



Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

## **Desarrollo de nanosuspensiones como tintas para impresión de fármacos de baja solubilidad acuosa**

### **PATROCINANTE**

Prof. Javier O. Morales M.  
Laboratorio de *Drug Delivery*  
Departamento de Ciencias y  
Tecnología Farmacéuticas  
Universidad de Chile

### **DIRECTORES DE MEMORIA**

Prof. Javier O. Morales M.  
Laboratorio de *Drug Delivery*  
Departamento de Ciencias y Tecnología  
Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Prof. Sitaram Velaga  
Pharmaceutical and Biomaterial Research  
Group, Department of Health Sciences,  
Luleå University of Technology

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**Hans Felipe Fritz Donoso**

Santiago de Chile

2017

## AGRADECIMIENTOS

Agradecer primero a mi Familia, que sin ellos esto simplemente no hubiera sido posible. Ya que durante todo este proceso si bien no siempre entendía lo que hacía o quería hacer, nunca me dejaron de apoyar y comprender y sobre todo alimentar durante estos años. En especial a mis padres que me siempre me motivaron a seguir adelante y fueron el empuje que uno necesita en los momentos precisos.

Dar las gracias a los Profesores del departamento de ciencia y Tecnología Farmacéutica, que me guiaron y aconsejaron durante los últimos años de mi carrera, en especial a Javier Morales Montecinos por darme la confianza, la guía y el apoyo en todo el tiempo que estuve bajo su dirección, las muchas oportunidades que se me dieron y que creo haber respondido acorde a la situación. También a Felipe Oyarzún Ampuero por la gran disposición y guía durante estos últimos años. También agradecer a mi codirector de tesis Sitaram Velaga, por recibirme en Luleå, lo mucho que aprendí, la confianza y el apoyo que me dio en mi paso por Suecia.

A mis amigos, conocidos y gente que conocí en tiempos de Universidad, a las innumerables historias, carretes, juntas de estudio, deporte y en general tanta compañía, risas y gratos momentos. Hicieron que mi paso por la universidad fuera simplemente algo que atesorare por el resto de mi vida. A los que me acompañaron desde el inicio, Xalo, Kanico, Jave, Katu, León, Nico, Gabo, Conini, Pau y muchos otros más que es imposible mencionarlos a todos y a otros más perdidos en el camino son lo personas increíbles que tuve el honor de conocer. Mención especial a los que me acompañaron ya en el cierre, Karly y Andrea que estuvieron presentes en momentos cruciales y nunca me dejaron de pedir coctel.

A mis compañeros de Drug Delivery, en especial a Maro, Gaby, Jara, Andrea, Joh, Kanico, Gonzalo, Miguel y Vic Miranda que hicieron que el diario vivir y trabajar en el laboratorio siempre fuera agradable, lleno de risas, momentos de café, almuerzos, post trabajo, los hoy en drug delivery y muchas cosas más que siempre recordare de mi paso por Drug delivery.

Agradecer a mis compañeros de los distintos equipos por los que pase por la facultad, los equipos de baby de los primeros años, Petroleros FC, siempre en la memoria. A los más recientes Pharmaceutical city dos años vistiendo el celeste y a la última oportunidad FC para cerrar este ciclo. A Kurüche Rugby, todos los años que estuve, un proyecto que partimos desde cero en la facultad y tengo el agrado de ver que pese a haber tenido que dejarlo aún está vivo y lleno de gente motivada. Al equipo de balonmano, también partimos desde cero, un gran equipo de personas a las que les tengo mucho cariño y que a punta de esfuerzo a logrado muchas cosas impensadas para muchos de los que partimos. Y al último, pero no menos importante, al Drink Team, que a pesar de haber estado poco tiempo, es un gran grupo de personas que deja todo en el agua al momento de representar a la facultad. Agradecimiento

especial a mis entrenadores que me formaron y moldearon también la persona que hoy soy, Darío Armijo, Matías Salinas y Alfredo Grassau.

Y ya para finalizar, la lista de personas a las que quiero y debo agradecer es gigante, así que simplemente agradecer a todos los que se dieron el tiempo de compartir, aunque sea un rato conmigo durante este largo periodo de vida que fue mui paso por la universidad, a todos y cada uno de ustedes, gracias totales.

# TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS .....	ii
TABLA DE CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE ECUACIONE, FIGURAS Y TABLAS .....	vii
Figuras.....	vii
Tabla.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
Fármacos de baja solubilidad acuosa y vías de administración tradicionales .....	1
Ruta bucal.....	2
Films poliméricos.....	3
Nanotecnología .....	3
Nanoemulsión .....	3
Micelas de núcleo lipídico.....	4
Nanocristales .....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL .....	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
MATERIALES .....	8
MÉTODOS EXPERIMENTALES .....	9
Sección experimental de tinta de NC de NFD .....	9
NC de NFD por HSH.....	9
Tinta de NC de NFD .....	9
Caracterización NC de NFD .....	9
Sección experimental de tinta de LCM de NFD .....	10
LCM de NFD por emulsificación en caliente .....	10

Tinta de LCM de NFD .....	10
Caracterización de las LCM de NFD .....	10
Caracterización del estado físico de las LCM de NFD .....	11
Sección experimental de tinta de NE de NFD.....	11
NE de NFD por desplazamiento de solvente.....	11
Tinta de NE de NFD.....	11
Caracterización de las LCM de NFD .....	12
Sección experimental de tintas de impresión .....	12
Estabilidad de las tintas .....	12
Eficiencia de encapsulación (EE) y Carga de fármaco (DL) de LCM.....	12
Eficiencia de encapsulación (EE) y Carga de fármaco (DL) de NE .....	12
Estudio de liberación de LCM .....	12
Estudio de liberación de NE.....	13
Sección experimental de impresión.....	13
Proceso de impresión .....	13
Caracterización de los nanosistemas post impresión .....	13
Eficiencia de impresión (EI) de las tintas de NFD .....	13
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>14</b>
Resultados de tintas de NC de NFD.....	14
Caracterización de NC .....	14
Resultados de tintas de LCM de NFD.....	16
Caracterización de LCM .....	16
Caracterización del estado de las LCM de NFD .....	18
Resultados de tintas de NE de NFD .....	19
Caracterización de NE.....	19
Resultados de tintas de impresión pre impresión .....	22
Micelas .....	22

Nanoemulsiones .....	25
Resultados de impresión de las tintas.....	28
Micelas .....	28
Nanoemulsión .....	30
DISCUSIÓN .....	32
CONCLUSIÓN .....	34
REFERENCIAS .....	35
ANEXO I .....	42
ANEXO II .....	45

# ÍNDICE DE ECUACIONE, FIGURAS Y TABLAS

## Figuras

Figura 1. Gráfico de tamaño y PDI de NC de NFD de 5 y 10 mg, sin filtrar (SF), Filtrados (F) en filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y Post impresión (POI).

Figura 2. Gráfico de formulaciones de NC de NFD de 10 mg filtrados (F), en términos de tamaño y PDI. F1-5 filtradas en filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y F6-9 0.45  $\mu\text{m}$ .

Figura 3. Gráfico de tamaño (nm) y PDI de ambas formulaciones en triplicado, cargadas con y sin NFD.

Figura 4. Imagen TEM de F30 sin NFD.

Figura 5. Comparación de gráficos de DSC entre LCM en solución, LCM liofilizadas y Gelucire 44/14 en unidades de flujo de calor (mW/mg) vs temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ) (+25mW y +50 mW respectivamente).

LCM.

Figura 6. DSC de LCM liofilizadas en su propia escala (+50 mW).

Figura 7. Comparación de tamaños y PDI en procesos NE.

Figura 8. Imagen TEM de NE F3.

Figura 9. Imagen TEM de NE F4.

Figura 10. Comparación de potencial zeta en procesos NE.

Figure 11. Eficiencia de encapsulación y Cargada de fármaco para ambas formulaciones con diferentes cargas de NFD.

Figure 12. NFD liberado de ambas formulaciones en buffer fosfato pH 7.2.

Figura 13. Eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco de NE.

Figure 14. NFD liberado de ambas formulaciones en buffer fosfato pH 7.2.

Figura 15. Gráfico de LCM F20 y F30 con 30 mg de NFD pre impresión (PRI) y POI en términos de tamaño y PDI.

Figura 16. Gráfico de LCM F20 y F30 con 30 mg de NFD POI en términos de potencial zeta.

Figura 17. Gráfico de NE F4-25 mg NFD y F3-10 mg NFD POI en términos de tamaño y PDI.

Figura 18. Gráfico de NE F4-25 mg NFD y F3-10 mg NFD POI en términos de potencial zeta.

## **Tabla**

Tabla 1. Formulación base de NC y sus variaciones en cuanto al uso de poloxámero 188, el ciclo de homogenización y la velocidad de corte

Tabla 2. Detalles de las formulaciones F30 y F20 de LCM.

Tabla 3. Detalle de las formulaciones F3 y F4 de NE.

Tabla 4. Detalle de las formulaciones de NC filtradas, con la modificación del proceso original.

Table 5. Estudio de estabilidad de las formulaciones F30 y F20 con 30, 45 y 60 mg de NFD en semanas 0 y 1.

Tabla 6. Estudio de estabilidad de las formulaciones F3 con 0, 10 y 29 mg de NF y F4 con 0, 10, 25, 35 y 50 mg de NFD en semanas 0 y 4.

Tabla 7. Eficiencia de impresión de LCM y la cantidad de NFD.

Tabla 8. Eficiencia de impresión de NE y la cantidad de NFD.

Tabla 9. EI y cantidad impresa de NFD para NE y LCM.



## RESUMEN

Los fármacos de baja solubilidad acuosa (BCS clase II y IV) presentan un desafío para ser formulados. Dentro de las nuevas formas de entrega de fármaco, y que pueden ser utilizadas para este tipo de fármacos, la impresión de fármacos en films para administración bucal aparece como una atractiva alternativa. La principal barrera para esta tecnología es que la mayoría de las tintas de impresión son de base acuosa, lo que representa una limitante para este tipo de fármacos. Una posible solución, es encapsular en nanosistemas o nanonizar el fármaco, para aumentar la cantidad de fármaco que se pueda suspender en la tinta de base acuosa.

El fármaco a elección en esta investigación fue el nifedipino, que tiene baja solubilidad en agua y además es fotosensible. Los nanosistemas utilizados fueron nanoemulsión, micelas de núcleo lipídico, y nanocristales obtenidos por homogenización de alta cizalla. Se caracterizaron las nanosuspensiones por tamaño, índice de polidispersión (PDI), potencial zeta y morfología. Se realizaron también estudios de estabilidad, de liberación y se cuantificó la eficiencia de encapsulación. Una vez caracterizadas las nanosuspensiones, a las formulaciones óptimas se les agregó glicerina, en una proporción 70:30 v/v para fabricar las tintas de impresión. Las tintas se imprimieron y se caracterizó lo impreso en tamaño, PDI, potencial zeta y eficiencia de impresión.

Los nanocristales de nifedipino no fueron viables para la impresión por el método desarrollado, ya que, si bien logran tamaños aptos para ser impresos y no obstruir el cartridge, esto solo ocurre luego de un proceso de filtrado. Las micelas de núcleo lipídico poseen tamaños alrededor de 20 nm, lo que se puede confirmar en la microscopía y altas eficiencias de encapsulación. En el estudio de liberación mostraron un comportamiento de liberación prolongada y en términos de estabilidad, las formulaciones tanto a temperatura ambiente, como refrigeradas no mantuvieron sus características físicas por más de una semana. Las formulaciones de nanoemulsión tuvieron tamaños mayores y un potencial zeta negativo. Este último probablemente dio una mayor estabilidad en comparación a las micelas, ya que, fueron estable por 4 semanas. La eficiencia de encapsulación fue variada, pero la carga de fármaco fue homogénea entre las formulaciones. Al igual que las micelas, presentaron un perfil de liberación prolongada. En cuanto a la impresión, las micelas y las nanoemulsiones lograron imprimir una cantidad similar de nifedipino. Si bien, las micelas tenían mayores eficiencias de encapsulación, al imprimirse la eficiencia de impresión era menor a las de la nanoemulsiones.

Se logró imprimir las tintas de nifedipino, aumentando la dispersión del fármaco en las tintas. Con las nanoemulsiones se logró dispersar 160 veces el nifedipino versus su solubilidad en agua. Las micelas lograron dispersar el nifedipino más de 10 veces al final del proceso.

## SUMMARY

Drugs of low aqueous solubility (BCS class II and IV) present a challenge to formulate and to be used in therapy. A new form of drug delivery is the printing of drugs in films for buccal administration. The problem for this is that the printing inks are aqueous based. Thus, these drugs also present problems to be formulated as inks. A possible solution to this is to encapsulate drugs in nanosystems or to nanonize the drug, to increase the amount of drug that can be suspended in the ink.

The selected drug in this investigation was nifedipine, which has low aqueous solubility and it is also photosensitive. The nanosystems used were nanoemulsions, using the method of solvent displacement, and lipid core micelles, by the method of hot-melt emulsification. The nifedipine nanocrystals were developed using the high shear homogenization technique.

Nanoparticles were characterized by size, PDI and zeta potential. Micelles and nanoemulsion were also observed under the microscope (TEM). Studies of stability, drug release and encapsulation efficiency were conducted. Once the nanosuspensions were characterized, the optimal formulations were mixed with glycerol in a 70:30 v/v ratio to develop the printing inks. The inks were printed and then, characterized in PDI size, zeta potential and printing efficiency.

Nanocrystals of nifedipine were not viable for printing by the developed method, although, they achieved sizes suitable for being printed and avoided clogging the cartridge, only after a filtering process. Lipid core micelles, with sizes around 20 nm confirmed by microscopy, exhibited high encapsulation efficiencies. In the release study, they have shown a prolonged release profile and in terms of the stability, the formulations, both at room temperature and refrigerated, did not maintain their physical characteristics for more than a week. The nanoemulsion formulations have larger sizes and negative zeta potential. This probably gave greater stability than micelles, resulting in 4 weeks of physicochemical stability. The encapsulation efficiency was varied, but the drug loading was homogeneous among the formulations. Similar to micelles, nanoemulsions presented a prolonged release profile. In terms of printing, micelles and nanoemulsions printed a similar amount of nifedipine. Although micelles had higher encapsulation efficiencies, printing efficiency was lower than nanoemulsion.

It was possible to print nifedipine inks, where the dispersion of the drug in the inks was increased. With nanoemulsions it was possible to disperse 160 times nifedipine versus its solubility in water. The micelles could disperse nifedipine more than 10 times at the end of the process.

# INTRODUCCIÓN

## **Fármacos de baja solubilidad acuosa y vías de administración tradicionales**

Dentro de las terapias farmacológicas, el uso de la tecnología permite una mejora de las terapias, ya sea a nivel de la forma farmacéutica, como comprimidos y capsulas, a nivel de preformulación, como lo es el uso de excipientes y los procesos como la granulación, e incluso el aspecto físico de la forma final, dándole color y sabores. Una de las partes más importante del desarrollo y la investigación en el área de la tecnología farmacéutica es la capacidad de poder formular los fármacos. Una de las formas de guiar este proceso de formulación es analizar las propiedades fisicoquímicas de cada fármaco, lo cual puede guiar o apuntar a cierto grupo de formulaciones o procesos por los que el fármaco pueda ser formulado. Para ayudar a este análisis es posible utilizar el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS por su nombre en inglés)<sup>1</sup> el cual agrupa los fármacos en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad:

Clase I: Son fármacos de alta permeabilidad y de alta solubilidad

Clase II: Son fármacos de alta permeabilidad y de baja solubilidad

Clase III: Son fármacos de baja permeabilidad y de alta solubilidad

Clase IV: Son fármacos de baja permeabilidad y de baja solubilidad

Dentro de la clasificación, los fármacos de clases II y IV presentan el problema de baja solubilidad en agua. Una forma de abordar este problema, es por medio del uso de las distintas formas farmacéuticas y/o distintas vías para administrar un fármaco. Dentro de las rutas de administración, la ruta oral es la más convencional para administrar un fármaco que deba alcanzar concentraciones sanguíneas para lograr su efecto. Algunas de las ventajas de la ruta oral son, que es de fácil acceso, es cómoda para el paciente, hay varias formas farmacéuticas que pueden ser administradas por esta ruta y para la administración de un medicamento, no se requiere la ayuda de un profesional de la salud, a diferencia de los inyectables, por ejemplo. Para formular un fármaco por vía oral, el fármaco debe estar disuelto en alguna parte del tracto gastrointestinal donde se absorba para luego poder atravesar las membranas biológicas del tracto gastrointestinal si lo que se busca es un efecto sistémico, que es lo que se busca en la mayoría de los casos. Por esta razón, la solubilidad es un factor importante a considerar al momento de formular. Aun así, hay formulaciones que logran obtener un fármaco biodisponible administrando altas dosis de este, pero hay una segunda barrera luego de haber pasado por el tracto gastrointestinal, que es el hígado, el cual tiene la capacidad de metabolizar muchos fármacos, en el denominado efecto primer paso <sup>2</sup>. En muchos casos, como el de la morfina <sup>3</sup>, los fármacos son altamente metabolizados y su biodisponibilidad

baja. Otros problemas de la ruta oral, son los fármacos que tienen propiedades organolépticas no agradables, los pacientes que tienen problemas de deglución, la irritación de las mucosas estomacales e intestinales que puede producir algún fármaco como efecto adverso, dentro de otros problemas <sup>4</sup>.

