016/B978-0-08-057116-4.50010-9
- Lin, W., Coombes, A.G., Garnett, M.C., Davies, M.C., Schacht, E., Davis, S.S., Illum, L., 1994. Preparation of sterically stabilized human serum albumin nanospheres using a novel Dextranox-MPEG crosslinking agent. *Pharm. Res.* 11, 1588–92. doi:10.1023/A:1018957704209
- Lin, X., Li, X., Zheng, L., Yu, L., Zhang, Q., Liu, W., 2007. Preparation and characterization of monocaprato nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 311, 106–111. doi:10.1016/j.colsurfa.2007.06.003
- Liu, D., Jiang, S., Shen, H., Qin, S., Liu, J., Zhang, Q., Li, R., Xu, Q., 2011. Diclofenac sodium-loaded solid lipid nanoparticles prepared by emulsion/solvent evaporation method. *J. Nanoparticle Res.* 13, 2375–2386. doi:10.1007/s11051-010-9998-y
- Liu, J., Gong, T., Fu, H., Wang, C., Wang, X., Chen, Q., Zhang, Q., He, Q., Zhang, Z., 2008. Solid lipid nanoparticles for pulmonary delivery of insulin. *Int. J. Pharm.* 356, 333–344. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.01.008
- Liu, Q., Zhang, S., Shen, S., Yun, J., Yao, K., 2011. Density and viscosity of ternary systems (Ploxamer 188 + Ethanol/Acetone + Water) at temperatures from 288.15 K to 308.15 K. *Chinese J. Chem. Eng.* 19, 478–483. doi:10.1016/S1004-9541(11)60009-8
- Liu, Y., Wang, L., Zhao, Y., He, M., Zhang, X., Niu, M., Feng, N., 2014. Nanostructured lipid carriers versus microemulsions for delivery of the poorly water-soluble drug luteolin. *Int. J. Pharm.* 476, 169–177. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.09.052
- Lobovkina, T., Jacobson, G.B., Gonzalez-Gonzalez, E., Hickerson, R.P., Leake, D., Kaspar, R.L., Contag, C.H., Zare, R.N., 2011. In vivo sustained release of siRNA from solid lipid nanoparticles. *ACS Nano* 5, 9977–9983. doi:10.1021/nm203745n
- Lombardi Borgia, S., Regehly, M., Sivaramakrishnan, R., Mehnert, W., Korting, H.C., Danker, K., Röder, B., Kramer, K.D., Schäfer-Korting, M., 2005. Lipid nanoparticles for skin penetration enhancement - Correlation to drug localization within the particle matrix as determined by fluorescence and paretic spectroscopy. *J. Control. Release* 110, 151–163. doi:10.1016/j.jconrel.2005.09.045
- Long, C., Zhang, L., Qian, Y., 2006. Mesoscale simulation of drug molecules distribution in the matrix of solid lipid microparticles (SLM). *Chem. Eng. J.* 119, 99–106. doi:10.1016/j.cej.2006.03.031
- Lu, F., Wu, S.-H., Hung, Y., Mou, C.-Y., 2009. Size effect on cell uptake in well-suspended, uniform mesoporous silica nanoparticles. *Small* 5, 1408–1413. doi:10.1002/smll.200900005

- Lukowski, G., Kasbohm, J., Pfflegel, P., Illing, A., Wulff, H., 2000. Crystallographic investigation of cetylpalmitate solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 196, 201–205. doi:10.1016/S0378-5173(99)00421-4
- Luo, Y., Teng, Z., Li, Y., Wang, Q., 2015. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydr. Polym.* 122, 221–229. doi:10.1016/j.carbpol.2014.12.084
- Lutton, E.S., 1945. The polymorphism of tristearin and some of its homologs. *J. Am. Chem. Soc.* 67, 524–527. doi:10.1021/ja01220a008
- Lv, Y., He, H., Qi, J., Lu, Y., Zhao, W., Dong, X., Wu, W., 2018. Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers. *Int. J. Pharm.* 547, 395–403. doi:10.1016/j.ijpharm.2018.06.025
- Magenheim, B., Levy, M.Y., Benita, S., 1993. A new in vitro technique for the evaluation of drug release profile from colloidal carriers - ultrafiltration technique at low pressure. *Int. J. Pharm.* 94, 115–123. doi:10.1016/0378-5173(93)90015-8
- Marangoni, A.G., Acevedo, N., Maleky, F., Co, E., Peyronel, F., Mazzanti, G., Quinn, B., Pink, D., 2012. Structure and functionality of edible fats. *Soft Matter* 8, 1275–1300. doi:10.1039/C1SM06234D
- Maretti, E., Rustichelli, C., Romagnoli, M., Balducci, A.G., Buttini, F., Sacchetti, F., Leo, E., Iannuccelli, V., 2016. Solid Lipid Nanoparticle assemblies (SLNas) for an anti-TB inhalation treatment—A Design of Experiments approach to investigate the influence of pre-freezing conditions on the powder respirability. *Int. J. Pharm.* 511, 669–679. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.062
- Marinova, K.G., Alargova, R.G., Denkov, N.D., Veleev, O.D., Petsev, D.N., Ivanov, I.B., Borwankar, R.P., 1996. Charging of oil–water interfaces due to spontaneous adsorption of hydroxyl ions. *Langmuir* 12, 2045–2051. doi:10.1021/la950928i
- Martinez, V., Henary, M., 2016. Nile Red and Nile Blue: Applications and syntheses of structural analogues. *Chem. - A Eur. J.* 22, 13764–13782. doi:10.1002/chem.201601570
- Martins, S., Tho, I., Souto, E.B., Ferreira, D., Brandl, M., 2012. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45, 613–623. doi:10.1016/j.ejps.2011.12.015
- Mazuryk, J., Deptuła, T., Polchi, A., Gapiński, J., Giovagnoli, S., Magini, A., Emiliani, C., Kohlbrecher, J., Patkowski, A., 2016. Rapamycin-loaded solid lipid nanoparticles: Morphology and impact of the drug loading on the phase transition between lipid polymorphs. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 502, 54–65. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.05.017
- Mehnert, W., Mäder, K., 2012. Solid lipid nanoparticles. Producción, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64, 83–101. doi:10.1016/j.addr.2012.09.021