Por lo tanto, al momento de formular, el uso de una ruta alternativa a la ruta oral puede ser necesaria. Dentro de las posibles rutas de administración, está la ruta parenteral, siendo la vía intravenosa una de las más utilizadas. Esta vía genera muchas incomodidades a los pacientes que deben recibir la terapia farmacológica, ya que al momento de la inyección genera dolor y malestar. También hay otras desventajas, y una de las principales es que una vez administrada la dosis del medicamento, el efecto que este produce, no se puede revertir tan fácilmente, ya que no hay proceso de absorción, sino que su biodisponibilidad es inmediata <sup>5</sup>. Pero no todo es desventajas en esta ruta de administración, pues tiene la ventaja de sufrir un menor grados de metabolización, evitando, por ejemplo, el efecto primer paso, además de una biodisponibilidad del 100% y también la forma más rápida de producir un efecto farmacológico. Aun así, debido al dolor y malestar que producen las inyecciones, los pacientes que deben recibir una terapia prolongada o incluso crónica, en donde las múltiples inyecciones producen un alto índice de abandono de la terapia o ansiedad por la inyección<sup>5</sup>.

## **Ruta bucal**

Existen otras rutas de administración, menos utilizadas, como opción a la ruta oral y parenteral. Una de esas rutas es la ruta bucal. La ruta bucal, y más específicamente el revestimiento interior de las mejillas, es donde nuevas tecnologías, como los films, pueden facilitar el acceso a la utilización de esta ruta. La mucosa bucal corresponde a un tejido estratificado no queratinizado, por lo que permite una mayor permeabilidad que otras partes de la boca como el paladar duro o las encías. El grosor del epitelio es aproximadamente de 500 a 800  $\mu\text{m}$ , por lo que es más gruesa que la vía sublingual (100-200  $\mu\text{m}$ ), pero tiene mayor área superficial y es mayormente utilizada para obtener un efecto tanto local como sistémico<sup>6</sup>. Una de las ventajas de la vía bucal es que evita el paso por el tracto gastro intestinal y el torrente hepático. Si el fármaco sufre de efecto de primer paso, o la cantidad absorbida a nivel del tracto gastrointestinal es baja, ya sea por efecto del pH, degradación por enzimática u otro problema, la biodisponibilidad se verá afectada. En escenarios como este, es donde la ruta bucal puede alcanzar una mayor biodisponibilidad e incluso, se pueden disminuir las dosis del fármaco a administrar <sup>7</sup>.

Si bien el uso de la ruta bucal es una opción para resolver el problema de formular fármacos clase II y IV, para lograr que la terapia farmacológica sea efectiva, el fármaco debe estar en una forma farmacéutica adecuada para la ruta bucal. Con este fin, el uso de las tecnologías más recientes para la vehiculización de fármacos nos entrega algunas opciones. En la actualidad hay nuevas formas farmacéuticas que permiten la administración por la vía bucal tales como comprimidos de desintegración oral, pastillas,

gomas de mascar, pulverizaciones, soluciones bucales, geles bucales y los films orales <sup>8,9</sup>. Dentro de estas, la última tecnología mencionada, permite generar distintos perfiles de liberación, como consecuencia de las distintas propiedades fisicoquímicas que le otorguen sus componentes.

## **Films poliméricos**

Los films son formas farmacéuticas de fácil administración, versátiles para alcanzar un efecto local o sistémico, potencialmente mucoadhesivos (aumentando el tiempo de liberación y absorción del fármaco) y de tamaño pequeño que hace que sean cómodos para el paciente<sup>6</sup>. Para generar films mucoadhesivos, la literatura describe el uso de polímeros como la hidroxipropilmetilcelulosa o polivinilpirrolidona, dentro de otros compuestos <sup>10,11</sup>. Una de las formas de fabricar y cargar con principio activo los films mucoadhesivos es por el método de moldeo por evaporación de solvente, que consiste en la solubilización del polímero del film en un solvente volátil junto con el fármaco y otros excipientes como un plastificante <sup>12</sup>. Este método es simple, pero tiene algunas consideraciones al momento de fabricarlos, ya que el fármaco está en contacto con el solvente, también el film debe quedar sin burbujas para que no afecte sus perfiles de liberación <sup>13</sup>. Otras formas descritas son la extrusión por fusión en caliente y más recientemente, la impresión de tintas sobre los films <sup>12</sup>. Este último método utiliza un film como si fuera un sustrato de impresión y sobre este se imprime una tinta que contiene al fármaco. El efecto local o sistémico dependerá de la formulación de la tinta y del material de impresión utilizado<sup>14</sup>.

## **Nanotecnología**

### **Nanoemulsión**

Los films mucoadhesivos con el fármaco impreso son un buen sistema de entrega de fármaco para lograr la administración en la parte interior de la mejilla. El problema es que las tintas de impresión son de base acuosa o una mezcla hidroalcohólica. Para solucionar esto, la limitante no solo es la baja solubilidad en agua, que podría ser insuficiente para lograr la terapéutica, ya que si el fármaco llega a cristalizar y tiene un tamaño superior al que el cartridge puede imprimir, este quedara obstruido. Una opción para superar este problema es la nanotecnología. Existen grupos de nanosistemas que pueden ser utilizados con este fin, como las nanopartículas poliméricas <sup>15,16</sup>, los nanocristales (NC) <sup>17,18</sup> o las nanopartículas lipídicas. Un fármaco clase II o IV puede tener una buena afinidad con los nanosistemas lipídicos. Estos se subdividen en varias categorías como nanopartículas poliméricas, nanoemulsiones (NE) <sup>19</sup>, lipídicas sólidas (SLN por su nombre en inglés) <sup>20</sup>, carriers lipídicos nanoestructurados (NLC por su nombre en inglés) <sup>21</sup> o nanosistemas mixtos, como lo son las micelas de núcleo lipídico (LCM por su nombre en inglés), entre otros. En aspectos generales, los vehículos lipídicos tienen al menos un lípido que compone la matriz o núcleo y un agente tensioactivo que estabiliza esta matriz en agua. Ventajas como la alta afinidad de los sistemas para fármacos poco solubles en agua, buena capacidad de carga de fármaco,

biocompatibilidad de los lípidos, la capacidad de atravesar membranas y otras características hacen de estos nanosistemas excelentes candidatos para fármacos poco solubles en agua <sup>22</sup>. Pero también existen desventajas, como problemas de estabilidad relacionados con la temperatura, también la reorganización de las cadenas lipídicas que con el tiempo cambian a una forma polimórfica diferente, lo cual provoca cambios en el perfil de liberación, entre otras desventajas <sup>22</sup>. Por otro lado, los componentes básicos que se requieren para la fabricación de una NE son aceite, surfactante y agua, pudiendo también tener un co-tensioactivo y co-disolvente, como ocurre en la mayoría de las formulaciones. Las NE son un sistema isotrópico, termodinámicamente estable, transparente o translúcido <sup>23-25</sup> con un rango de tamaño de gota medio de 20-500 nm <sup>26,27</sup>. Debido a su pequeño tamaño, tiene la capacidad de cruzar membranas biológicas y, por lo tanto, aumentar la exposición a blancos terapéuticos, comparado con el fármaco sin estar encapsulado. Además, se asocia con la ventaja de minimizar efectos adversos y reacciones tóxicas ya que se utilizan materiales biocompatibles <sup>28</sup>. Los métodos de fabricación se agrupan en dos grupos, de alta y de baja energía. Los de alta energía requieren de una fuerza mecánica para estabilizar a la NE, y los de baja energía se estabilizan por el potencial químico de los materiales y otros factores como la temperatura y el balance hidrofílico-lipofílico <sup>29,30</sup>. Dentro de las metodologías de alta energía están la homogenización de alta presión, la microfluidización y la ultrasonificación. En los de baja energía están el método de la temperatura de inversión de fase, auto nanoemulsificación y el método de desplazamiento de solvente <sup>28</sup>. Este último es de nuestro particular interés, ya que es un método de fácil preparación y uno de los más descritos <sup>28</sup>. Este método ocupa un solvente miscible en agua como etanol o acetona, en el cual se solubiliza la fase oleosa, luego esta se vierte sobre la fase acuosa y, por desplazamiento de solvente, se genera la NE <sup>31</sup>.

### **Micelas de núcleo lipídico**

Como ya se mencionó, dentro de los sistemas mixtos, se encuentran las LCM. Este tipo de sistemas han sido descrito como micelas híbridas, micelas *PEG-PE* (PEG-fosfatidiletanolamina, en inglés) o micelas mixtas, entre otros (pero en este trabajo usaremos el concepto de LCM). Este nanosistema es una partícula coloidal autoensamblada con menos de 100 nm de núcleo hidrofóbico y exterior hidrofílico <sup>32</sup>. Las LCM se han utilizado para la solubilización de varios fármacos poco solubles en agua como paclitaxel <sup>33</sup>, camptotecina <sup>34</sup> y vitamina K3 <sup>35</sup>. Para desarrollar este nanosistema, el uso de materiales híbridos es imprescindible. Un interesante material híbrido es el Gelucire 44/14 usado ampliamente en diferentes estrategias de administración de medicamentos. Este material está compuesto por glicéridos de polietilenglicol (PEG), una mezcla de mono-, di- y triglicéridos y mono- y diésteres de PEG. Gelucire 44/14 tiene un carácter anfifílico con propiedades de surfactantes. Gelucire 44/14 se ha usado para sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes <sup>36</sup>, nanopartículas lipídicas sólidas <sup>37</sup> usualmente usado como cosurfactante. Sin embargo, a la fecha no hay reportes del uso de este material

como principal componente de partículas lipídicas. Con sus propiedades, Gellucire 44/14 es un gran candidato para desarrollar una nueva formulación para las LCM. La formación de micelas depende de la concentración micelar crítica (CMC por su nombre en inglés). Este valor puede verse afectado por la temperatura, la presión y otros factores, y es específico para cada agente tensioactivo. En el caso de Gelucire 44/14, su CMC es de 72 mg/L a temperatura ambiente, como reportan los fabricantes. También hay metodologías más complejas para generar micelas como lo describe I. Friedrich, C.C. Müller-Goymann <sup>38</sup> que desarrolló nanosuspensiones de micelas inversas utilizando Ultra-Turrax y luego técnicas de homogeneización a alta presión, con el objetivo de una mejor eficiencia del proceso y una solución micelar inversa. Otra consideración para Gelucire 44/14 es que es sólido a temperatura ambiente y su punto de fusión es de 44 °C, esto hace que el uso del calor para fundirlo sea necesario y así el fármaco se disperse en el Gelucire. Considerando esto, una metodología no descrita para micelas, que se ajusta bien a la característica Gellucire 44/14, es el método de emulsificación por fusión en caliente. Este método se ha descrito para NE / microemulsión <sup>39</sup> y SLN <sup>40</sup>. Además, este proceso generalmente se describe como un primer paso seguido de un paso de homogeneización como la homogeneización de alta presión <sup>41</sup>. Todas las características presentadas hacen de este material un gran candidato para el desarrollo de las LCM.

### **Nanocristales**

Los NC son partículas hechas de fármaco estabilizadas por surfactantes o estabilizadores estéricos poliméricos <sup>42,43</sup>. Por lo tanto, estas partículas poseen una eficiencia del proceso de fabricación del 100% en contraste con las nanopartículas de matriz, como las nanopartículas lipídicas o poliméricas ya mencionadas. Los NC se producen generalmente en un medio de dispersión líquido, formando una nanosuspensión. Los NC están hechos de fármacos poco solubles en agua, ya que, si fueran solubles, el fármaco estaría disuelto, por lo tanto, los fármacos solubles en agua no pueden formularse como un NC (al menos no en un medio de dispersión acuoso). Los NC pueden resolver problemas de baja biodisponibilidad después de la administración oral, baja penetración en la piel, volúmenes de inyección demasiado grandes para administración intravenosa, y evitar efectos secundarios indeseados después de la inyección intravenosa cuando se usan formulaciones con algunos solubilizantes o complejándolos con ciclodextrinas, estas han mostrado efectos nefrotóxicos al administrar hidroxipropilciclodextrina con itraconazol <sup>44,45</sup>. Esto se debe a las ventajas que tienen por estar en el rango nanométrico, como aumento de la velocidad de saturación, aumento de la velocidad de disolución y aumento de la adhesividad a las superficies o membranas celulares <sup>46</sup>. Las metodologías para la fabricación de NC están divididas en dos grupos, las tecnologías de abajo hacia arriba (*Bottom up technologies*) y las tecnologías de arriba hacia abajo (*Top down technologies*). Dentro de las primeras podemos encontrar la metodología de dispersión coloidal de colorantes insolubles precipitados <sup>47</sup>, que es un proceso de precipitación en donde

hay que controlar la estructura del cristal que se forma y que no crezca el cristal a tamaños  $\mu\text{m}$ . Otras metodologías son la sonocristalización, mezcla en vórtex de entradas múltiples, entre otros <sup>46</sup>. La desventaja de muchos procesos de precipitación es el uso de solventes orgánicos, que deben eliminarse nuevamente en la mayoría de los casos, lo que aumenta los costos. En los métodos de las tecnologías de arriba hacia abajo se parte de cristales grandes en el rango  $\mu\text{m}$  y desciende al rango nanométrico disminuyendo los cristales, es decir, realizando un proceso de molienda. Se ocupa la molienda húmeda, en donde las partículas del fármaco están dispersas en una solución de agente tensioactivo/estabilizante. Un proceso de molienda de baja energía es el molino de perlas <sup>17,48</sup>. La suspensión se agrega a un recipiente de molienda que contiene perlas de molienda, de tamaños de 0,2 mm o de 0,4-0,6 mm. Otras metodologías son la homogeneización de alta presión, los homogeneizadores de hueco de pistón <sup>49</sup>, entre otros. También se desarrollaron metodologías en medios no acuosos (por ejemplo, aceites, PEG líquidos) o reducidos en agua (por ejemplo, mezclas de glicerol / agua) <sup>46</sup>. Las dispersiones oleosas pueden llenarse directamente en cápsulas de gelatina para administración oral, o inyectarse por vía parenteral como depósito controlado de administración de fármacos. También están las metodologías combinadas en donde primero se precipitan los cristales y luego la suspensión se somete a un proceso de alta energía como la homogenización de alta presión <sup>50</sup>.

Con todas las posibilidades, una forma de superar el desafío de formular fármacos de clase II es incorporarlos a nanosistemas y/o los fármacos nanonizados en films poliméricos mucoadhesivos para administrarlos por la vía bucal. La finalidad de este sistema de entrega de fármaco sería buscar una administración controlada y prolongada para generar un efecto sistémico. Por lo tanto, esta tesis buscó comparar diferentes técnicas de inclusión de principios activos a las tintas de impresión y generar estas tintas con la finalidad de que las proyecciones de este trabajo terminen en el sistema propuesto.



## **HIPÓTESIS**

Tintas de impresión de base acuosa pueden estar cargadas con un fármaco de baja solubilidad acuosa (clase II BCS), encapsulado en nanosistemas lipídicos o fármaco nanonizado y conservar sus características fisicoquímicas y de desempeño farmacéutico, y aumentando la cantidad del fármaco en la tinta por sobre el valor de su solubilidad.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar las variables que determinan el desempeño en el proceso de impresión y la eficiencia de impresión, de un fármaco de baja solubilidad acuosa (nifedipino), cargado en nanosistemas que componen las tintas de base acuosa, sobre una superficie inerte.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar y caracterizar nanocristales de nifedipino y desarrollar su tinta para impresión.
2. Desarrollar y caracterizar micelas con nifedipino y desarrollar su tinta para impresión.
3. Desarrollar y caracterizar nanoemulsión con nifedipino y desarrollar su tinta para impresión.
4. Estudiar la estabilidad, eficiencia de asociación, carga de fármaco y liberación del fármaco desde los nanosistemas.
5. Imprimir las tintas sobre un film inerte y caracterizar los nanosistemas post impresión.

## MATERIALES

- Metanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Etanol (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Diclorometano (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Agua MiliQ (Millipore, Sao Paulo, Brasil)
- Poloxámero 188 (Kolliphor®) (BASF, Suecia)
- Tween 20 (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Tween 80 (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Span 80 (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Nifedipino (NFD) (AK Scientific, California USA)
- Gelucire 44/14 (Gattefossé, Sao Paulo, Brasil)
- Waglinol (Industrial química lasem, s. a., Barcelona, España)
- Glicerina 84% (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Filtro de jeringa 0.45  $\mu\text{m}$  (Agelaa technologies, DE, USA)
- Filtro de jeringa 0.22  $\mu\text{m}$  (Agelaa technologies, DE, USA)
- Rejilla de cobre (grid) (Ted pella inc, CA, USA)
- Ácido fosfotugstico (Sigma-aldrich, Alemania)

# MÉTODOS EXPERIMENTALES

## Sección experimental de tinta de NC de NFD

### NC de NFD por HSH

Los NC fueron desarrollados en una solución acuosa de poloxamero 188 o tween 80 y el NFD fue nanonizado utilizando el método de homogenización de alta cizalla (*high shear homogenization*)<sup>51</sup> usando un T 25 digital ULTRA-TURRAX® y probando distintas variables del proceso cambiando una a la vez (Tabla 1). Se preparó la solución de surfactante, a la que se le agrego el principio activo y se realizaron los procedimientos de la Tabla 1. Algunas muestras fueron filtradas en un filtro de jeringa por lo menos, de tamaño de retención 0.45 µm hechos de politetrafluoroetileno. Las muestras fueron almacenadas para caracterizaciones posteriores.

### Tinta de NC de NFD

Las tintas se desarrollaron basadas en los trabajos previos, las cuales tienen una viscosidad similar a las tintas de impresión normal, son de base acuosa y se incluyeron en ellas los NC junto a la glicerina en una proporción de nanosistemas: glicerina de 70:30 v/v<sup>52</sup>.

### Caracterización NC de NFD

La distribución de tamaños, tamaño promedio, polidispersidad (PDI) y potencial zeta fueron determinados en un Malvern Zetasizer Nano ZS por dispersión dinámica de la luz y electroforesis doppler con láser.

Tabla 1. Formulación base de NC y sus variaciones en cuanto al uso de poloxámero 188, el ciclo de homogenización y la velocidad de corte.

<b>Materiales</b>	<b>Formula base</b>	<b>Variantes</b>
<b>NFD (mg)</b>	10	--
<b>Sol. Poloxámero 188 (0.1%)</b>	csp 4mL	csp 5 mL/ 0.5%/ 4%/ Tween 80 4% y 0.1%
<b>Ciclo de alta cizalla</b>	3 ciclos de 3 min con intervalos de 1 min	5 ciclos de 3 min con intervalos de 1 min
<b>Velocidad (Krpm)</b>	16	20/ 24

## Sección experimental de tinta de LCM de NFD

### LCM de NFD por emulsificación en caliente

Las LCM fueron desarrolladas en formulaciones que contienen Gellucire 44/14, Tween 20, Span 80 y agua. Se utilizó el método descrito como emulsificación en caliente (Tabla 2).<sup>40,41</sup> Primero se calentó agua mili Q a 70°C al mismo tiempo que la fase oleosa. La fase oleosa está compuesta por Gelucire 44/14, Tween 20 y Span 80 y es calentada en un baño de glicerina y agitación. Cuando ambas fases estuvieron a 70°C se mezclaron vertiendo la fase acuosa sobre la oleosa con agitación fuerte e inmediatamente se le agregó el agua fría (4 °C). La mezcla se retiró del baño de aceite y se agitó durante 5 minutos más. Para las LCM cargadas con NFD, se añadió el NFD junto a la fase oleosa y también se calentó esta hasta 70°C. Las cantidades de NFD agregadas fueron 30, 45 y 60 mg. Después de agitar, las muestras se centrifugaron por 30 min a 5000 rpm y se almacenaron.

Tabla 2. Detalles de las formulaciones F30 y F20 de LCM.

<b>MATERIALES</b>	<b>F30</b>	<b>F20</b>
<b>GELUCIRE 44/14</b>	1200 mg	800 mg
<b>TWEEN 20</b>	188 mg	125 mg
<b>SPAN 80</b>	52 mg	35 mg
<b>AGUA MILI Q</b>	2560 mg	3040 mg
<b>AGUA MILI Q (4 °C)</b>	60 ml	60 ml
<b>NFD</b>	30, 45 y 60	30, 45 y 60

### Tinta de LCM de NFD

De forma similar a los NC de NFD, las tintas se desarrollaron manteniendo la proporción 70:30 v/v nanosistemas:glicerina.

### Caracterización de las LCM de NFD

De forma similar a los NC de NFD, se caracterizó distribución de tamaños, tamaño promedio, polidispersidad y potencial zeta. La morfología de las partículas se analizó por microscopía de transmisión electrónica (TEM) con el equipo Inspect F50 (FEI). Para TEM, se sembró una gota de muestra en una rejilla de cobre (grid) durante 2 minutos. Posteriormente, se lavó la rejilla con agua por un minuto. Luego se depositó una gota de ácido fosfotúngstico 0.1% durante 2 minutos, se retiró el exceso y se dejó secar durante la noche.

### **Caracterización del estado físico de las LCM de NFD**

Se estudio el estado físico de las LCM por medio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en un DSC131 Evo (Calisto Inc, USA). Esta técnica cuantifica la diferencia en la cantidad de calor para aumentar la temperatura de la muestra y la referencia. Las condiciones programadas fueron un ascenso de temperatura de 25 °C a 65 °C a 5 °C /min. En las cubetas utilizadas, se pesaron de 2 a 3 mg de muestra.

Además, se estudiaron muestras secas luego de ser liofilizadas en un liofilizador FreeZone I LABCONCO (Merck). Las muestras se congelaron en un refrigerador a -18°C, y una vez congelada se llevó a un refrigerador a -80 °C (*Ultra-low temperature freezer*, Haier biomedical, UK) por 3 horas. Esto se liofilizó y se almacenó. Para la muestra concentrada, 20 mL de F30-30 mg de NFD fueron rotaevaporados en un rotavapor R-210 (BUCHI, Suiza) hasta que se alcanzó un volumen de 5 mL.

### **Sección experimental de tinta de NE de NFD**

#### **NE de NFD por desplazamiento de solvente**

Las NE fueron desarrolladas en formulaciones que contuvieron lecitina de soya (Epikuron 145v), wagliol, etanol y agua, basado en trabajos previos y se realizó una optimización de la formulación (Tabla 3). Se usará el método de desplazamiento de solvente. Primero se disolvió la lecitina en etanol en un tubo de ensayo usando un vórtex. Luego se agregó el wagliol y se homogenizo para constituir la fase orgánica. En caso de estar cargadas con NFD, este se agregó junto con el wagliol. Se vertió la fase orgánica sobre la fase acuosa en agitación fuerte y se dejó agitar por 5 minutos. La NE se rotaevaporó hasta disminuir a un volumen de 5 mL.

Tabla 3. Detalle de las formulaciones F3 y F4 de NE.

<b>Materiales</b>	<b>F3</b>	<b>F4</b>
<b>Lecitina</b>	50.3 mg	151 mg
<b>Wagliol</b>	150.9 mg	352 mg
<b>Etanol</b>	2 mL	2 mL
<b>Agua</b>	20 mL	20 mL
<b>NFD</b>	10 y 25	10, 25 y 50

#### **Tinta de NE de NFD**

De forma similar a los NC de NFD, las tintas se desarrollaron manteniendo la proporción 70:30 v/v nanosistemas:glicerina

### **Caracterización de las LCM de NFD**

De forma similar a las LCM de NFD, se caracterizó distribución de tamaños, tamaño promedio, polidispersidad, potencial zeta y morfología.

## **Sección experimental de tintas de impresión**

### **Estabilidad de las tintas**

La estabilidad se analizó a través de los cambios en los parámetros de tamaño, PDI y potencial zeta durante un mes sometido a condiciones ambientales (25°C) y refrigeradas (4°C) y protegidos de la luz. Se midió la estabilidad a las tintas cada 7 días durante 4 semanas.

### **Eficiencia de encapsulación (EE) y Carga de fármaco (DL) de LCM**

La eficiencia de asociación en caso de las LCM, el NFD se midió disolviendo directamente las LCM en una solución solubilizante de metanol:diclorometano 80:20 (%v/v) en una razón 1:5 (%v/v) de nanosistemas:solvente. La cantidad de NFD se determinó en un cromatógrafo líquido de alta resolución Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, USA). La columna que se usó fue una Inertsil ODS-4 (C18, 5 µm 4.6x150 mm) a 40±1 °C. La fase móvil utilizada fue metanol:agua 60:40 (%v/v) a un flujo de 1mL/min. El volumen de inyección fue de 20 µL y la detección a 237 nm. El límite de detección fue de 0,002 mg/mL y el límite de cuantificación fue de 0,25 mg/mL con un R<sup>2</sup>= 0.9993. La eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco están definidas por las siguientes formulas:

$$\% \text{ Eficiencia de encapsulación (EE)} = \frac{\text{Cantidad de NFD encapsulado (mg)}}{\text{Cantidad de NFD agregado (mg)}} \times 100$$

$$\% \text{ Carga de Fármaco (DL)} = \frac{\text{Cantidad de NFD encapsulado (mg)}}{\text{Cantidad de excipientes (g)}} \times 100$$

### **Eficiencia de encapsulación (EE) y Carga de fármaco (DL) de NE**

La eficiencia de encapsulación para NE se determinó disolviendo los nanosistemas en metanol. El NFD fue cuantificado en un cromatógrafo líquido de alta resolución al igual que las LCM. La eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco están definidas por las ecuaciones ya descritas para LCM.

### **Estudio de liberación de LCM**

El estudio de liberación se llevó a cabo para las LCM en buffer fosfato (10 mM a pH 7) a 37°C de temperatura y 75 rpm en una incubadora (Labtech, Chile) por medio del método de bolsas de diálisis. Se usaron bolsas de diálisis (SnakeSkin® Dialysis Tubing, Thermo Scientific, USA) con un corte de peso molecular de 3500 Da. Las bolsas fueron cortadas de 7.5 cm, selladas en el extremo inferior, cargadas con 4 mL de muestra, sellados en el extremo superior y puestas en 26 mL de buffer fosfato para mantener condiciones sink. Se cuantificó el nifedipino en las muestras por medio del método HPLC ya descrito.

El muestreo fue realizado a las 0, 3, 6, 24, 48 y 96 horas. La liberación del fármaco está dada por la siguiente ecuación:

$$\%Fármaco liberado = \frac{Cantidad\ de\ NFD\ cauntificado\ (mg)}{Cantidad\ de\ NFD\ cargado\ en\ bolsa(mg)} \times 100$$

### **Estudio de liberación de NE**

El estudio de liberación se llevó a cabo de forma similar a al estudio de las LCM, pero los tiempos de muestreo fueron 0, 3, 6, 24, 48 y 144 horas.

## **Sección experimental de impresión**

### **Proceso de impresión**

Para la impresión se utilizaron los cartuchos de Hewlett Packard (122) compatibles con la impresora Hewlett Packard Deskjet 1000 (CA, EE. UU.). Se abrieron, se vaciaron de la tinta y se limpiaron a fondo con una solución hidroalcohólica. Finalmente, se realizaron tres ciclos de sonicación de 3 minutos cada uno. Las soluciones de tinta se vertieron en los cartuchos. La tapa se reemplazó y luego el cartucho se insertó de nuevo en la impresora. Se utilizaron láminas de tereftalato de polietileno como sustrato de impresión para recoger y estudiar las muestras impresas. Para configurar las áreas de impresión, se utilizó Microsoft Word al imprimir con la mejor calidad de impresión, es decir, 600 × 600 puntos por pulgada (ppp) desde la configuración de la impresora. Para todas las condiciones de impresión, se imprimieron plantillas negras en cuadrados de 7 cm × 7 cm por cuadruplicado.<sup>52</sup> Uno de los cuadrados se arrastró con agua mili Q y se almacenó para caracterizaciones posteriores.

### **Caracterización de los nanosistemas post impresión**

Se caracterizaron los nanosistemas post impresión (POI) en términos de tamaño, PDI y potencial zeta, usando la metodología ya descrita para los NC. Se utilizó un cuadrado impreso arrastrado con agua mili Q.

### **Eficiencia de impresión (EI) de las tintas de NFD**

La EI se determinó en los otros 3 cuadrados que se arrastraron por separado. Tanto las NE como las LCM, se arrastraron con 1.5 mL de metanol y fueron cuantificadas en HPLC, como ya fue descrito. La EI esta descrita por la siguiente formula:

$$\%Eficiencia\ de\ impresión\ (EI) = \frac{Cantidad\ de\ NFD\ impreso\ (mg)}{Cantidad\ de\ NFD\ encapsulado\ (mg)} \times 100$$

# RESULTADOS

## Resultados de tintas de NC de NFD

### Caracterización de NC

Los NC fueron elaborados por la técnica de homogenización de alta cizalla. La formulación previamente desarrollada en el laboratorio fue probada para NFD, que, si bien lograba tamaños menores a 200 nm y con un PDI menor a 0.450 (Figura 1), esto solamente ocurría luego de un proceso de filtrado en un filtro de jeringa con un tamaño de poro de 0.45 o 0.2  $\mu\text{m}$ . Las poblaciones de tamaños para ambos casos fueron monomodales después de ser filtrados, pero el pico era ancho, lo que explica los valores de PDI. Esto indica que, si bien era una población monomodal, el rango de tamaños dentro de esa población era amplio. Sin filtrar, los NC no se forman homogéneamente y tampoco en un rango solamente nanométrico, teniendo también, tamaños superiores a 1  $\mu\text{m}$ . Una de las limitantes del proceso de filtrado es la pérdida de fármaco en el filtro, y en este caso, la mayoría del fármaco fue retenido en el filtro, por lo que la pérdida de fármaco era considerable. Dependiendo de la metodología utilizada, así como los estabilizantes usados, se han reportado NC de rangos entre 200-100 nm de manera reproducible<sup>53</sup>, lo que hace que los NC elaborados por el método utilizado, no sean de utilidad. Aun así, los NC filtrados se utilizaron para elaborar la tinta de impresión y observar si la impresión tenía algún efecto sobre los NC, a modo de ensayos preliminares. Como se puede observar en a Figura 1, la impresión desestabiliza el sistema, produciendo agregación, haciendo que los NC crezcan en tamaño y PDI.

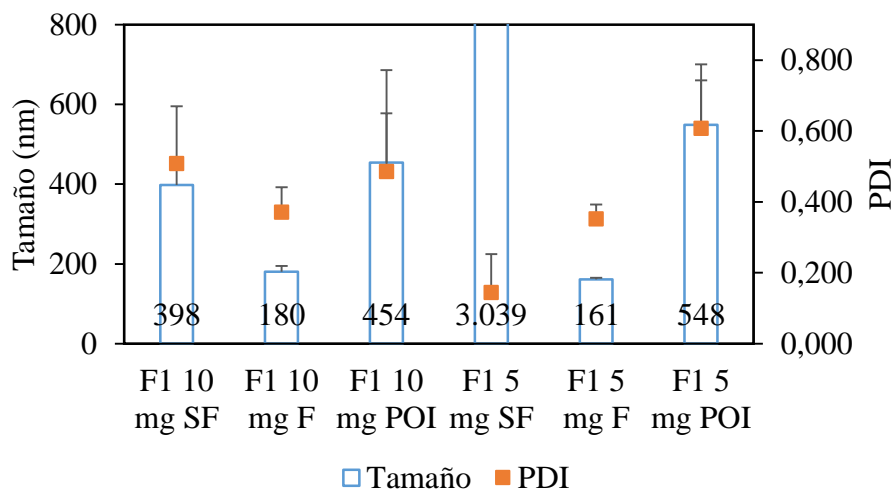


Figura 1. Tamaño y PDI de NC de NFD de 5 y 10 mg, sin filtrar (SF), Filtrados (F) en filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y post impresión (POI).



Los cristales también obstruían el cartridge luego de algunas impresiones, lo cual también se explica por el crecimiento de las partículas. Además, dentro de los estudios preliminares se cuantificó la cantidad de NFD que atravesaba por el filtro de jeringa, la cual era inferior al 5% (información de los estudios preliminares no mostrada). Para resolver estos problemas se realizaron modificaciones al proceso de elaboración y a la formulación de los NC. Las variables de la metodología son la velocidad de cizalla y el tiempo en que se aplicaba esta. Las variables de la formulación fueron el surfactante utilizado, la concentración de surfactante y el volumen de la solución. Se realizaron cada uno de los cambios indicados en la Tabla 1, modificando una variable a la vez, dando un total de 9 formulaciones distintas incluyendo a la original (Tabla 4).