- Metin, S., Hartel, R.W., 2005. Crystallization of fats and oils, en: Shahidi, F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 45–76. doi:10.1002/047167849X.bio021
- Miao, J., Du, Y., Yuan, H., Zhang, X., Li, Q., Rao, Y., Zhao, M., Hu, F., 2015. Improved cytotoxicity of paclitaxel loaded in nanosized lipid carriers by intracellular delivery. *J. Nanoparticle Res.* 17, 10. doi:10.1007/s11051-014-2852-x
- Miao, J., Du, Y.Z., Yuan, H., Zhang, X., Hu, F.Q., 2013. Drug resistance reversal activity of anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles in multi-drug resistant cancer cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 110, 74–80. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.03.037
- Miglietta, A., Cavalli, R., Bocca, C., Gabriel, L., Rosa Gasco, M., 2000. Cellular uptake and cytotoxicity of solid lipid nanospheres (SLN) incorporating doxorubicin or paclitaxel. *Int. J. Pharm.* 210, 61–67. doi:10.1016/S0378-5173(00)00562-7
- Milsmann, J., Oehlke, K., Greiner, R., Steffen-Heins, A., 2017. Fate of edible solid lipid nanoparticles (SLN) in surfactant stabilized o/w emulsions. Part 2: Release and partitioning behavior of lipophilic probes from SLN into different phases of o/w emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 1–0. doi:10.1016/j.colsurfa.2017.05.050
- Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briançon, S., Beney, L., Fessi, H., 2008. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *J. Colloid Interface Sci.* 317, 458–68. doi:10.1016/j.jcis.2007.09.081
- Mojahedian, M.M., Daneshamouz, S., Samani, S.M., Zargaran, A., 2013. A novel method to produce solid lipid nanoparticles using n-butanol as an additional co-surfactant according to the o/w microemulsion quenching technique. *Chem. Phys. Lipids* 174, 32–38. doi:10.1016/j.chemphyslip.2013.05.001
- Montenegro, L., Lai, F., Offerta, A., Sarpietro, M.G., Micicchè, L., Maccioni, A.M., Valenti, D., Fadda, A.M., 2015. From nanoemulsions to nanostructured lipid carriers: A relevant development in dermal delivery of drugs and cosmetics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 32, 100–112. doi:10.1016/j.jddst.2015.10.003
- Montenegro, L., Sarpietro, M.G., Ottimo, S., Puglisi, G., Castelli, F., 2011. Differential scanning calorimetry studies on sunscreen loaded solid lipid nanoparticles prepared by the phase inversion temperature method. *Int. J. Pharm.* 415, 301–306. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.076
- Mora-Huertas, C.E., 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. *Adv. Colloid Interface Sci.* 163, 90–122. doi:10.1016/j.cis.2011.02.005
- Mosallaei, N., Jaafari, M.R., Hanafi-Bojd, M.Y., Golmohammadzadeh, S., Malaekheh-Nikouei, B., 2013. Docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles: Preparation, characterization, in vitro, and in vivo evaluations. *J. Pharm. Sci.* 102, 1994–2004. doi:10.1002/jps.23522
- Mukherjee, S., Ray, S., Thakur, R.S., 2009. Solid lipid nanoparticles: A modern formulation approach

- in drug delivery system. *Indian J. Pharm. Sci.* 71, 349–358. doi:10.4103/0250-474X.57282
- Müller, R.H., Maassen, S., Schwarz, C., Mehnert, W., 1997. Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: Interaction with human granulocytes. *J. Control. Release* 47, 261–269. doi:10.1016/S0168-3659(97)01653-2
- Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S.H., 2000. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 50, 161–177. doi:10.1016/S0939-6411(00)00087-4
- Müller, R.H., Mäder, K., Lippacher, A., Jenning, V., 1999. Fest-flüssig (halbfeste) lipidpartikel (nanocompartment-carrier-NCC) und verfahren zur herstellung hochkonzentrierter lipidpartikel. Germany Patent DE19945203A1.
- Müller, R.H., Petersen, R.D., Hommoss, A., Pardeike, J., 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 522–530. doi:10.1016/j.addr.2007.04.012
- Müller, R.H., Runge, S.A., Ravelli, V., Thünemann, A.F., Mehnert, W., Souto, E.B., 2008. Cyclosporine-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®): Drug–lipid physicochemical interactions and characterization of drug incorporation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 68, 535–544. doi:10.1016/j.ejpb.2007.07.006
- Nafee, N., Husari, A., Maurer, C.K., Lu, C., de Rossi, C., Steinbach, A., Hartmann, R.W., Lehr, C.-M., Schneider, M., 2014. Antibiotic-free nanotherapeutics: Ultra-small, mucus-penetrating solid lipid nanoparticles enhance the pulmonary delivery and anti-virulence efficacy of novel quorum sensing inhibitors. *J. Control. Release* 192, 131–140. doi:10.1016/j.jconrel.2014.06.055
- Nahak, P., Karmakar, G., Chettri, P., Roy, B., Guha, P., Besra, S.E., Soren, A., Bykov, A.G., Akentiev, A. V, Noskov, B.A., Panda, A.K., 2016. Influence of lipid core material on physicochemical characteristics of an ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier: An attempt to enhance anticancer activity. *Langmuir* 32, 9816–9825. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02402
- Napper, D., 1977. Steric stabilization. *J. Colloid Interface Sci.* 58, 390–407. doi:10.1016/0021-9797(77)90150-3
- Negi, J.S., Chattopadhyay, P., Sharma, A.K., Ram, V., 2014. Development and evaluation of glyceryl behenate based solid lipid nanoparticles (SLNs) using hot self-nanoemulsification (SNE) technique. *Arch. Pharm. Res.* 37, 361–370. doi:10.1007/s12272-013-0154-y
- Nelson, A., Cosgrove, T., 2004. Dynamic light scattering studies of poly(ethylene oxide) adsorbed on laponite: Layer conformation and its effect on particle stability. *Langmuir* 20, 10382–10388. doi:10.1021/la049323p
- Nelson, D.D., Pan, Y., Tikekar, R. V, Dan, N., Nitin, N., 2017. Compound stability in nanoparticles: The effect of solid phase fraction on diffusion of degradation agents into nanostructured lipid carriers. *Langmuir* 33, 14115–14122. doi:10.1021/acs.langmuir.7b03407
- Ng, W.L., 1989. Nucleation behaviour of tripalmitin from a triolein solution. *J. Am. Oil Chem. Soc.*