Tabla 4. Detalle de las formulaciones de NC filtradas, con la modificación del proceso original.

<b>Formulación</b>	<b>Variable</b>
<b>F1</b>	Original (Tabla 1)
<b>F2</b>	5 ml de Poloxámero
<b>F3</b>	20 Krpm
<b>F4</b>	Poloxámero 0.5%
<b>F5</b>	5 ciclos de cizalla
<b>F6</b>	Poloxámero 4 %
<b>F7</b>	Tween 4%
<b>F8</b>	24 Krpm
<b>F9</b>	Tween 0.1%

Los resultados de las modificaciones fueron variables, en su mayoría en un solo rango de población, pero al igual que la original, de picos anchos y de un tamaño promedio alrededor de los 150 nm (Figura 2). Si bien F3 y F6 generan una mejora en las propiedades físicas de los NC respecto a la original, ninguna de las modificaciones generó un cambio sustancial en el tamaño antes de la filtración, por lo que el problema de la gran cantidad de NFD eliminado por el filtrado, no se logró resolver. Por esto, no se pasó a la siguiente etapa del estudio. En cuanto al potencial zeta, la tendencia general fue una carga de -20 mV, con algunos sistemas de valores más cercanos a cero, pero no hay ninguna tendencia en particular relacionada a esto.

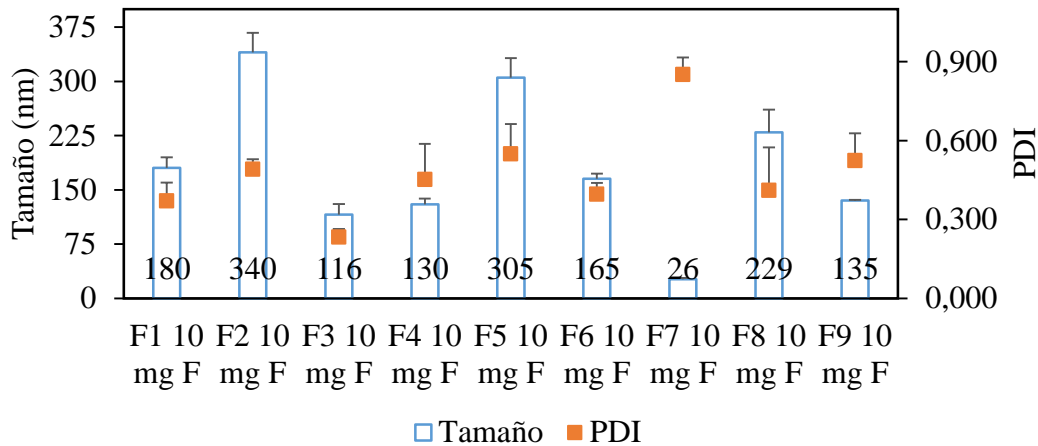


Figura 2. Gráfico de formulaciones de NC de NFD de 10 mg filtrados (F), en términos de tamaño y PDI. De F1 a F5 se filtraron en filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y las F6 a F9 en 0.45  $\mu\text{m}$ .

## Resultados de tintas de LCM de NFD

### Caracterización de LCM

Las LCM fueron desarrolladas por el método de emulsificación en caliente, mayormente descrito para nanopartículas lipídicas sólidas, pero por los reactivos utilizados, más específicamente gelucire 44/14, era un método adecuado para la generación de las LCM. En la figura 4 se muestra un tamaño en promedio de  $11.5 \pm 2.0$  nm con una alta reproducibilidad de los resultados. La formulación F30 muestra menos diferencia en tamaño que la F20 y la incorporación de NFD no produce ningún cambio estadísticamente significativo. El promedio de PDI es  $0.228 \pm 0.024$ , lo cual también es bajo y puede estar relacionado a una población única en un rango de tamaño no muy amplio. El valor de PDI es similar en casi todas las formulaciones, y solo en F30-45 mg NFD tiene un PDI mayor al promedio, pero  $0.343 \pm 0.01$  sigue siendo un valor bajo e indicativo de una estrecha dispersión de tamaños<sup>54</sup>. Comparando con otras micelas similares, estos resultados son de tamaño y PDI bajos, sin importar si el método de fabricación es de alta o baja energía. Comparando con métodos de alta energía, se han descrito micelas desarrolladas por la aplicación de vórtex por un tiempo prolongado a un film de diacillipid-PEG<sup>55</sup> y también con filtración posterior<sup>33</sup>. Los tamaños de estas micelas están en los rangos de 7-15 nm, 7-20 nm y 10-35 nm. El primer y segundo rango son similares, pero con mayor variabilidad. Además, para comparar con un método de baja energía, los SMEDDS son similares a las micelas. En particular, uno desarrollado usando Gelucire 44/14 con el método de titulación con agua, muestra tamaños entre  $31.7 \pm 7.8$  nm y  $73.1 \pm 22.7$ , con PDI 0.720 y 1.105 respectivamente<sup>56</sup>. Estos datos dependen de la formulación desarrollada, pero incluso versus la mejor formulación de SMEDDS, las micelas desarrolladas tienen tamaños menores y con PDI más estrechos. El potencial zeta es  $-7,4 \pm 5,1$  mV, pero en la formulación no hay ningún reactivo que le

otorgue carga al nanosistema, lo que también explica la alta desviación estándar. Esto es un aspecto que se puede mejorar en estas formulaciones para darle una mejor estabilidad coloidal. Si bien estas LCM no están estabilizadas por la carga, están PEGiladas gracias a Gelucire 44/14. PEG es conocido por ser altamente hidratante y soluble en agua logrando un efecto de estabilización estérica con estas LCM <sup>57</sup>. La adición de NFD no afecta significativamente ninguno de los parámetros ya mencionados (Figura 3). La metodología desarrollada para las LCM es reproducible, con la ventaja de ser un método de baja energía, evitando el uso de ultrasonificación o homogenización de alta presión para obtener tamaños pequeños y bajos PDI. La baja distribución de tamaño y homogeneidad de las LCM también fue observada por microscopia usando la técnica de TEM (Figura 4).

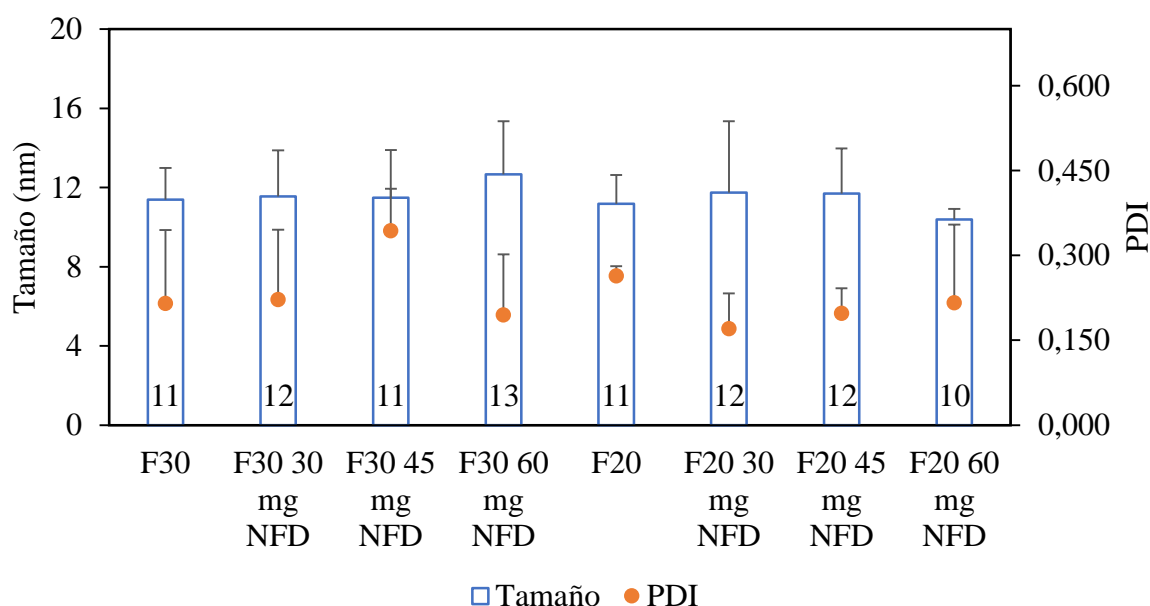


Figura 3. Gráfico de tamaño (nm) y PDI de ambas formulaciones en triplicado, cargadas con y sin NFD.

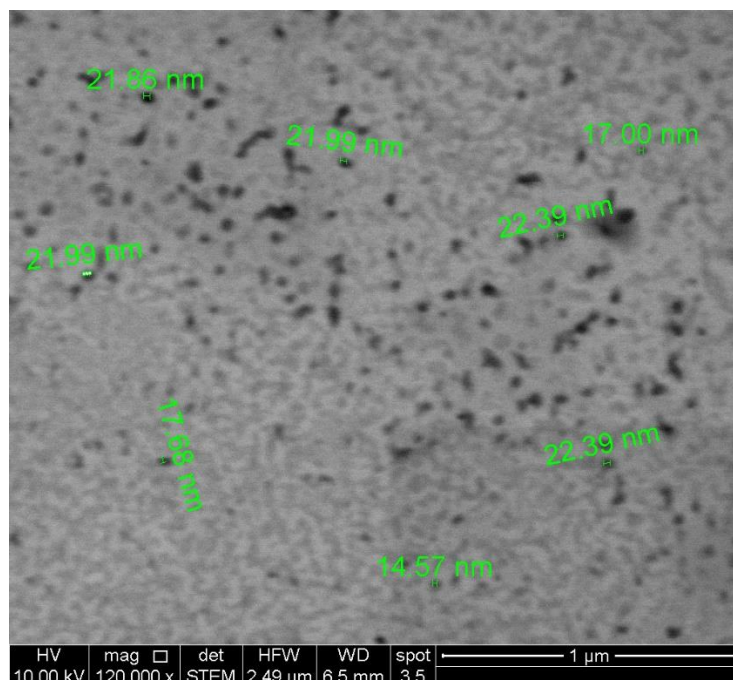


Figura 4. Imagen TEM de F30 sin NFD.

#### Caracterización del estado de las LCM de NFD

Para investigar el estado físico de las LCM (Gelucire 44/14 tiene un punto de fusión de 44°C, así que es sólido a temperatura ambiente) dos experimentos de DSC fueron ejecutados. Primero, una solución concentrada de LCM en una cubeta hermética se analizó; y segundo, LCM liofilizadas fueron analizadas en una cubeta convencional de DSC. En la Figura 5 se muestra la comparación de las dos muestras con el Gelucire 44/14 sin procesar, y solo las LCM liofilizadas muestran un pico endotérmico, pero en solución no ocurrió, así que incluso si las LCM liofilizadas están en estado sólido, en solución no lo están. Este experimento es común para SLN, donde el pico térmico del lípido sólido se puede ver tanto en el lípido sin procesar como en las SLN<sup>58</sup>. Como es posible ver en la Figura 6, se observa un claro pico endotérmico, que no puede ser visto en el gráfico de comparación debido a la diferencia de magnitudes de los pico. También hay un decaimiento interesante del punto de fusión respecto al del Gelucire en las LCM liofilizadas, lo cual puede ser explicado por el efecto plastificante pueden que producir los surfactantes como el tween y el span usados en la formulación. Se ha descrito que mezcla de diferentes materiales pueden tener un efecto plastificante y un efecto en las propiedades físicas como el punto de fusión<sup>59</sup>.

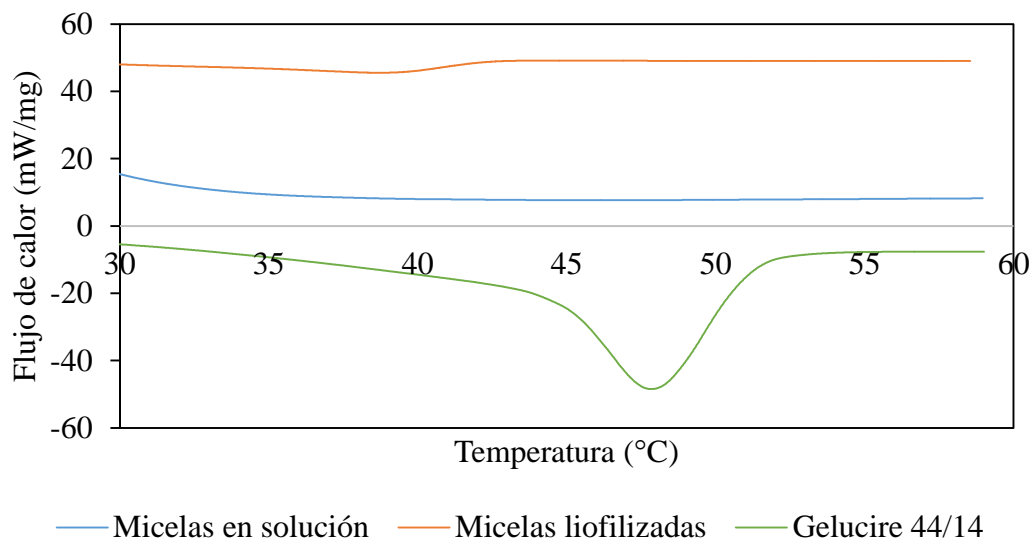


Figura 5. Comparación de gráficos de DSC entre LCM en solución, LCM liofilizadas y Gelucire 44/14 en unidades de flujo de calor (mW/mg) vs temperatura (°C) (+25mW y +50 mW respectivamente).

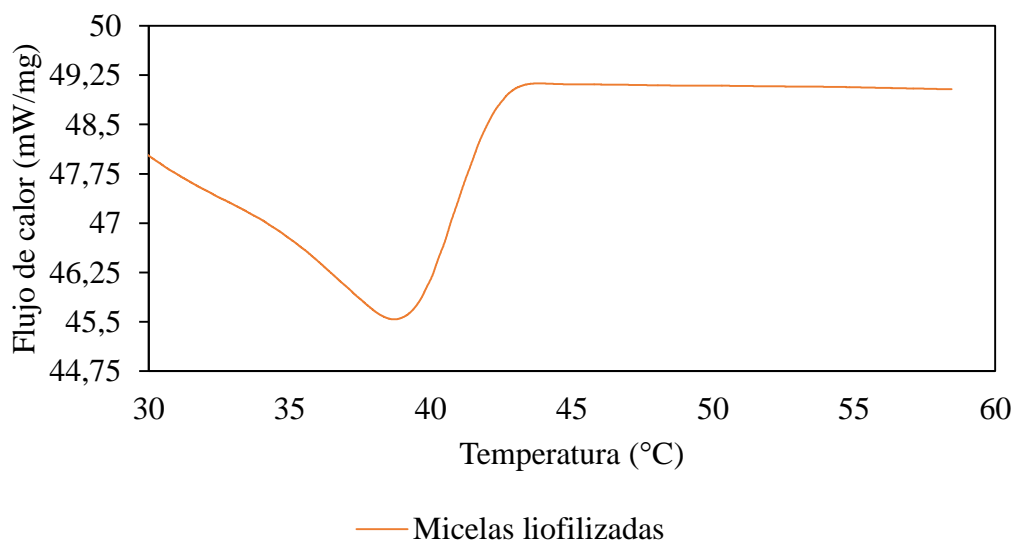


Figura 6. DSC de LCM liofilizadas en su propia escala (+50 mW).

## Resultados de tintas de NE de NFD

### Caracterización de NE

Las NE fueron elaboradas por un método ampliamente descrito, que es el de desplazamiento de solvente <sup>31</sup>. Las NE se han utilizado para encapsular fármacos de baja solubilidad acuosa tal como ketoconazol <sup>60</sup>, camptotecina <sup>61</sup>, atorvastatina <sup>62</sup> entre otros fármacos. Las primeras formulaciones desarrolladas (información no mostrada) fueron desarrolladas a partir de una fórmula que contenía acetona en la fase

orgánica. Esto se modificó y se utilizó solo etanol. La eliminación de este solvente de la formulación permite que moléculas un poco más sensibles a solventes orgánicos y que se puedan degradar, tal como las proteínas, sufran un menor grado de degradación. Con esta metodología, se desarrollaron dos formulaciones que fueron cargadas con distintas cantidades de NFD (Tabla 3). La diferencia principal entre las dos formulaciones desarrolladas es que F3 tiene menor cantidad de fase interna y menor cantidad de surfactante en proporción a la fase grasa. En relación al tamaño F3 es menor y se encuentra en el rango de 150 nm, a diferencia de F4 que está entre los 200 a 250 nm (Figura 7). Los rangos de tamaño se pueden confirmar en la figura 8 y 9. Esto quizás tenga relación con la cantidad de fase interna, ya que al ser menor en F3, esta tiene mayor probabilidad de tener una buena dispersión al momento de formarse. Cuando se carga con activo el tamaño no cambia en caso de F3, no así con F4, que sufre una caída de tamaño y al ir aumentando la cantidad de NFD, el tamaño también aumenta, incluso superando a la formulación no cargada. El PDI es menor en F3, y en el caso de F4 ocurre un fenómeno similar a lo sucedido con el tamaño (Figura 7). La mayoría de las formulaciones muestra solamente una población, pero las formulaciones con un PDI más alto, tienden a tener una segunda población de menor proporción o un pico mucho más ancho, lo cual indica que el rango de tamaños en los que se encuentra el pico es mayor. Si se comparan con otras formulaciones cargadas con fármacos de baja solubilidad en agua, se pueden encontrar rangos similares de tamaño <sup>62</sup> e incluso menores a 100 nm <sup>61</sup>. El parámetro de potencial zeta, es similar en la formulación F3, no así en F4 que se va reduciendo mientras más fármaco tiene cargado, pero, aun así, es mayor en la mayoría de los casos con respecto a los de F3 (Figura 10).

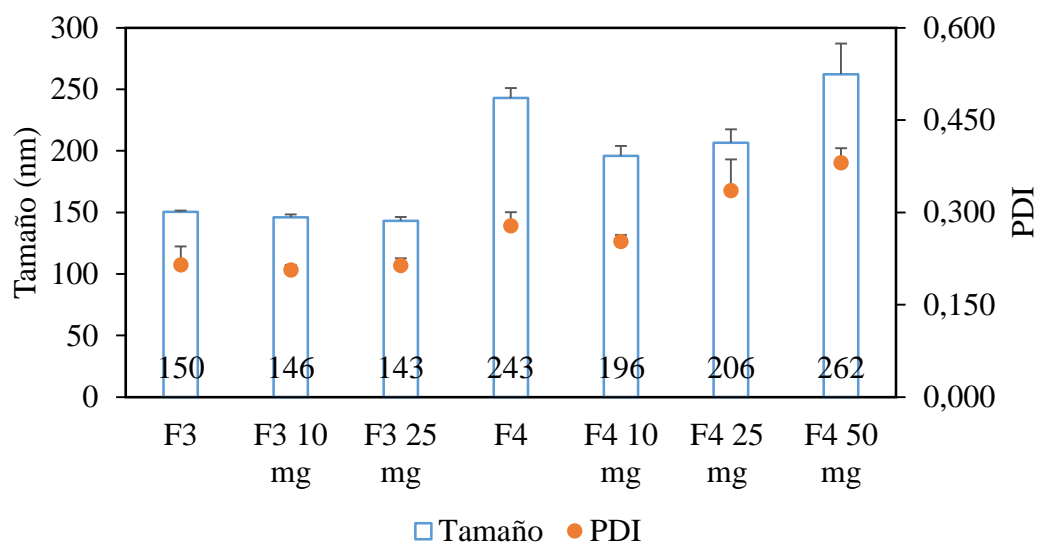


Figura 7. Comparación de tamaños y PDI en procesos NE.

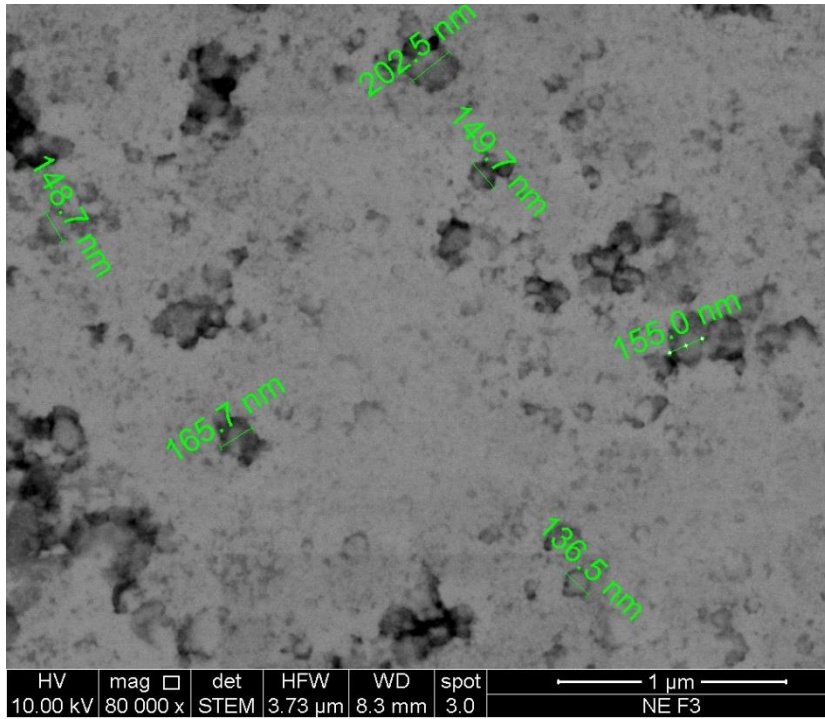


Figura 8. Imagen TEM de NE F3.

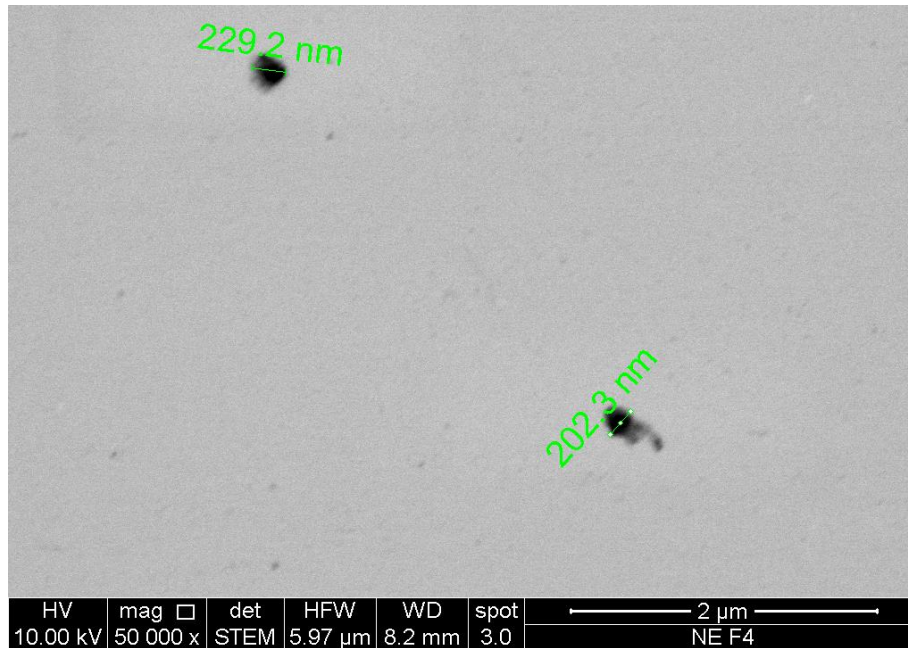


Figura 9. Imagen TEM de NE F4.

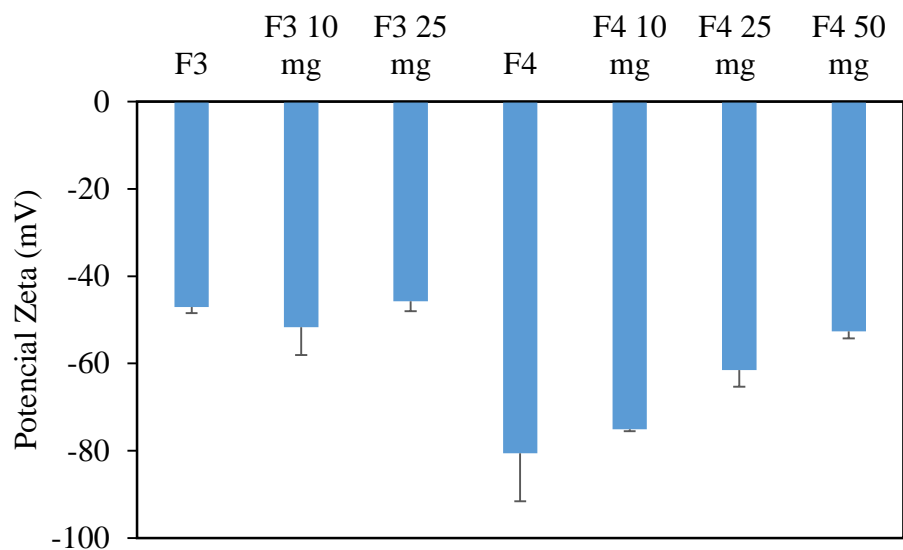


Figura 10. Comparación de potencial zeta en procesos NE.

## Resultados de tintas de impresión pre impresión

### Micelas

La EE fue estudiada y se puede concluir que las LCM tienen un mejor perfil de EE en las formulaciones de F30, probablemente porque tienen más Gelucire, por consecuencia, una mayor cantidad LCM y más NFD encapsulado. La formulación con la mejor EE fue F30 con 30 mg de NFD como se puede observar en la Figura 11. Con mayores cantidades de NFD la EE decrece, lo cual podría estar relacionado con la capacidad de carga máxima de la formulación. Ya que todo lo que no es encapsulado usualmente, entre la primera y segunda semana, precipita y recristaliza, lo cual no ocurre con F30 30 mg de NFD en un mes. Algo que destacar es que, la solubilidad del NFD en agua es de 0.0059 mg/mL<sup>63</sup> y la formulación de F30-30 mg NFD, permite una dispersión de alrededor de 0.47 mg/mL, lo cual es un incremento de más de 700 veces. En términos de DL, no hay diferencia estadísticamente significativa. La cantidad promedio es de 8.2% entre todas las formulaciones y la formulación de mayor desviación estándar es F20-45 mg NFD y F20-60 mg NFD, las cuales también durante los experimentos fueron las menos estables.



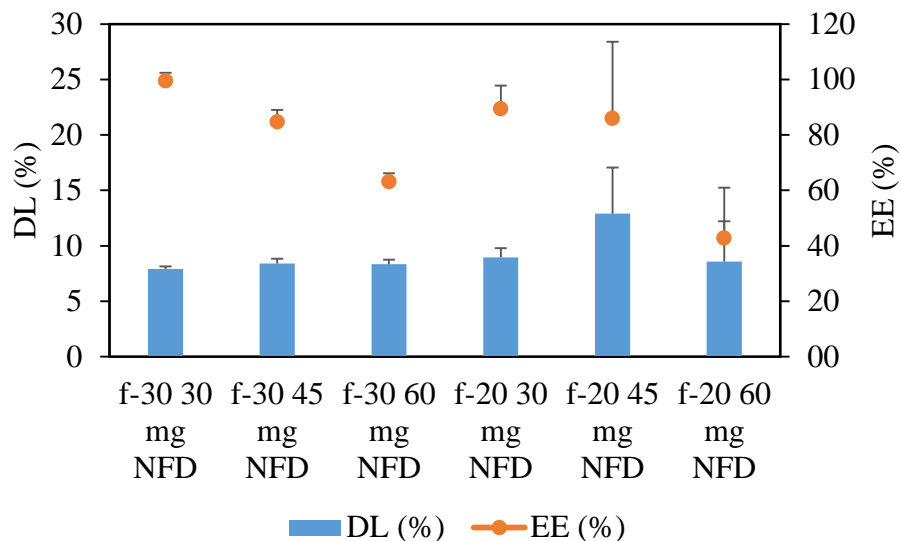


Figura 11. Eficiencia de encapsulación y Cargada de fármaco para ambas formulaciones con diferentes cargas de NFD.

El estudio de liberación fue realizado en las formulaciones con mayor EE, y los resultados se pueden observar en la Figura 12. La principal diferencia es que la desviación estándar para F30, muestra una mayor variación entre el triplicado, pero ambas formulaciones liberan sobre un 25% en 4 días. Los perfiles de liberación no son estadísticamente diferentes y luego de 24 horas, la liberación parece alcanzar un equilibrio alrededor del 30%. Este perfil de liberación tiene un comportamiento de liberación prolongada, ya que hay una baja cantidad de fármaco liberado y no hay diferencia entre las 24 y 96 horas del fármaco liberado. Este bajo índice de liberación, puede ser una ventaja, por ejemplo, para liberación intracelular. Para nanopartículas, se han descrito varias rutas intracelulares<sup>64-66</sup>. Además, el uso de PEG le puede dar la capacidad de invisibilización a los nanosistemas, que prolonga su tiempo en el torrente sanguíneo. Incluso, con este bajo perfil de liberación, las LCM podrían ser un buen candidato para entrega dirigida (*targeting* en inglés)<sup>67</sup>. Ha sido ampliamente descrito que la funcionalización de PEG con un ligando puede dar la capacidad de *targeting* a los nanosistemas. En micelas poliméricas los ligandos de biotina y folato son un ejemplo de *targeting* para cáncer<sup>68-70</sup>.

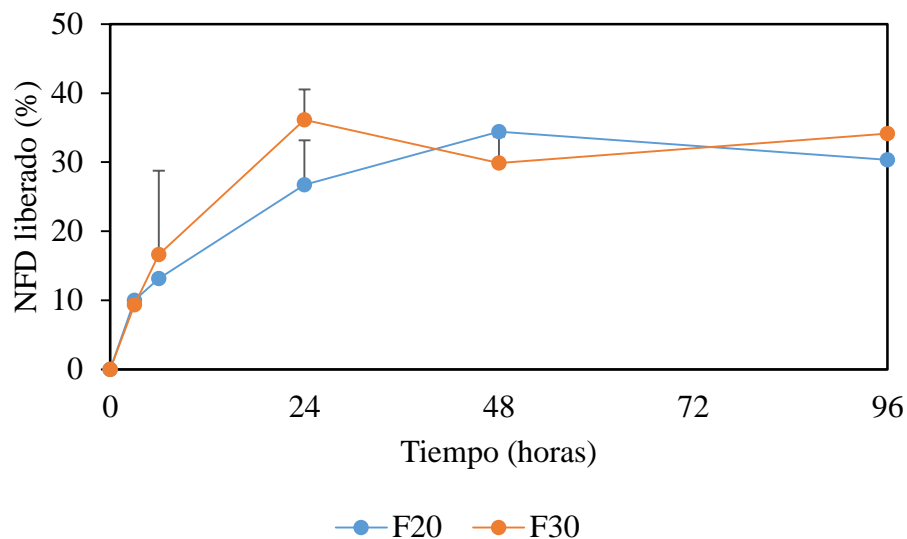


Figure 12. NFD liberado de ambas formulaciones en buffer fosfato pH 7.2.

Otro aspecto importante de las LCM fue su estabilidad. Las LCM cargadas son más estables, a pesar de que desde la primera o segunda semana el exceso de NFD comienza a cristalizar en el fondo del contenedor de la suspensión. Las tintas son más estables a temperatura ambiente y generalmente los resultados más estables no duran más de dos semanas. Pasadas las dos semanas hay un marcado incremento en el tamaño sobre 50 nm en casi todas las formulaciones (Anexo I). Aun así, los tamaños son menores a 150 nm en promedio, por lo que, aún pueden ser usadas las LCM almacenadas a temperatura ambiente. El potencial zeta no es mayor a 10 mV en magnitud, y tiende a acercarse a 0 con el tiempo. En cuanto al PDI, desde la segunda semana hay un incremento, lo que se debe a la aparición de una al menos una segunda población de mayor tamaño, por el crecimiento y agregación de las partículas. Esto ocurre entre la primera y segunda semana a temperatura ambiente de forma rápida, pero este proceso en las LCM refrigeradas, tiende a ser constante en el tiempo, lo cual indica un crecimiento de partículas más regular y continuo, que a temperatura ambiente (tabla 5).

Tabla 5. Estudio de estabilidad de las formulaciones F30 y F20 con 30, 45 y 60 mg de NFD en semanas 0 y 1.