- 66, 1103–1106. doi:10.1007/BF02670093
- Nik, A.M., Langmaid, S., Wright, A.J., 2012. Nonionic surfactant and interfacial structure impact crystallinity and stability of β -carotene loaded lipid nanodispersions. *J. Agric. Food Chem.* 60, 4126–4135. doi:10.1021/jf204810m
- Noack, A., Hause, G., Mäder, K., 2012. Physicochemical characterization of curcuminoid-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 423, 440–51. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.12.011
- Obeidat, W.M., Schwabe, K., Müller, R.H., Keck, C.M., 2010. Preservation of nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 56–67. doi:10.1016/j.ejpb.2010.05.001
- Oh, K.T., Bronich, T.K., Kabanov, A. V., 2004. Micellar formulations for drug delivery based on mixtures of hydrophobic and hydrophilic Pluronic® block copolymers. *J. Control. Release* 94, 411–422. doi:10.1016/j.jconrel.2003.10.018
- Ohshima, H., 2002. Electrophoretic mobility of a charged spherical colloidal particle covered with an uncharged polymer layer. *Electrophoresis* 23, 1995. doi:10.1002/1522-2683(200207)23:13<1995::AID-ELPS1995>3.0.CO;2-M
- Okuda, S., McClements, D.J., Decker, E.A., 2005. Impact of lipid physical state on the oxidation of methyl linolenate in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9624–9628. doi:10.1021/jf0518960
- Olbrich, C., Kayser, O., Müller, R.H., 2002a. Lipase degradation of Dynasan 114 and 116 solid lipid nanoparticles (SLN) - Effect of surfactants, storage time and crystallinity. *Int. J. Pharm.* 237, 119–128. doi:10.1016/S0378-5173(02)00035-2
- Olbrich, C., Kayser, O., Müller, R.H., 2002b. Enzymatic degradation of Dynasan 114 SLN - Effect of surfactants and particle size. *J. Nanoparticle Res.* 4, 121–129. doi:10.1023/A:1020159331420
- Olbrich, C., Müller, R.H., 1999. Enzymatic degradation of SLN—effect of surfactant and surfactant mixtures. *Int. J. Pharm.* 180, 31–39. doi:10.1016/S0378-5173(98)00404-9
- Olerile, L.D., Liu, Y., Zhang, B., Wang, T., Mu, S., Zhang, J., Selotlegeng, L., Zhang, N., 2017. Near-infrared mediated quantum dots and paclitaxel co-loaded nanostructured lipid carriers for cancer theragnostic. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 150, 121–130. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.11.032
- Oliveira, M.S., Mussi, S. V, Gomes, D.A., Yoshida, M.I., Frezard, F., Carregal, V.M., Ferreira, L.A.M., 2016. α -Tocopherol succinate improves encapsulation and anticancer activity of doxorubicin loaded in solid lipid nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 140, 246–53. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.12.019
- Palanuwech, J., Coupland, J.N., 2003. Effect of surfactant type on the stability of oil-in-water emulsions to dispersed phase crystallization. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 223, 251–262. doi:10.1016/S0927-7757(03)00169-9
- Paliwal, R., Paliwal, S.R., Agrawal, G.P., Vyas, S.P., 2011. Biomimetic solid lipid nanoparticles for oral bioavailability enhancement of low molecular weight heparin and its lipid conjugates: In

- vitro and in vivo evaluation. *Mol. Pharm.* 1314–1321. doi:10.1021/mp200109m
- Pan, Y., Tikekar, R. V., Nitin, N., 2016. Distribution of a model bioactive within solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers influences its loading efficiency and oxidative stability. *Int. J. Pharm.* 511, 322–330. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.019
- Pandita, D., Ahuja, A., Lather, V., Benjamin, B., Dutta, T., Velpandian, T., Khar, R.K., 2011. Development of lipid-based nanoparticles for enhancing the oral bioavailability of paclitaxel. *AAPS PharmSciTech* 12, 712–22. doi:10.1208/s12249-011-9636-8
- Pandita, D., Kumar, S., Poonia, N., Lather, V., 2014. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Res. Int.* 62, 1165–1174. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.059
- Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R.H., 2009. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.* 366, 170–184. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.10.003
- Pardeike, J., Weber, S., Haber, T., Wagner, J., Zarfl, H.P., Plank, H., Zimmer, A., 2011. Development of an Itraconazole-loaded nanostructured lipid carrier (NLC) formulation for pulmonary application. *Int. J. Pharm.* 419, 329–338. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.07.040
- Patel, N.K., Kostenbauder, H.B., 1958. Interaction of preservatives with macromolecules I. *J. Am. Pharm. Assoc. (Scientific ed.)* 47, 289–293. doi:10.1002/jps.3030470420
- Patist, A., Bhagwat, S.S., Penfield, K.W., Aikens, P., Shah, D.O., 2000. On the measurement of critical micelle concentrations of pure and technical-grade nonionic surfactants. *J. Surfactants Deterg.* 3, 53–58. doi:10.1007/s11743-000-0113-4
- Pattarino, F., Bettini, R., Foglio Bonda, A., Della Bella, A., Giovannelli, L., 2015. Polymorphism and kinetic behavior of binary mixtures of triglycerides. *Int. J. Pharm.* 473, 87–94. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.06.042
- Pecora, R., 2000. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res.* 2, 123–131. doi:10.1023/A:1010067107182
- Phipps, L.W., 1964. Heterogeneous and homogeneous nucleation in supercooled triglycerides and n-paraffins. *Trans. Faraday Soc.* 60, 1873. doi:10.1039/tf9646001873
- Pilcer, G., Amighi, K., 2010. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int. J. Pharm.* 392, 1–19. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.03.017
- Pink, D.L., Loruthai, O., Ziolek, R.M., Wasutrasawat, P., Terry, A.E., Lawrence, M.J., Lorenz, C.D., 2019. On the structure of solid lipid nanoparticles. *Small* 15. doi:10.1002/smll.201903156
- Povey, M.J.W., 2014. Crystal nucleation in food colloids. *Food Hydrocoll.* 42, 118–129. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.01.016
- Předota, M., Machesky, M.L., Wesolowski, D.J., 2016. Molecular origins of the zeta potential. *Langmuir* 32, 10189–10198. doi:10.1021/acs.langmuir.6b02493

- Priel, Z., Silberberg, A., 1978. The thickness of adsorbed polymer layers at a liquid–solid interface as a function of bulk concentration. *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 16, 1917–1925. doi:10.1002/pol.1978.180161102
- Qian, C., Decker, E.A., Xiao, H., McClements, D.J., 2013. Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Res. Int.* 52, 342–349. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.035
- 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. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 211–218. doi:10.1016/j.ejps.2005.06.001
- Radaic, A., Barbosa, L.R.S., Jaime, C., Kapila, Y.L., Pessine, F.B.T., de Jesus, M.B., 2016. How lipid cores affect lipid nanoparticles as drug and gene delivery systems, en: *Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly*. pp. 1–42. doi:10.1016/bs.abl.2016.04.001
- Rahman, Z., Zidan, A.S., Khan, M.A., 2010. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 76, 127–37. doi:10.1016/j.ejpb.2010.05.003
- Rao, M.P., Manjunath, K., Bhagawati, S.T., Thippeswamy, B.S., 2014. Bixin loaded solid lipid nanoparticles for enhanced hepatoprotection. Preparation, characterisation and in vivo evaluation. *Int. J. Pharm.* 473, 485–92. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.07.027
- Rasmussen, N., 1993. Facts, artifacts, and mesosomes: Practicing epistemology with the electron microscope. *Stud. Hist. Philos. Sci. Part A* 24, 227–265. doi:10.1016/0039-3681(93)90047-N
- Ribeiro, A.P.B., Masuchi, M.H., Miyasaki, E.K., Domingues, M.A.F., Stroppa, V.L.Z., de Oliveira, G.M., Kieckbusch, T.G., Paula, A., Ribeiro, B., Masuchi, M.H., Miyasaki, E.K., 2015. Crystallization modifiers in lipid systems. *J. Food Sci. Technol.* 52, 3925–3946. doi:10.1007/s13197-014-1587-0
- Rosenblatt, K.M., Bunjes, H., 2009. Poly(vinyl alcohol) as emulsifier stabilizes solid triglyceride drug carrier nanoparticles in the α -modification. *Mol. Pharm.* 6, 105–120. doi:10.1021/mp8000759
- Rosenblatt, K.M., Douroumis, D., Bunjes, H., 2007. Drug release from differently structured monoolein/poloxamer nanodispersions studied with differential pulse polarography and ultrafiltration at low pressure. *J. Pharm. Sci.* 96, 1564–1575. doi:10.1002/jps.20808
- Ross, S., Long, R.F., 1969. Electrophoresis as method of investigating electric double layer. *Ind. Eng. Chem.* 61, 58–71. doi:10.1021/ie50718a007
- Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Quinn, M.E. (Eds.), 2009. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth. ed. Pharmaceutical Press, American Pharmacists Association, London.
- Sadeghpour, A., Parada, M.L., Vieira, J., Povey, M., Rappolt, M., 2018. Global Small-Angle X-ray Scattering data analysis of triacylglycerols in the molten state (Part I). *J. Phys. Chem. B* 122, 10320–10329. doi:10.1021/acs.jpcc.8b06704
- Saeidpour, S., Lohan, S.B., Solik, A., Paul, V., Bodmeier, R., Zoubari, G., Bittl, R., Meinke, M.C.,

- Teutloff, C., 2017. Drug distribution in nanostructured lipid particles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 110, 19–23. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.008
- Salatin, S., Maleki Dizaj, S., Yari Khosroushahi, A., 2015. Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol. Int.* 39, 881–890. doi:10.1002/cbin.10459
- Salminen, H., Gömmel, C., Leuenberger, B.H., Weiss, J., 2016. Influence of encapsulated functional lipids on crystal structure and chemical stability in solid lipid nanoparticles: Towards bioactive-based design of delivery systems. *Food Chem.* 190, 928–937. doi:10.1016/j.foodchem.2015.06.054
- 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. *J. Colloid Interface Sci.* 426, 256–263. doi:10.1016/j.jcis.2014.04.009
- Sanna, V., Caria, G., Mariani, A., 2010. Effect of lipid nanoparticles containing fatty alcohols having different chain length on the ex vivo skin permeability of econazole nitrate. *Powder Technol.* 201, 32–36. doi:10.1016/j.powtec.2010.02.035
- Sarpietro, M.G., Accolla, M.L., Puglisi, G., Castelli, F., Montenegro, L., 2014. Idebenone loaded solid lipid nanoparticles: Calorimetric studies on surfactant and drug loading effects. *Int. J. Pharm.* 471, 69–74. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.05.019
- Sato, K., 2001. Crystallization behaviour of fats and lipids — a review. *Chem. Eng. Sci.* 56, 2255–2265. doi:10.1016/S0009-2509(00)00458-9
- Sato, K., Ueno, S., 2005. Polymorphism in fats and oils, en: Shahidi, F. (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 77–120. doi:10.1002/047167849X.bio020
- Saupe, A., Gordon, K.C., Rades, T., 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 314, 56–62. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.01.022
- Saupe, A., Wissing, S.A., Lenk, A., Schmidt, C., Müller, R.H., 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) - Structural investigations on two different carrier systems. *Biomed. Mater. Eng.* 15, 393–402.
- Scatchard, G., 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 51, 660–672. doi:10.1111/j.1749-6632.1949.tb27297.x
- Schmiele, M., Busch, S., Morhenn, H., Schindler, T., Schmutzler, T., Schweins, R., Lindner, P., Boesecke, P., Westermann, M., Steiniger, F., Funari, S.S., Unruh, T., 2016. Structural characterization of lecithin-stabilized tetracosane lipid nanoparticles. Part I: emulsions. *J. Phys. Chem. B* 120, 5505–5512. doi:10.1021/acs.jpcc.6b02519
- Schmolka, I.R., 1977. A review of block polymer surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54, 110–116. doi:10.1007/BF02894385