Formulación	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	Tamaño/nm	PDI	ZP /mV
<b>F30</b>	0	25	13.1 (1.4)	0.184 (0.136)	-11.2 (1.7)
<b>F30</b>	1	25	26.4 (7.4)	0.491 (0.029)	-1.5 (0.3)
<b>F30</b>	1	4	27.5 (1.9)	0.465 (0.036)	-2.5 (0.1)
<b>F30 NFD 30</b>	0	25	12.6 (0.8)	0.350 (0.037)	-7.8 (4.6)
<b>F30 NFD 30</b>	1	25	34.4 (21.0)	0.366 (0.053)	-3.7 (0.2)
<b>F30 NFD 30</b>	1	4	29.0 (14.2)	0.460 (0.044)	-3.2 (0.2)
<b>F30 NFD 45</b>	0	25	9.6 (1.4)	0.278 (0.010)	-9.8 (0.5)
<b>F30 NFD 45</b>	1	25	21.4 (1.8)	0.398 (0.034)	-2.1 (0.1)
<b>F30 NFD 45</b>	1	4	22.6 (3.0)	0.361 (0.075)	-2.9 (0.3)
<b>F30 NFD 60</b>	0	25	13.6 (0.4)	0.306 (0.043)	-4.7 (1.8)
<b>F30 NFD 60</b>	1	25	18.7 (3.0)	0.426 (0.126)	-3.4 (0.4)
<b>F30 NFD 60</b>	1	4	27.1 (3.7)	0.477 (0.174)	-3.3 (0.6)
<b>F20</b>	0	25	12.0 (5.6)	0.266 (0.021)	-6.2 (3.0)
<b>F20</b>	1	25	22.4 (1.8)	0.351 (0.035)	-2.2 (0.1)
<b>F20</b>	1	4	24.3 (1.2)	0.424 (0.061)	-3.0 (0.1)
<b>F20 NFD 30</b>	0	25	13.8 (0.3)	0.361 (0.019)	-5.0 (3.7)
<b>F20 NFD 30</b>	1	25	22.4 (2.9)	0.438 (0.052)	-3.3 (0.3)
<b>F20 NFD 30</b>	1	4	26.6 (3.1)	0.461 (0.043)	-3.4 (0.1)
<b>F20 NFD 45</b>	0	25	12.7 (0.9)	0.147 (0.010)	-19.2 (1.3)
<b>F20 NFD 45</b>	1	25	22.2 (0.7)	0.421 (0.030)	-1.3 (0.5)
<b>F20 NFD 45</b>	1	4	28.5 (5.2)	0.358 (0.077)	-2.5 (0.5)
<b>F20 NFD 60</b>	0	25	10.9 (0.2)	0.322 (0.035)	-7.7 (1.2)
<b>F20 NFD 60</b>	1	25	35.5 (16.4)	0.565 (0.280)	-5.3 (1.1)
<b>F20 NFD 60</b>	1	4	70.9 (46.5)	0.914 (0.115)	-5.4 (0.7)

### Nanoemulsiones

Los criterios de EE y DL en la NE son el claro ejemplo de la complementariedad a la hora de analizar y determinar los sistemas óptimos para seguir avanzando en el estudio. En términos de eficiencia de encapsulación, la formulación F4, es superior con respecto a las formulaciones F3 con las mismas cantidades de fármaco cargadas. Si bien la EE es mayor en la formulación F4-10 mg, la cantidad encapsulada en la formulación F4-25 mg, es prácticamente la misma (6.8 mg). Con respecto a la DL, es similar en todas las formulaciones, exceptuando a F3-25 mg, que, si bien tiene una desviación estándar mayor que el resto de las formulaciones, esta sigue siendo mayor. Formulaciones descritas recientemente

cargadas con este tipo de fármaco han presentado DL de 2 a 5% <sup>19,71</sup>, y otras un poco superiores al 12-15% <sup>72</sup>, resultados similares a los obtenidos. Por lo tanto, las dos formulaciones que se analizaron en los siguientes estudios fueron las formulaciones F4-25 mg y F3-25 mg, ya que son, las formulaciones cargada con la mayor cantidad de NFD y la formulación con mayor cantidad de fármaco cargado por cantidad de fase oleosa (Figura 13).

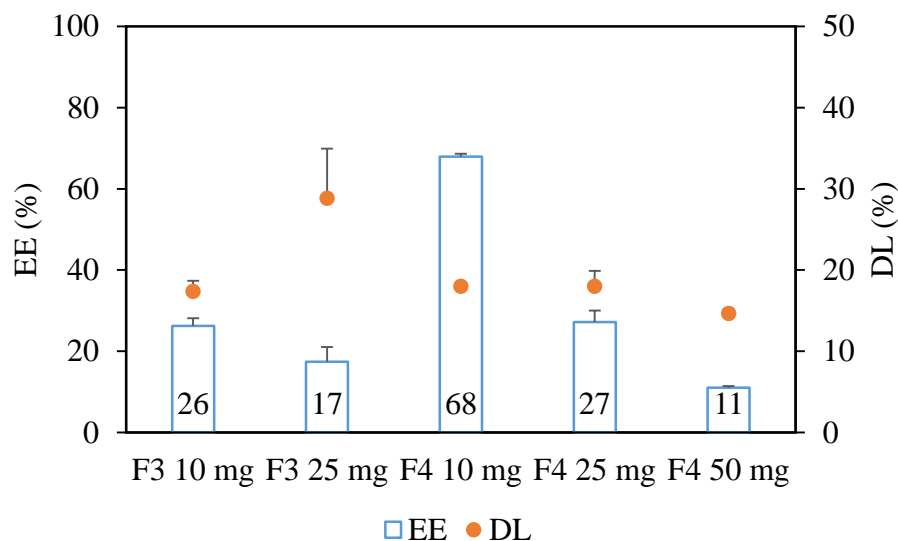


Figura 13. Eficiencia de encapsulación y la carga de fármaco de NE.

Al estudiar los perfiles de liberación de NFD de estas formulaciones (Figura 14) ambas son similares y ninguna sobrepasa el 20% de fármaco liberado a las 144 horas. Este perfil alcanza un estado estacionario alrededor de las 6 horas y mantiene su concentración hasta al menos las 144 horas. Perfiles de liberación más rápidos han sido descritos, donde a tiempos de 3 o menos horas, ya se ha liberado más del 60% del fármaco <sup>61,72</sup> y perfiles un poco más lentos en donde en 12 horas alcanza el 80% de liberación. Por lo que, al igual que las LCM, este nanosistema podría ser formulado para una liberación prolongada.

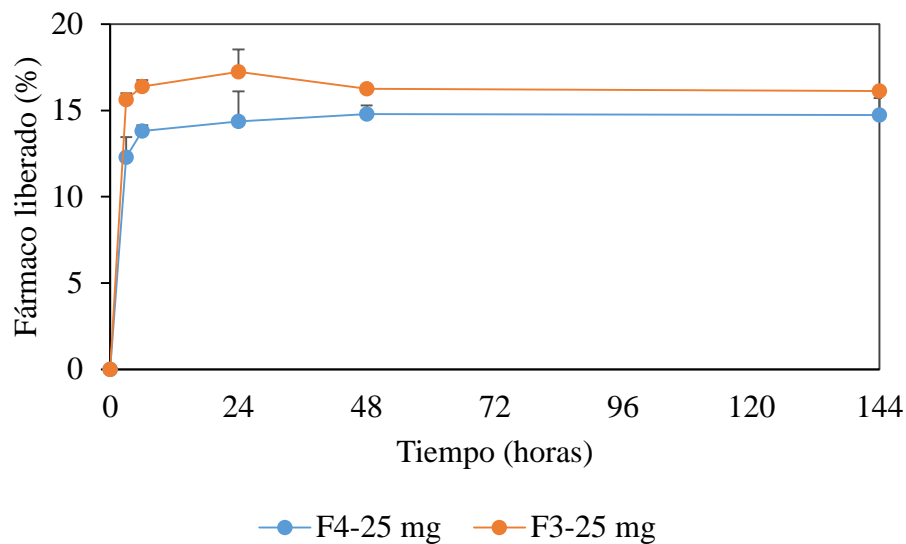


Figura 14. NFD liberado de ambas formulaciones en buffer fosfato pH 7.2.

En cuanto a la estabilidad de las tintas de NEs, en términos de tamaño las formulaciones sin fármaco, no cambian demasiado el tamaño promedio en general, pero si cambia su desviación estándar, aumentando mayormente a temperatura ambiente. Las formulaciones cargadas de con NFD, los tamaños son menores que el de las formulaciones blanco al inicio del estudio y en ambas condiciones hay un aumento de tamaño, pero no hay una tendencia clara en este aumento, más que en F4 aumenta tanto el tamaño como su desviación estándar. Con respecto al PDI, la única tendencia en la mayoría de los casos es que luego de 4 semanas el valor es menor a temperatura ambiente y ninguna de las formulaciones sobrepasa el valor de 0.400. El potencial zeta en las formulaciones blanco, disminuye en magnitud a temperatura ambiente, pero al agregar NFD a las NEs, en las dos condiciones de almacenamiento aumenta el tamaño, no así el potencial zeta, que disminuye drásticamente su magnitud (Tabla 6) (anexo 2).

Tabla 6. Estudio de estabilidad de las formulaciones F3 con 0, 10 y 29 mg de NF y F4 con 0, 10, 25, 35 y 50 mg de NFD en semanas 0 y 4.

Formulación	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	Tamaño/nm	PDI	ZP /mV
<b>F3</b>	0	25	132.6 (19.2)	0.198 (0.017)	-55.7 (4.1)
<b>F3</b>	4	25	134.8 (78.5)	0.169 (0.061)	-23.1 (3.2)
<b>F3</b>	4	4	115.5 (23.8)	0.228 (0.023)	-31.0 (2.7)
<b>F3 NFD 10</b>	0	25	63.0 (24.3)	0.204 (0.015)	-78.1 (4.0)
<b>F3 NFD 10</b>	4	25	130.4 (7.5)	0.228 (0.004)	-31.9 (3.5)
<b>F3 NFD 10</b>	4	4	186.1 (16.2)	0.160 (0.013)	-22.8 (1.1)
<b>F3 NFD 25</b>	0	25	41.1 (21.6)	0.245 (0.006)	-52.3 (1.8)
<b>F3 NFD 25</b>	4	25	100.1 (42.7)	0.184 (0.017)	-35.8 (0.6)
<b>F3 NFD 25</b>	4	4	146.4 (8.3)	0.221 (0.037)	-29.1 (1.8)
<b>F4</b>	0	25	56.4 (2.0)	0.313 (0.028)	-61.5 (3.5)
<b>F4</b>	4	25	90.7 (32.4)	0.311 (0.008)	-14.1 (0.9)
<b>F4</b>	4	4	59.4 (15.0)	0.345 (0.041)	-65.0 (1.8)
<b>F4 NFD 10</b>	0	25	42.0 (3.6)	0.361 (0.030)	-72.6 (5.6)
<b>F4 NFD 10</b>	4	25	92.4 (72.5)	0.295 (0.023)	-25.7 (4.3)
<b>F4 NFD 10</b>	4	4	64.9 (24.7)	0.360 (0.014)	-26.3 (2.3)
<b>F4 NFD 25</b>	0	25	42.0 (15.8)	0.393 (0.020)	-74.2 (6.3)
<b>F4 NFD 25</b>	4	25	66.5 (43.6)	0.269 (0.042)	-19.5 (1.5)
<b>F4 NFD 25</b>	4	4	91.4 (48.3)	0.350 (0.137)	-19.5 (1.9)
<b>F4 NFD 50</b>	0	25	40.0 (9.2)	0.370 (0.018)	-77.3 (2.4)
<b>F4 NFD 50</b>	4	25	80.6 (54.3)	0.257 (0.021)	-17.6 (0.2)
<b>F4 NFD 50</b>	4	4	67.3 (44.5)	0.303 (0.058)	-22.2 (1.7)

## Resultados de impresión de las tintas

### Micelas

Las tintas de LCM fueron impresas en láminas de tereftalato de polietileno. El proceso de impresión mantuvo los rangos de tamaño previos a la impresión, pero generó una segunda población sobre los 200 nm en ambos casos POI. Esto pudo ser producto de la agregación de las LCM, lo que concuerda con el aumento en el PDI de las formulaciones después de la impresión. Aun así, la población principal fue la de alrededor de 12 nm, como se puede observar en la Figura 15.

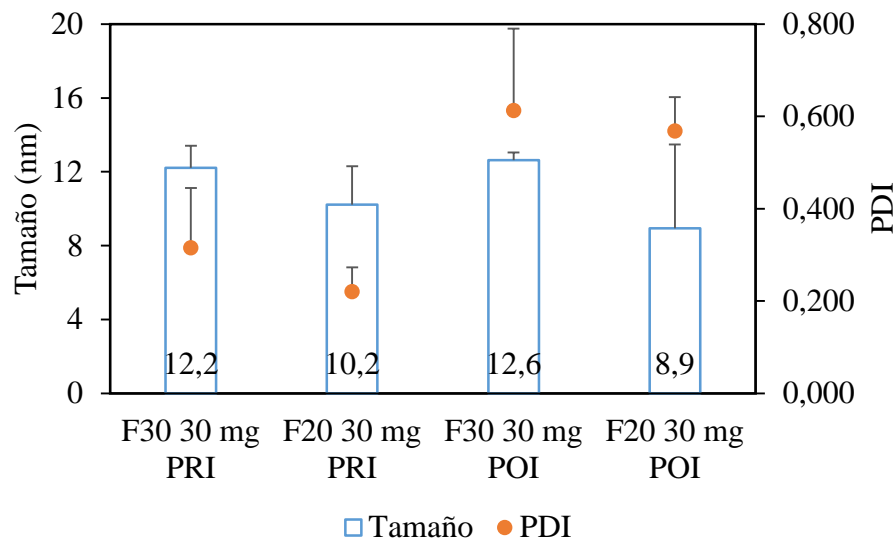


Figura 15. Gráfico de LCM F20 y F30 con 30 mg de NFD pre impresión (PRI) y POI en términos de tamaño y PDI.

En términos de potencial zeta, hay un incremento en la magnitud POI (Figura 16), pero esto se debe a que el equipo reporta un valor que es un promedio de varios picos en el gráfico de potencial zeta reportado por el Zetasizer. En las formulaciones no hay ningún excipiente que otorgue una carga la LCM, por lo que no se puede concluir nada del potencial zeta.

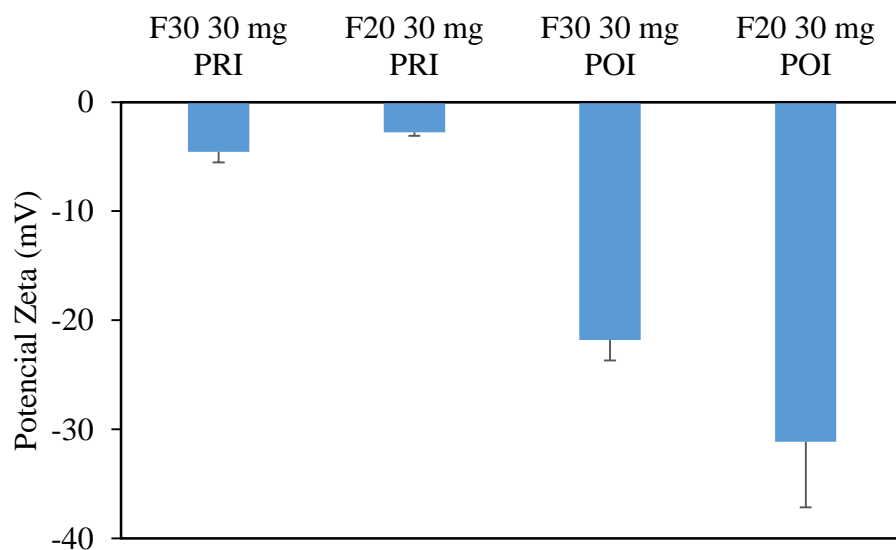


Figura 16. Gráfico de LCM F20 y F30 con 30 mg de NFD POI en términos de potencial zeta

En cuanto a la EI los valores son bastante bajos (Tabla 7), siendo que existe una alta eficiencia de encapsulación en las LCM. Esto puede ocurrir por muchos factores, tanto por que las LCM no sean capaces del todo de proteger al principio activo del proceso de impresión, como que sean incapaces de protegerlas de la luz. En este último escenario el problema es que, al arrastrar la muestra para cuantificar, se expone a la luz en una capa fina y de un área de 49 cm<sup>2</sup>. Esto puede tener relación con que los valores de la cuantificación del NFD van decreciendo entre la primera muestra arrastrada y la última. Este efecto no es tan notorio en este sistema, ya que el decaimiento principal parece estar en el proceso de impresión. F30 tiene mayor cantidad de gelucire, y esto concuerda con que haya una mayor cantidad de NFD en esta formulación.

Tabla 7. Eficiencia de impresión de LCM y la cantidad de NFD.