- Schoenitz, M., Joseph, S., Nitz, A., Bunjes, H., Scholl, S., 2013. Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: A feasibility study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 324–331. doi:10.1016/j.ejpb.2013.08.009
- Schöler, N., Olbrich, C., Tabatt, K., Müller, R.H., Hahn, H., Liesenfeld, O., 2001. Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. *Int. J. Pharm.* 221, 57–67. doi:10.1016/S0378-5173(01)00660-3
- Schubert, M.A., 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 125–131. doi:10.1016/S0939-6411(02)00130-3
- Schubert, M.A., Schicke, B.C., Müller-Goymann, C.C., 2005. Thermal analysis of the crystallization and melting behavior of lipid matrices and lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin. *Int. J. Pharm.* 298, 242–254. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.04.014
- Schwarz, C., Mehnert, W., 1997. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int. J. Pharm.* 157, 171–179. doi:10.1016/S0378-5173(97)00222-6
- Seetapan, N., Bejrapha, P., Srinuanchai, W., Ruktanonchai, U.R., 2010. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). *Micron* 41, 51–58. doi:10.1016/j.micron.2009.08.003
- Severino, P., Pinho, S.C., Souto, E.B., Santana, M.H.A., 2011a. Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 86, 125–130. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.029
- Severino, P., Pinho, S.C., Souto, E.B., Santana, M.H.A., 2011b. Crystallinity of Dynasan®114 and Dynasan®118 matrices for the production of stable Miglyol®-loaded nanoparticles. *J. Therm. Anal. Calorim.* 108, 101–108. doi:10.1007/s10973-011-1613-7
- Shah, B., Khunt, D., Bhatt, H., Misra, M., Padh, H., 2015. Application of quality by design approach for intranasal delivery of rivastigmine loaded solid lipid nanoparticles: Effect on formulation and characterization parameters. *Eur. J. Pharm. Sci.* 78, 54–66. doi:10.1016/j.ejps.2015.07.002
- Shah, M., Pathak, K., 2010. Development and statistical optimization of solid lipid nanoparticles of simvastatin by using 2(3) full-factorial design. *AAPS PharmSciTech* 11, 489–496. doi:10.1208/s12249-010-9414-z
- Shah, R.M., Bryant, G., Taylor, M., Eldridge, D.S., Palombo, E.A., Harding, I.H., 2016. Structure of solid lipid nanoparticles produced by a microwave-assisted microemulsion technique. *RSC Adv.* 6, 36803–36810. doi:10.1039/C6RA02020H
- Shah, R.M., Malherbe, F., Eldridge, D., Palombo, E.A., Harding, I.H., 2014. Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles (SLNs) prepared by a novel microemulsion technique. *J. Colloid Interface Sci.* 428, 286–294. doi:10.1016/j.jcis.2014.04.057

- Sharma, S.D., Kitano, H., Sagara, K., 2004. Phase change materials for low temperature solar thermal applications. *Res. Reports Fac. Eng. Mie Univ.* 29, 31–64. doi:10.2174/1876387101004010042
- Shegokar, R., Singh, K.K., Müller, R.H., 2011. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles - From lab to industrial scale. *Int. J. Pharm.* 416, 461–470. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.08.014
- Shen, J., Sun, M., Ping, Q., Ying, Z., Liu, W., 2010. Incorporation of liquid lipid in lipid nanoparticles for ocular drug delivery enhancement. *Nanotechnology* 21, 025101. doi:10.1088/0957-4484/21/2/025101
- Shen, S., Wu, Y., Liu, Y., Wu, D., 2017. High drug-loading nanomedicines: Progress, current status, and prospects. *Int. J. Nanomedicine* 12, 4085–4109. doi:10.2147/IJN.S132780
- Shi, F., Zhao, J.-H., Liu, Y., Wang, Z., Zhang, Y.-T., Feng, N.-P., 2012. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. *Int. J. Nanomedicine* 62, 2033. doi:10.2147/IJN.S30085
- Shidhaye, S.S., Vaidya, R., Sutar, S., Patwardhan, A., Kadam, V.J., 2008. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers – Innovative generations of solid lipid carriers. *Curr. Drug Deliv.* 5, 324–331.
- Siddiqui, A., Alayoubi, A., Nazzal, S., 2014. The effect of emulsifying wax on the physical properties of CTAB-based solid lipid nanoparticles (SLN). *Pharm. Dev. Technol.* 19, 125–8. doi:10.3109/10837450.2012.751401
- Siddiqui, A., Gupta, V., Liu, Y.Y., Nazzal, S., 2012. Doxorubicin and MBO-asGCS oligonucleotide loaded lipid nanoparticles overcome multidrug resistance in adriamycin resistant ovarian cancer cells (NCI/ADR-RES). *Int. J. Pharm.* 431, 222–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.04.050
- Siekman, B., Westesen, K., 1994. Thermoanalysis of the recrystallization process of melt-homogenized glyceride nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 3, 159–175. doi:10.1016/0927-7765(94)80063-4
- 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 Surfaces B Biointerfaces* 86, 158–165. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.03.035
- Simoneau, C., McCarthy, M.J., Reid, D.S., German, J.B., 1993. Influence of triglyceride composition on crystallization kinetics of model emulsions. *J. Food Eng.* 19, 365–387. doi:10.1016/0260-8774(93)90026-G
- Sivaramakrishnan, R., Kankate, L., Niehus, H., Kramer, K.D., 2005. Porelectric spectroscopy of drug-carrier-systems—distribution of carrier masses or activation energies. *Biophys. Chem.* 114, 221–228. doi:10.1016/j.bpc.2004.12.007
- Sivaramakrishnan, R., Nakamura, C., Mehnert, W., Korting, H.C., Kramer, K.D., Schäfer-Korting,

- M., 2004. Glucocorticoid entrapment into lipid carriers — characterisation by paretic spectroscopy and influence on dermal uptake. *J. Control. Release* 97, 493–502. doi:10.1016/j.jconrel.2004.04.001
- Sjöström, B., Kaplun, A., Talmon, Y., Cabane, B., 1995. Structures of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions. *Pharm. Res.* 12, 39–48. doi:10.1023/A:1016278302046
- Smith, M.C., Crist, R.M., Clogston, J.D., McNeil, S.E., 2017. Zeta potential: A case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal. Bioanal. Chem.* 409, 5779–5787. doi:10.1007/s00216-017-0527-z
- Soares, S., Fonte, P., Costa, A., Andrade, J., Seabra, V., Ferreira, D., Reis, S., Sarmiento, B., 2013. Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 456, 370–381. doi:10.1016/j.ijpharm.2013.08.076
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, M., 2005. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102–110. doi:10.1016/j.cocis.2005.06.004
- Solans, C., Solé, I., 2012. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 246–254. doi:10.1016/j.cocis.2012.07.003
- Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43, 985–1015. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- Sonoda, T., Takata, Y., Ueno, S., Sato, K., 2006. Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cryst. Growth Des.* 6, 306–312. doi:10.1021/cg050045h
- Souto, E.B., Anselmi, C., Centini, M., Müller, R.H., 2005. Preparation and characterization of n-dodecyl-ferulate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN®). *Int. J. Pharm.* 295, 261–8. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.02.005
- Souto, E.B., Wissing, S.A., Barbosa, C.M., Müller, R.H., 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278, 71–77. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.02.032
- Stenkamp, V.S., Berg, J.C., 1997. The role of long tails in steric stabilization and hydrodynamic layer thickness. *Langmuir* 13, 3827–3832. doi:10.1021/la970173a
- Subramanian, N., Murthy, R.S.R., 2004. Use of electrolyte induced flocculation technique for an in vitro steric stability study of steric stabilized liposome formulations. *Pharmazie* 59, 74–6. doi:10.1242/jeb.089763
- Sum, A.K., Bidy, M.J., de Pablo, J.J., Tupy, M.J., 2003. Predictive molecular model for the thermodynamic and transport properties of triacylglycerols. *J. Phys. Chem. B* 107, 14443–14451. doi:10.1021/jp035906g
- Sweetman, S.C. (Ed.), 2009. Martindale. The Complete Drug Reference, 36a ed. Pharmaceutical Press,

American Pharmacists Association, London.

- Sznitowska, M., Gajewska, M., Janicki, S., Radwanska, A., Lukowski, G., 2001. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 159–163. doi:10.1016/S0939-6411(01)00157-6
- Tadros, T., 2009. Polymeric surfactants in disperse systems. *Adv. Colloid Interface Sci.* 147–148, 281–299. doi:10.1016/j.cis.2008.10.005
- Takeuchi, M., Ueno, S., Sato, K., 2003. Synchrotron radiation SAXS/WAXS study of polymorph-dependent phase behavior of binary mixtures of saturated monoacid triacylglycerols. *Cryst. Growth Des.* 3, 369–374. doi:10.1021/cg025594r
- Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., Nasirpour, A., 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 19, 29–43. doi:10.1016/j.ifset.2013.03.002
- Tan, S.W., Billa, N., 2014. Lipid effects on expulsion rate of amphotericin B from solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 15, 287–95. doi:10.1208/s12249-013-0056-9
- Tan, S.W., Billa, N., Roberts, C.R., Burley, J.C., 2010. Surfactant effects on the physical characteristics of Amphotericin B-containing nanostructured lipid carriers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 372, 73–79. doi:10.1016/j.colsurfa.2010.09.030
- Tanaka, M., Saito, H., Arimoto, I., Nakano, M., Handa, T., 2003. Evidence for interpenetration of core triglycerides into surface phospholipid monolayers in lipid emulsions. *Langmuir* 19, 5192–5196. doi:10.1021/la026897q
- Teeranachaideekul, V., Boonme, P., Souto, E.B., Müller, R.H., Junyaprasert, V.B., 2008. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. *J. Control. Release* 128, 134–141. doi:10.1016/j.jconrel.2008.02.011
- Tikekar, R. V., Nitin, N., 2012. Distribution of encapsulated materials in colloidal particles and its impact on oxidative stability of encapsulated materials. *Langmuir* 28, 9233–9243. doi:10.1021/la301435k
- Tiwari, R., Pathak, K., 2011. Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake. *Int. J. Pharm.* 415, 232–243. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.044
- Torrecilla, J., del Pozo-Rodríguez, A., Apaolaza, P.S., Solinís, M.Á., Rodríguez-Gascón, A., 2015. Solid lipid nanoparticles as non-viral vector for the treatment of chronic hepatitis C by RNA interference. *Int. J. Pharm.* 479, 181–188. doi:10.1016/j.ijpharm.2014.12.047
- Tosta, F.V., Andrade, L.M., Mendes, L.P., Anjos, J.L. V., Alonso, A., Marreto, R.N., Lima, E.M., Taveira, S.F., 2014. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles for topical application: The influence of oil content on lipid dynamic behavior, stability, and drug skin penetration. *J. Nanoparticle Res.*

- 16, 1–12. doi:10.1007/s11051-014-2782-7
- Tran, T., Rousseau, D., 2016. Influence of shear on fat crystallization. *Food Res. Int.* 81, 157–162. doi:10.1016/j.foodres.2015.12.022
- Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O., 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 257, 153–160. doi:10.1016/S0378-5173(03)00135-2
- Trujillo, C.C., Wright, A.J., 2010. Properties and stability of solid lipid particle dispersions based on canola stearin and poloxamer 188. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 715–730. doi:10.1007/s11746-010-1553-6
- Trzaskus, K.W., Zdeb, A., de Vos, W.M., Kemperman, A., Nijmeijer, K., 2016. Fouling behavior during microfiltration of silica nanoparticles and polymeric stabilizers. *J. Memb. Sci.* 505, 205–215. doi:10.1016/j.memsci.2016.01.032
- Tscharnuter, W., 2000. Photon correlation spectroscopy in particle sizing, en: *Encyclopedia of analytical chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK. doi:10.1002/9780470027318.a1512
- Unruh, Tobias, Bunjes, H., Westesen, K., Koch, M.H.J., 2002. Observation of Size-Dependent Melting in Lipid Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 103, 10373–10377. doi:10.1021/jp9912612
- Unruh, T., Westesen, K., Bösecke, P., Lindner, P., Koch, M.H.J., 2002. Self-assembly of triglyceride nanocrystals in suspension. *Langmuir* 18, 1796–1800. doi:10.1021/la0110601
- Urbán-Morlán, Z., Ganem-Rondero, A., Melgoza-Contreras, L.M., Escobar-Chávez, J.J., Nava-Arzaluz, M.G., Quintanar-Guerrero, D., 2010. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing cyclosporine by the emulsification-diffusion method. *Int. J. Nanomedicine* 5, 611–620. doi:10.2147/IJN.S12125
- Uskoković, V., 2012. Dynamic light scattering based microelectrophoresis: Main prospects and limitations. *J. Dispers. Sci. Technol.* 33, 1762–1786. doi:10.1080/01932691.2011.625523
- Vaghasiya, H., Kumar, A., Sawant, K., 2013. Development of solid lipid nanoparticles based controlled release system for topical delivery of terbinafine hydrochloride. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 311–322. doi:10.1016/j.ejps.2013.03.013
- Valdes-Aguilera, O., Neckers, D.C., 1989. Aggregation phenomena in xanthene dyes. *Acc. Chem. Res.* 22, 171–177. doi:10.1021/ar00161a002
- Valdes-Aguilera, O., Neckers, D.C., 1988. Rose bengal ethyl ester aggregation in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* 92, 4286–4289. doi:10.1021/j100326a010
- van Oss, C.J., 2008a. Stability versus flocculation of aqueous particle suspensions, en: Hubbard, A. (Ed.), *Interface Science and Technology*. Academic Press, London, pp. 113–130. doi:10.1016/S1573-4285(08)00208-1
- van Oss, C.J., 2008b. The interfacial tension/free energy of interaction between water and two different