<b>Formulación</b>	<b>EI/%</b>	<b>NFD (mg)</b>
<b>LCM F30-30</b>	13.5 (3.2)	4.04 (0.97)
<b>LCM F20-30</b>	6.9 (0.8)	2.08 (0.23)

### **Nanoemulsión**

Las formulaciones de NE fueron caracterizadas al igual que las LCM, PRI y POI. En cuanto al proceso de impresión, este no afecta el tamaño promedio ni el PDI (Figura 17), ya que se mantienen las tendencias ya discutidas de las dos formulaciones. Luego de la impresión no hay ninguna diferencia estadísticamente significativa. En cuanto al potencial zeta, la única diferencia está en la formulación F3 25 mg, y aunque también aumenta el valor de la desviación estándar, aun así, esta diferencia si es significativa. Una explicación para esto es que podría existir un reordenamiento de los excipientes de la NE, exponiendo a la lecitina más hacia la superficie, ocurriendo así un aumento de potencial en magnitud (Figura 18).



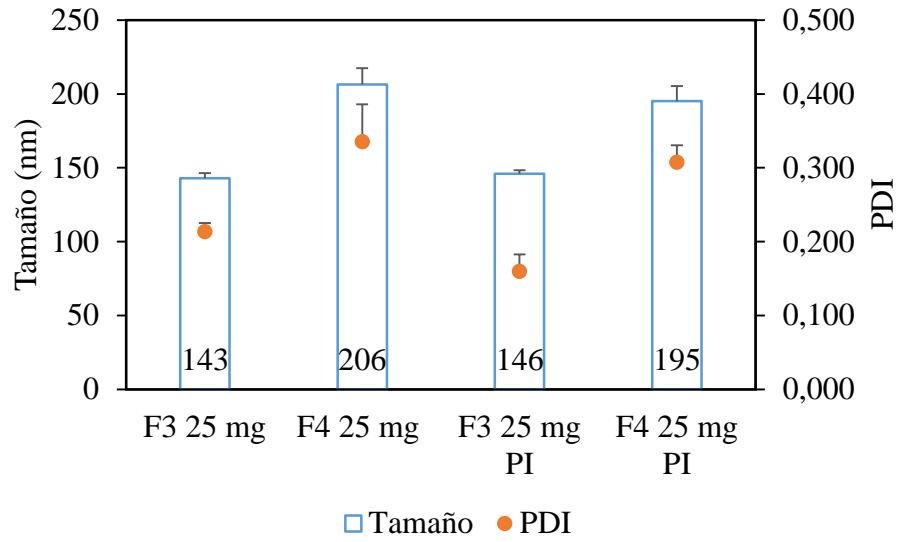


Figura 17. Gráfico de NE F4-25 mg NFD y F3-10 mg NFD POI en términos de tamaño y PDI.

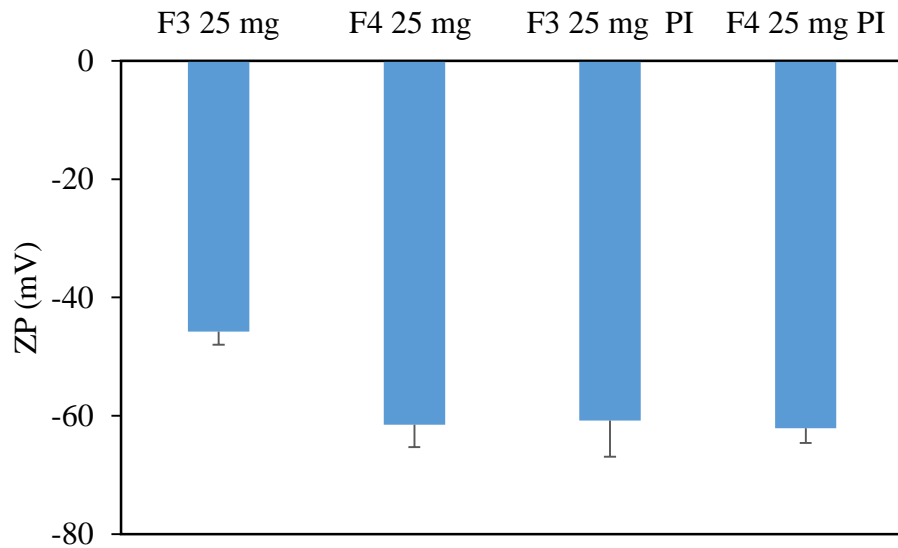


Figura 18. Gráfico de NE F4-25 mg NFD y F3-10 mg NFD POI en términos de potencial zeta.

La NE no cambiar en el proceso de impresión en los parámetros ya discutidos, y la misma tendencia se ve en la EI (Tabla 8). La formulación F4 al tener mayor cantidad de fase oleosa, también tuvo una mayor capacidad de encapsular NFD, como ya se vio en el objetivo anterior, por consiguiente, imprimir una mayor cantidad de NFD. Al igual que en las LCM, se vio el efecto de decaimiento del valor de

absorbancia en la cuantificación y en este caso al existir una EE baja, una disminución absorción al cuantificar tiene una mayor repercusión en la EI. Al parecer la NE si es capaz de proteger al NFD del proceso de impresión, pero al exponerlo a la luz POI, hay un porcentaje de degradación de NFD.

Tabla 8. Eficiencia de impresión de NE y la cantidad de NFD.

<b>Formulación</b>	<b>EI/%</b>	<b>NFD (mg)</b>
<b>NE F4-25 mg</b>	73.6 (19.5)	5.00 (1.33)
<b>NE F3-25 mg</b>	87.3 (26.4)	3.75 (1.14)

## DISCUSIÓN

Dentro de los tres sistemas desarrollados, los dos que pudieron ser utilizados para imprimir fueron las NE y las LCM. Los NC no se lograron desarrollar con las condiciones adecuadas para la impresión. Una solución para esto, es que una vez realizado el paso por alta cizalla, en vez de filtrar, la suspensión se pasa por un homogeneizador de alta presión, como esta descrito en la literatura por algunos autores <sup>50</sup> y así lograr NC con características de tamaño y PDI adecuados.

Las LCM tuvieron tamaños inferiores a 20 nm, PDI menor a 0.400 y fueron monomodales en cuanto a población, al no presentar agregados. Adicionalmente, fueron estables en tiempos menores a una semana por lo que fueron evaluados en el sistema de impresión. Las NE presentaron tamaños menores a 250 nm, de PDI menores a 0.400 y potencial zeta de -20 mV, y también estables en tiempos menores a una semana por lo que también fueron aptas para seguir con los experimentos.

Con respecto a la elaboración y caracterización de las tintas, y en particular en la tinta de LCM, al tener un volumen final de 60 mL de fabricación, la suspensión se podría rotaevaporar para concentrarla y así tener una mayor concentración de fármaco en la tinta. Para esto habría que considerar el efecto que tendría en la estabilidad de las LCM al concentrarlas, ya que al no tener un potencial zeta lo suficientemente fuerte para evitar la agregación de las LCM, esto podría ser una limitante. Otro punto a mejorar es su estabilidad, ya que después de 1 o 2 semanas comienza el proceso de agregación y crecimiento de las LCM, por lo que se podría modificar algún surfactante de la formulación para que la LCM tenga un potencial zeta suficiente como para aumentar su estabilidad. Aun así, las LCM presentan buenas EE de NFD y un perfil de liberación prolongado, lo que las hace un buen candidato para la impresión.

Las NEs, tienen una estabilidad de 4 al menos 4 semanas, tanto en refrigeración como a temperatura ambiente. Tuvieron un perfil de liberación prolongado que no libera más de una 20% en 144 horas. Un

aspecto a mejorar es la EE, lo que podría ser abordado por un análisis sistemático de la influencia de las variables de fabricación y formulación. Aún dadas sus limitantes, las NE son un buen candidato para impresión.

Finalmente, la impresión, tiene un efecto sobre el fármaco, al observarse un decrecimiento en la EI cuando se imprimen las tintas o se cuantifica lo impreso. Las LCM no son capaces de proteger el fármaco totalmente del proceso de impresión, lo que corresponde a la baja en la EI. Para dar una solución a este problema, hace falta dilucidar qué aspecto del proceso de impresión es el que afecta al fármaco y a las LCM. Otro aspecto a considerar en la impresión es el método de recolección de la muestra para su posterior cuantificación. Este puede que tenga un efecto sobre las suspensiones y el NFD al exponerlo a la luz. El problema podría estar en la utilización del solvente para recolectar lo impreso. En el caso de la NE, el solvente disuelve a los componentes de la formulación quedando el NFD libre de la NE. Puede que esta exposición a la luz produzca una degradación del fármaco. En cuanto a la EI, si bien los valores de EI de NE son mayores a los de LCM, su EE es menor, por lo que los valores finales de cantidad impresa están dentro de los mismos rangos (tabla 9). La NE parece tener un efecto protector al proceso de impresión que las LCM no son capaces de proporcionar, pero que compensan con una alta EE.

Tabla 9. EI y cantidad impresa de NFD para NE y LCM.

<b>Formulación</b>	<b>EI/%</b>	<b>NFD (mg)</b>
<b>NE F4-25 mg</b>	73.6 (19.5)	5.00 (1.33)
<b>LCM F30-30</b>	13.5 (3.2)	4.04 (0.97)
<b>NE F3-25 mg</b>	87.3 (26.4)	3.75 (1.14)
<b>LCM F20-30</b>	6.9 (0.8)	2.08 (0.23)

## CONCLUSIÓN

Concluyendo, los nanosistemas desarrollados tienen el potencial para encapsular fármacos de baja solubilidad en agua (clase II y IV del BCS), como lo es el NFD. Si bien los NC no se pueden imprimir eficientemente, sí pueden ser utilizados como base para una formulación sumado a otro proceso de homogeneización. Las LCM fueron un nanosistema adecuado para adaptar a tintas de impresión. Se observaron tamaños alrededor de 20 nm, confirmados por microscopía electrónica. Las NE, resultaron tener tamaños mayores, entre de 150 y 250 nm y un potencial zeta negativo, pero también se lograron desarrollar las tintas.

Durante el desarrollo de las tintas de NE y LCM se pudo observar que las LCM no tienen una estabilidad mayor a 1 semana, por lo que sería un aspecto a mejorar en las LCM. La NE tiene una mejor estabilidad, pero EE de encapsulación menores a las LCM. Los perfiles de liberación de ambos nanosistemas son similares liberando de forma prolongada en tiempos mayores a 72 horas. Se observó que las LCM no liberaron menos de un 40% y las NE liberaron menos de un 20%. Las LCM tienen una velocidad menor para alcanzar este porcentaje, a diferencia de las NE que son más rápidas y ya a las 6 horas logran llegar a ese porcentaje.

Para finalizar, ambos nanosistemas fueron impresos satisfactoriamente. Si bien, bajó notoriamente la cantidad de fármaco impreso con respecto a la EE en el caso de las LCM, se logró aumentar la cantidad de fármaco más de 10 veces con respecto a su solubilidad en agua. Con respecto a las NE también disminuyó la cantidad de NFD impresa POI, pero en menor grado que las LCM, y aun así se logró aumentar más de 160 veces la cantidad de NFD comparándola con su solubilidad en agua.

Los mejores sistemas fueron la NE F4 con 25 mg de NFD y las LCM F30 con 30 mg de NFD, que aunque los resultados pueden ser aún mejorados, se demostró que la impresión de este tipo de nanosistemas es viable. Este logro nos ayuda a avanzar hacia la medicina personalizada, ya que permite imprimir una dosis unitaria dependiendo del área y densidad de impresión, pudiendo lograrse la dosis necesaria para cada paciente incluso con fármacos clase II y IV.

## REFERENCIAS

1. L. Amidon, G., HL, L., P. Shah, V. & Crison, J. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. **12**, (1995).
2. Formulating Poorly Water Soluble Drugs. **3**, (Springer New York, 2012).
3. Cid Cárcamo, E. Control de calidad biofarmacéutico de medicamentos. Repos. Académico - Univ. Chile (1992).
4. Shojaei, A. H. & others. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review. *J Pharm Pharm Sci* **1**, 15–30 (1998).
5. Simmons, J. H. et al. Reliability of the Diabetes Fear of Injecting and Self-Testing Questionnaire in Pediatric Patients With Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* **30**, 987–988 (2007).
6. Silva, B. M. A., Borges, A. F., Silva, C., Coelho, J. F. J. & Simões, S. Mucoadhesive oral films: The potential for unmet needs. *Int. J. Pharm.* **494**, 537–551 (2015).
7. Abruzzo, A. et al. Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydr. Polym.* **87**, 581–588 (2012).
8. Lam, J. K. W., Xu, Y., Worsley, A. & Wong, I. C. K. Oral transmucosal drug delivery for pediatric use. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **73**, 50–62 (2014).
9. Şenel, S., Rathbone, M. J., Cansız, M. & Pather, I. Recent developments in buccal and sublingual delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* **9**, 615–628 (2012).
10. Peh, K. K. & Wong, C. F. Polymeric films as vehicle for buccal delivery: swelling, mechanical, and bioadhesive properties. *J Pharm Pharm Sci* **2**, 53–61 (1999).
11. Perioli, L. et al. Development of mucoadhesive patches for buccal administration of ibuprofen. *J. Controlled Release* **99**, 73–82 (2004).

12. Montenegro-Nicolini, M. & Morales, J. O. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech* (2016). doi:10.1208/s12249-016-0525-z
13. Morales, J. O. & McConville, J. T. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **77**, 187–199 (2011).
14. Daly, R., Harrington, T. S., Martin, G. D. & Hutchings, I. M. Inkjet printing for pharmaceuticals – A review of research and manufacturing. *Int. J. Pharm.* **494**, 554–567 (2015).
15. Dinh, H. T. T., Tran, P. H. L., Duan, W., Lee, B.-J. & Tran, T. T. D. Nano-sized solid dispersions based on hydrophobic-hydrophilic conjugates for dissolution enhancement of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **533**, 93–98 (2017).
16. Wais, U., Jackson, A. W., He, T. & Zhang, H. Formation of hydrophobic drug nanoparticles via ambient solvent evaporation facilitated by branched diblock copolymers. *Int. J. Pharm.* **533**, 245–253 (2017).
17. Al-Kassas, R., Bansal, M. & Shaw, J. Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs. *J. Controlled Release* **260**, 202–212 (2017).
18. Colombo, M., Orthmann, S., Bellini, M., Staufenbiel, S. & Bodmeier, R. Influence of Drug Brittleness, Nanomilling Time, and Freeze-Drying on the Crystallinity of Poorly Water-Soluble Drugs and Its Implications for Solubility Enhancement. *AAPS PharmSciTech* **18**, 2437–2445 (2017).
19. Tran, L. T. C., Gueutin, C., Frebourg, G., Burucoa, C. & Faivre, V. Erythromycin encapsulation in nanoemulsion-based delivery systems for treatment of *Helicobacter pylori* infection: Protection and synergy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**, 146–151 (2017).
20. Kumar, R., Singh, A., Garg, N. & Siril, P. F. Solid lipid nanoparticles for the controlled delivery of poorly water soluble non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ultrason. Sonochem.* **40**, 686–696 (2018).

21. Kar, N., Chakraborty, S., De, A. K., Ghosh, S. & Bera, T. Development and evaluation of a cedrol-loaded nanostructured lipid carrier system for in vitro and in vivo susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes. *Eur. J. Pharm. Sci.* **104**, 196–211 (2017).
22. Martins, S., Sarmento, B., Ferreira, D. C. & Souto, E. B. Lipid-based colloidal carriers for peptide and protein delivery-liposomes versus lipid nanoparticles. *Int. J. Nanomedicine* **2**, 595 (2007).
23. Azeem, A. et al. Nanoemulsion Components Screening and Selection: a Technical Note. *AAPS PharmSciTech* **10**, 69–76 (2009).
24. Shafiq, S. et al. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **66**, 227–243 (2007).
25. Mei, Z., Chen, H., Weng, T., Yang, Y. & Yang, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**, 189–196 (2003).
26. Wang, L., Li, X., Zhang, G., Dong, J. & Eastoe, J. Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J. Colloid Interface Sci.* **314**, 230–235 (2007).
27. Rajpoot, P., Pathak, K. & Bali, V. Therapeutic Applications of Nanoemulsion Based Drug Delivery Systems: A Review of Patents in Last Two Decades. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* **5**, 163–172 (2011).
28. Ali, A., Ansari, V., Ahmad, U., Akhtar, J. & Jahan, A. Nanoemulsion: An Advanced Vehicle For Efficient Drug Delivery. *Drug Res.* **67**, 617–631 (2017).
29. Solè, I. et al. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **288**, 138–143 (2006).
30. Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. & Garcíacelma, M. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **10**, 102–110 (2005).
31. Fessi, C., Devissaguet, J.-P., Puisieux, F. & Thies, C. Process for the preparation of dispersible colloidal systems of a substance in the form of nanoparticles. (1992).
32. Torchilin, V. P. Lipid-core micelles for targeted drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* **2**, 319–327 (2005).