- condensed-phase entities, i, immersed in water, w, en: Hubberd, A. (Ed.), *Interface Science and Technology*. Academic Press, London, pp. 73–84. doi:10.1016/S1573-4285(08)00206-8
- van Oss, C.J., 2008c. Influence of the pH and the ionic strength of water on contact angles measured with drops of aqueous solutions on electrically charged, amphoteric and uncharged surfaces, en: Hubberd, A. (Ed.), *Interface Science and Technology*. Academic Press, London, pp. 161–166. doi:10.1016/S1573-4285(08)00212-3
- van Oss, C.J., 2008d. General and historical introduction, en: Hubberd, A. (Ed.), *Interface Science and Technology*. Academic Press, London, pp. 1–9. doi:10.1016/S1573-4285(08)00201-9
- Vandita, K., Shashi, B., Santosh, K.G., Pal, K.I., 2012. Enhanced apoptotic effect of curcumin loaded solid lipid nanoparticles. *Mol. Pharm.* 9, 3411–3421. doi:10.1021/mp300209k
- Varache, M., Ciancone, M., Couffin, A.-C., 2020. Optimization of a solid-phase extraction procedure for the analysis of drug-loaded lipid nanoparticles and its application to the determination of leakage and release profiles. *J. Pharm. Sci.* doi:10.1016/j.xphs.2020.05.003
- Varshosaz, J., Eskandari, S., Tabbakhian, M., 2012. Freeze-drying of nanostructure lipid carriers by different carbohydrate polymers used as cryoprotectants. *Carbohydr. Polym.* 88, 1157–1163. doi:10.1016/j.carbpol.2012.01.051
- Varshosaz, J., Minayian, M., Moazen, E., 2010. Enhancement of oral bioavailability of pentoxifylline by solid lipid nanoparticles. *J. Liposome Res.* 20, 115–123. doi:10.3109/08982100903161456
- Venkateswarlu, V., Manjunath, K., 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *J. Control. Release* 95, 627–638. doi:10.1016/j.jconrel.2004.01.005
- Verwey, E.J., Overbeek, J.T., 1955. Theory of the stability of lyophobic colloids. *J. Colloid Sci.* 10, 224–225. doi:10.1016/0095-8522(55)90030-1
- Videira, M., Almeida, A.J., Fabra, À., 2012. Preclinical evaluation of a pulmonary delivered paclitaxel-loaded lipid nanocarrier antitumor effect. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 8, 1208–1215. doi:10.1016/j.nano.2011.12.007
- Videira, M.A., Arranja, A.G., Gouveia, L.F., 2013. Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: A new opportunity for paclitaxel-based therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* 49, 302–310. doi:10.1016/j.ejps.2013.03.005
- Vieira, A.C.C., Chaves, L.L., Pinheiro, S., Pinto, S., Pinheiro, M., Lima, S.C., Ferreira, D., Sarmiento, B., Reis, S., 2018. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for better management of tuberculosis. *Int. J. Pharm.* 536, 478–485. doi:10.1016/j.ijpharm.2017.11.071
- Vighi, E., Ruozi, B., Montanari, M., Battini, R., Leo, E., 2007. Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: Characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67, 320–328. doi:10.1016/j.ejpb.2007.02.006
- Vijayan, N., Babu, R.R., Gunasekaran, M., Gopalakrishnan, R., Ramasamy, P., 2003. Growth, optical,

- thermal and mechanical studies of methyl 4-hydroxybenzoate single crystals. *J. Cryst. Growth* 256, 174–182. doi:10.1016/S0022-0248(03)01343-5
- Vitorino, C., Carvalho, F.A., Almeida, A.J., Sousa, J.J., Pais, A.A., 2011. The size of solid lipid nanoparticles: An interpretation from experimental design. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 84, 117–130. doi:10.1016/j.colsurfb.2010.12.024
- Vivek, K., Reddy, H., Murthy, R.S.R., 2007. Investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *AAPS PharmSciTech* 8, E83. doi:10.1208/pt0804083
- Wang, J.J., Liu, K.S., Sung, K.C., Tsai, C.Y., Fang, J.Y., 2009. Lipid nanoparticles with different oil/fatty ester ratios as carriers of buprenorphine and its prodrugs for injection. *Eur. J. Pharm. Sci.* 38, 138–146. doi:10.1016/j.ejps.2009.06.008
- Wang, S., Sun, M., Ping, Q., 2008. Enhancing effect of Labrafac Lipophile WL 1349 on oral bioavailability of hydroxysafflor yellow A in rats. *Int. J. Pharm.* 358, 198–204. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.03.006
- Wang, Y., Zhang, H., Hao, J., Li, B., Li, M., Xiuwen, W., 2015. Lung cancer combination therapy: Co-delivery of paclitaxel and doxorubicin by nanostructured lipid carriers for synergistic effect. *Drug Deliv.* 7544, 1–6. doi:10.3109/10717544.2015.1055619
- Washington, C., 1990. Drug release from microdisperse systems: a critical review. *Int. J. Pharm.* 58, 1–12. doi:10.1016/0378-5173(90)90280-H
- Wasutrasawat, P., Al-Obaidi, H., Gaisford, S., Lawrence, M.J., Warisnoicharoen, W., 2013. Drug solubilisation in lipid nanoparticles containing high melting point triglycerides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 85, 365–371. doi:10.1016/j.ejpb.2013.04.020
- 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. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 7–22. doi:10.1016/j.ejpb.2013.08.013
- Welch, D., Lettinga, M.P., Ripoll, M., Dogic, Z., Vliegthart, G.A., 2015. Trains, tails and loops of partially adsorbed semi-flexible filaments. *Soft Matter* 11, 7507–7514. doi:10.1039/C5SM01457C
- Westesen, K., Bunjes, H., 1995. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? *Int. J. Pharm.* 115, 129–131. doi:10.1016/0378-5173(94)00347-8
- Westesen, K., Bunjes, H., Koch, M.H.J., 1997. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. *J. Control. Release* 48, 223–236. doi:10.1016/S0168-3659(97)00046-1
- Westesen, K., Siekmann, B., 1997. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 151, 35–45.
- Westesen, K., Siekmann, B., Koch, M.H.J., 1993. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.* 93, 189–199.

doi:10.1016/0378-5173(93)90177-H

- Weyenberg, W., Filev, P., Van den Plas, D., Vandervoort, J., De Smet, K., Sollie, P., Ludwig, A., 2007. Cytotoxicity of submicron emulsions and solid lipid nanoparticles for dermal application. *Int. J. Pharm.* 337, 291–298. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.045
- Wissing, S.A., Müller, R.H., Manthei, L., Mayer, C., 2004. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. *Pharm. Res.* 21, 400–405.
- Xiao, Y., Wiesner, M.R., 2012. Characterization of surface hydrophobicity of engineered nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* 215–216, 146–151. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.02.043
- Xu, W., Lee, M.-K., 2015. Development and evaluation of lipid nanoparticles for paclitaxel delivery: a comparison between solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *J. Pharm. Investig.* 45, 675–680. doi:10.1007/s40005-015-0224-x
- Xu, Z., Chen, L., Gu, W., Gao, Y., Lin, L., Zhang, Z., Xi, Y., Li, Y., 2009. The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma. *Biomaterials* 30, 226–232. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.09.014
- Xue, H.Y., Wong, H.L., 2011. Tailoring nanostructured solid-lipid carriers for time-controlled intracellular siRNA kinetics to sustain RNAi-mediated chemosensitization. *Biomaterials* 32, 2662–72. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.029
- Yang, L., Alexandridis, P., 2000. Physicochemical aspects of drug delivery and release from polymer-based colloids. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 5, 132–143. doi:10.1016/S1359-0294(00)00046-7
- Yang, X., Li, Y., Li, M., Zhang, L., Feng, L., Zhang, N., 2013. Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer. *Cancer Lett.* 334, 338–345. doi:10.1016/j.canlet.2012.07.002
- Yang, Y., Corona, A., Schubert, B., Reeder, R., Henson, M.A., 2014. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J. Colloid Interface Sci.* 418, 261–272. doi:10.1016/j.jcis.2013.12.024
- Yasir, M., Sara, U.V.S., 2013. Preparation and optimization of haloperidol loaded solid lipid nanoparticles by Box–Behnken design. *J. Pharm. Res.* 7, 551–558. doi:10.1016/j.jopr.2013.05.022
- Yasir, M., Vir, U., Sara, S., Sara, U.V.S., 2014. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: In vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. *Acta Pharm. Sin. B* 4, 454–463. doi:10.1016/j.apsb.2014.10.005
- Yi, J., Lam, T.I., Yokoyama, W., Cheng, L.W., Zhong, F., 2014. Cellular uptake of β -carotene from protein stabilized solid lipid nanoparticles prepared by homogenization-evaporation method. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1096–1104. doi:10.1021/jf404073c
- Yu, Y.H., Kim, E., Park, D.E., Shim, G., Lee, S., Kim, Y.B., Kim, C.-W., Oh, Y.-K., 2012. Cationic solid lipid nanoparticles for co-delivery of paclitaxel and siRNA. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80, 268–73. doi:10.1016/j.ejpb.2011.11.002

- Yuan, H., Chen, J., Du, Y.Z., Hu, F.Q., Zeng, S., Zhao, H.L., 2007. Studies on oral absorption of stearic acid SLN by a novel fluorometric method. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 58, 157–64. doi:10.1016/j.colsurfb.2007.03.002
- Yuan, H., Miao, J., Du, Y.-Z., You, J., Hu, F.-Q., Zeng, S., 2008. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int. J. Pharm.* 348, 137–145. doi:10.1016/j.ijpharm.2007.07.012
- Yucel, U., Elias, R.J., Coupland, J.N., 2013. Effect of liquid oil on the distribution and reactivity of a hydrophobic solute in solid lipid nanoparticles. *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.* 90, 819–824. doi:10.1007/s11746-013-2228-x
- Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Ramirez-Zamorano, P., Cornejo-Villegas, M.A., Gutiérrez-Cortez, E., Quintanar-Guerrero, D., 2013. Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Res. Int.* 51, 946–953. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.012
- Zhang, J., Nie, S., Wang, S., 2013. Nanoencapsulation enhances epigallocatechin-3-gallate stability and its antiatherogenic bioactivities in macrophages. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9200–9209. doi:10.1021/jf4023004
- Zhang, J., Smith, E., 2011. Percutaneous permeation of betamethasone 17-valerate incorporated in lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 100, 896–903. doi:10.1002/jps.22329
- Zhang, L., Hayes, D.G., Chen, G., Zhong, Q., 2013. Transparent dispersions of milk-fat-based nanostructured lipid carriers for delivery of β -carotene. *J. Agric. Food Chem.* 61, 9435–9443. doi:10.1021/jf403512c
- Zhang, Z., Feng, S.S., 2006. The drug encapsulation efficiency, in vitro drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials* 27, 4025–4033. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.03.006
- Zhao, J.-C., 2007. The role of phase transformation kinetics in phase diagram determination and assessment, en: Zhao, J.-C. (Ed.), *Methods for Phase Diagram Determination*. Elsevier, Oxford, pp. 22–50. doi:10.1016/B978-008044629-5/50002-1
- Zhao, S., Yang, X., Garamus, V.M., Handge, U.A., Bérengère, L., Zhao, L., Salamon, G., Willumeit, R., Zou, A., Fan, S., 2014. Mixture of Nonionic/Ionic Surfactants for the Formulation of Nanostructured Lipid Carriers: Effects on Physical Properties. *Langmuir* 30, 6920–6928. doi:10.1021/la501141m
- Zheng, M., Falkeborg, M., Zheng, Y., Yang, T., Xu, X., 2013. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 430, 76–84. doi:10.1016/j.colsurfa.2013.03.070
- Zhong, Q., Zhang, L., 2019. Nanoparticles fabricated from bulk solid lipids: Preparation, properties, and potential food applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 273, 102033. doi:10.1016/j.cis.2019.102033

- Zoubari, G., Staufenbiel, S., Volz, P., Alexiev, U., Bodmeier, R., 2017. Effect of drug solubility and lipid carrier on drug release from lipid nanoparticles for dermal delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 110, 39–46. doi:10.1016/j.ejpb.2016.10.021
- zur Mühlen, A., Schwarz, C., Mehnert, W., 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-drug release and release mechanism. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 45, 149–155. doi:10.1016/S0939-6411(97)00150-1
- zur Mühlen, A., zur Mühlen, E., Niehus, H., Mehnert, W., 1996. Atomic force microscopy studies of solid lipid nanoparticles. *Pharm. Res.* 13, 1411–6. doi:10.1023/A:1016042504830