33. Gao, Z., Lukyanov, A. N., Singhal, A. & Torchilin, V. P. Diacyllipid-Polymer Micelles as Nanocarriers for Poorly Soluble Anticancer Drugs. *Nano Lett.* **2**, 979–982 (2002).
34. Mu, L., Chrastina, A., Levchenko, T. & Torchilin, V. P. Micelles from Poly(ethylene glycol)–Phosphatidyl Ethanolamine Conjugates (Peg-Pe) as Pharmaceutical Nanocarriers for Poorly Soluble Drug Camptothecin. *J. Biomed. Nanotechnol.* **1**, 190–195 (2005).
35. Wang, J., Mongayt, D. A., Lukyanov, A. N., Levchenko, T. S. & Torchilin, V. P. Preparation and in vitro synergistic anticancer effect of Vitamin K3 and 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ene in poly(ethylene glycol)-diacyllipid micelles. *Int. J. Pharm.* **272**, 129–135 (2004).
36. Čerpnjak, K., Zvonar, A., Vrečer, F. & Gašperlin, M. Development of a solid self-microemulsifying drug delivery system (SMEDDS) for solubility enhancement of naproxen. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **41**, 1548–1557 (2015).
37. Hosny, K. M. & Aljaeid, B. M. Sildenafil citrate as oral solid lipid nanoparticles: a novel formula with higher bioavailability and sustained action for treatment of erectile dysfunction. *Expert Opin. Drug Deliv.* **11**, 1015–1022 (2014).
38. Friedrich, I. & Müller-Goymann, C. . Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **56**, 111–119 (2003).
39. Kocbek, P., Baumgartner, S. & Kristl, J. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* **312**, 179–186 (2006).
40. Vivek, K., Reddy, H. & Murthy, R. S. 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**, 16–24 (2007).
41. Harivardhan Reddy, L., Vivek, K., Bakshi, N. & Murthy, R. S. R. Tamoxifen Citrate Loaded Solid Lipid Nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>): Preparation, Characterization, In Vitro Drug Release, and Pharmacokinetic Evaluation. *Pharm. Dev. Technol.* **11**, 167–177 (2006).



42. Jacobs, C., Kayser, O. & Müller, R. H. Nanosuspensions as a new approach for the formulation for the poorly soluble drug tarazepide. *Int. J. Pharm.* **196**, 161–164 (2000).
43. Rabinow, B. E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 785–796 (2004).
44. Kumar, A., Verma, R., Purohit, S. & Bhandhari, A. Innovation of Cyclodextrin In Noval Drug Delivery System. *J Nat. Conscientia* **2**, 293–305 (2011).
45. Szente, L. & Szejtli, J. Highly soluble cyclodextrin derivatives: chemistry, properties, and trends in development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **36**, 17–28 (1999).
46. Müller, R. H., Gohla, S. & Keck, C. M. State of the art of nanocrystals – Special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **78**, 1–9 (2011).
47. Auweter, H. et al. Precipitated water-insoluble colorants in colloid disperse form. (2002).
48. Liversidge, G. G. & Cundy, K. C. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *Int. J. Pharm.* **125**, 91–97 (1995).
49. Keck, C. & Muller, R. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **62**, 3–16 (2006).
50. Kipp, J. E., Wong, J. C. T., Doty, M. J. & Rebbeck, C. L. Microprecipitation method for preparing submicron suspensions. (2005).
51. Li, J., Fu, Q., Liu, X., Li, M. & Wang, Y. Formulation of nimodipine nanocrystals for oral administration. *Arch. Pharm. Res.* **39**, 202–212 (2016).
52. Montenegro-Nicolini, M., Miranda, V. & Morales, J. O. Inkjet Printing of Proteins: an Experimental Approach. *AAPS J.* **19**, 234–243 (2017).
53. Kesisoglou, F., Panmai, S. & Wu, Y. Nanosizing — Oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 631–644 (2007).
54. Kalhapure, R. S. et al. pH-responsive chitosan nanoparticles from a novel twin-chain anionic amphiphile for controlled and targeted delivery of vancomycin. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **158**, 650–657 (2017).

55. Lukyanov, A. N., Gao, Z., Mazzola, L. & Torchilin, V. P. Polyethylene Glycol-Diacyllipid Micelles Demonstrate Increased Accumulation in Subcutaneous Tumors in Mice. *Pharm. Res.* **19**, 1424–1429 (2002).
56. Mandawgade, S. D., Sharma, S., Pathak, S. & Patravale, V. B. Development of SMEDDS using natural lipophile: Application to  $\beta$ -Artemether delivery. *Int. J. Pharm.* **362**, 179–183 (2008).
57. Sawant, R. R. & Torchilin, V. P. Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. *Mol. Membr. Biol.* **27**, 232–246 (2010).
58. Behbahani, E. S., Ghaedi, M., Abbaspour, M. & Rostamizadeh, K. Optimization and characterization of ultrasound assisted preparation of curcumin-loaded solid lipid nanoparticles: Application of central composite design, thermal analysis and X-ray diffraction techniques. *Ultrason. Sonochem.* **38**, 271–280 (2017).
59. Gumedde, T. P. et al. Plasticization and cocrystallization in LLDPE/wax blends. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **54**, 1469–1482 (2016).
60. Campos, V. E. B. D. et al. Development and In Vitro Assessment of Nanoemulsion for Delivery of Ketoconazole Against *Candida albicans*. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **17**, 4623–4630 (2017).
61. Natesan, S. et al. Chitosan stabilized camptothecin nanoemulsions: Development, evaluation and biodistribution in preclinical breast cancer animal mode. *Int. J. Biol. Macromol.* **104**, 1846–1852 (2017).
62. Ige, P. P., Bachhav, N. A., Mahajan, H. S. & Gattani, P. P. N. and S. G. Atorvastatin-Loaded Oleic Acid Nanoglobules for Oral Administration: In Vitro Characterization and Biopharmaceutical Evaluation. *Current Nanoscience* (2013). Available at: <http://www.eurekaselect.com/109004/article>. (Accessed: 10th November 2017)
63. Ran, Y., He, Y., Yang, G., Johnson, J. L. & Yalkowsky, S. H. Estimation of aqueous solubility of organic compounds by using the general solubility equation. *Chemosphere* **48**, 487–509 (2002).
64. Weissleder, R., Cheng, H.-C., Bogdanova, A. & Bogdanov, A. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J. Magn. Reson. Imaging* **7**, 258–263 (1997).

65. Moore, A., Basilion, J. P., Chiocca, E. A. & Weissleder, R. Measuring transferrin receptor gene expression by NMR imaging. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* **1402**, 239–249 (1998).
66. Schoepf, U., Marecos, E. M., Melder, R. J., Jain, R. K. & Weissleder, R. Intracellular magnetic labeling of lymphocytes for in vivo trafficking studies. *Biotechniques* **24**, 642–651 (1998).
67. Otsuka, H., Nagasaki, Y. & Kataoka, K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **55**, 403–419 (2003).
68. Yoo, H. S. & Park, T. G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J. Controlled Release* **96**, 273–283 (2004).
69. Patil, Y. B., Toti, U. S., Khair, A., Ma, L. & Panyam, J. Single-step surface functionalization of polymeric nanoparticles for targeted drug delivery. *Biomaterials* **30**, 859–866 (2009).
70. Yuan, H. et al. Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells. *Int. J. Pharm.* **348**, 137–145 (2008).
71. Groo, A.-C. et al. Comparison of 2 strategies to enhance pyridoclox solubility: Nanoemulsion delivery system versus salt synthesis. *Eur. J. Pharm. Sci.* **97**, 218–226 (2017).
72. Ghareeb, M. M. & Neamah, A. J. FORMULATION AND CHARACTERIZATION OF NIMODIPINE NANOEMULSION AS AMPOULE FOR ORAL ROUTE. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **8**, 591 (2017).

## ANEXO I

Datos del estudio de estabilidad de las formulaciones de LCM.

Formulación	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	tamaño/nm	PDI	ZP /mV
<b>F30</b>	0	25	13.1 (1.4)	0.184 (0.136)	-11.2 (1.7)
<b>F30</b>	1	25	26.4 (7.4)	0.491 (0.029)	-1.5 (0.3)
<b>F30</b>	2	25	96.5 (107.1)	0.758 (0.212)	-3.1 (0.5)
<b>F30</b>	3	25	31.0 (4.4)	0.765 (0.117)	-2.6 (0.5)
<b>F30</b>	4	25	102.8 (117.9)	0.916 (0.109)	-2.4 (0.1)
<b>F30</b>	0	25	13.1 (1.4)	0.184 (0.136)	-11.2 (1.7)
<b>F30</b>	1	4	27.5 (1.9)	0.465 (0.036)	-2.5 (0.1)
<b>F30</b>	2	4	360.5 (39.9)	0.372 (0.026)	-3.3 (0.1)
<b>F30</b>	3	4	195.4 (96.5)	0.244 (0.039)	-3.1 (0.4)
<b>F30</b>	4	4	284.6 (18.3)	0.279 (0.057)	-2.8 (0.3)
<b>F30 30 mg</b>	0	25	12.6 (0.8)	0.350 (0.037)	-7.8 (4.6)
<b>F30 30 mg</b>	1	25	34.4 (21.0)	0.366 (0.053)	-3.7 (0.2)
<b>F30 30 mg</b>	2	25	34.6 (10.9)	0.500 (0.114)	-3.1 (0.4)
<b>F30 30 mg</b>	3	25	109.4 (8.2)	0.851 (0.136)	-3.3 (0.6)
<b>F30 30 mg</b>	4	25	57.7 (26.1)	1.000 (0.000)	-2.4 (0.1)
<b>F30 30 mg</b>	0	25	12.6 (0.8)	0.350 (0.037)	-7.8 (4.6)
<b>F30 30 mg</b>	1	4	29.0 (14.2)	0.460 (0.044)	-3.2 (0.2)
<b>F30 30 mg</b>	2	4	81.6 (97.6)	0.281 (0.021)	-3.3 (0.2)
<b>F30 30 mg</b>	3	4	258.2 (65.2)	0.352 (0.044)	-4.3 (0.3)
<b>F30 30 mg</b>	4	4	57.2 (30.4)	0.389 (0.047)	-3.5 (0.3)
<b>F30 45 mg</b>	0	25	9.6 (1.4)	0.278 (0.010)	-9.8 (0.5)
<b>F30 45 mg</b>	1	25	21.4 (1.8)	0.398 (0.034)	-2.1 (0.1)
<b>F30 45 mg</b>	2	25	88.2 (11.9)	0.940 (0.103)	-3.3 (0.4)
<b>F30 45 mg</b>	3	25	73.0 (17.0)	1.000 (0.000)	-3.0 (0.5)
<b>F30 45 mg</b>	4	25	87.3 (24.6)	1.000 (0.000)	-2.6 (0.2)
<b>F30 45 mg</b>	0	25	9.6 (1.4)	0.278 (0.010)	-9.8 (0.5)
<b>F30 45 mg</b>	1	4	22.6 (3.0)	0.361 (0.075)	-2.9 (0.3)
<b>F30 45 mg</b>	2	4	88.0 (94.1)	0.352 (0.044)	-3.8 (0.9)
<b>F30 45 mg</b>	3	4	69.1 (72.0)	0.269 (0.018)	-3.9 (0.3)
<b>F30 45 mg</b>	4	4	148.3 (14.1)	0.222 (0.029)	-3.6 (0.2)
<b>F30 60 mg</b>	0	25	13.6 (0.4)	0.306 (0.043)	-4.7 (1.8)
<b>F30 60 mg</b>	1	25	18.7 (3.0)	0.426 (0.126)	-3.4 (0.4)

<b>Formulación</b>	<b>Tiempo (Semanas)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>tamaño/nm</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP /mV</b>
<b>F30 60 mg</b>	2	25	20.2 (5.2)	0.387 (0.082)	-3.0 (0.7)
<b>F30 60 mg</b>	3	25	67.2 (12.1)	1.000 (0.000)	-4.2 (0.3)
<b>F30 60 mg</b>	4	25	64.9 (10.2)	0.984 (0.028)	-2.3 (0.5)
<b>F30 60 mg</b>	0	25	13.6 (0.4)	0.306 (0.043)	-4.7 (1.8)
<b>F30 60 mg</b>	1	4	27.1 (3.7)	0.477 (0.174)	-3.3 (0.6)
<b>F30 60 mg</b>	2	4	117.2 (75.9)	0.280 (0.021)	-3.4 (0.2)
<b>F30 60 mg</b>	3	4	91.0 (106.5)	0.338 (0.026)	-4.1 (0.3)
<b>F30 60 mg</b>	4	4	196.9 (7.2)	0.285 (0.019)	-3.3 (0.3)
<b>F20</b>	0	25	12.0 (5.6)	0.266 (0.021)	-6.2 (3.0)
<b>F20</b>	1	25	22.4 (1.8)	0.351 (0.035)	-2.2 (0.1)
<b>F20</b>	2	25	37.4 (6.9)	0.762 (0.216)	-4.6 (0.9)
<b>F20</b>	3	25	21.4 (11.7)	0.779 (0.191)	-3.1 (0.2)
<b>F20</b>	4	25	39.0 (21.2)	0.904 (0.086)	-4.0 (0.1)
<b>F20</b>	0	25	12.0 (5.6)	0.266 (0.021)	-6.2 (3.0)
<b>F20</b>	1	4	24.3 (1.2)	0.424 (0.061)	-3.0 (0.1)
<b>F20</b>	2	4	37.4 (6.9)	0.762 (0.216)	-4.6 (0.9)
<b>F20</b>	3	4	292.4 (21.0)	0.219 (0.030)	-3.5 (0.2)
<b>F20</b>	4	4	290.5 (15.7)	0.210 (0.022)	-3.7 (0.1)
<b>F20 30 mg</b>	0	25	13.8 (0.3)	0.361 (0.019)	-5.0 (3.7)
<b>F20 30 mg</b>	1	25	22.4 (2.9)	0.438 (0.052)	-3.3 (0.3)
<b>F20 30 mg</b>	2	25	21.4 (1.8)	0.391 (0.114)	-3.5 (0.5)
<b>F20 30 mg</b>	3	25	82.2 (10.4)	0.605 (0.091)	-3.8 (0.6)
<b>F20 30 mg</b>	4	25	51.9 (15.3)	0.973 (0.046)	-2.4 (0.5)
<b>F20 30 mg</b>	0	25	13.8 (0.3)	0.361 (0.019)	-5.0 (3.7)
<b>F20 30 mg</b>	1	4	26.6 (3.1)	0.461 (0.043)	-3.4 (0.1)
<b>F20 30 mg</b>	2	4	45.5 (33.7)	0.282 (0.007)	-3.3 (0.2)
<b>F20 30 mg</b>	3	4	29.4 (3.6)	0.427 (0.085)	-4.6 (0.2)
<b>F20 30 mg</b>	4	4	145.4 (103.4)	0.359 (0.038)	-3.5 (0.6)
<b>F20 45 mg</b>	0	25	12.7 (0.9)	0.147 (0.010)	-19.2 (1.3)
<b>F20 45 mg</b>	1	25	22.2 (0.7)	0.421 (0.030)	-1.3 (0.5)
<b>F20 45 mg</b>	2	25	61.5 (14.9)	0.814 (0.158)	-3.6 (0.5)
<b>F20 45 mg</b>	3	25	20.8 (5.7)	0.442 (0.110)	-2.4 (0.5)
<b>F20 45 mg</b>	4	25	15.9 (10.8)	0.532 (0.137)	-3.4 (0.3)
<b>F20 45 mg</b>	0	25	12.7 (0.9)	0.147 (0.010)	-19.2 (1.3)
<b>F20 45 mg</b>	1	4	28.5 (5.2)	0.358 (0.077)	-2.5 (0.5)
<b>F20 45 mg</b>	2	4	163.7 (117.1)	0.447 (0.072)	-3.1 (0.3)
<b>F20 45 mg</b>	3	4	123.6 (80.0)	0.270 (0.016)	-3.1 (0.4)
<b>F20 45 mg</b>	4	4	98.7 (89.8)	0.245 (0.015)	-3.1 (0.1)

<b>Formulación</b>	<b>Tiempo (Semanas)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>tamaño/nm</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP /mV</b>
<b>F20 60 mg</b>	0	25	10.9 (0.2)	0.322 (0.035)	-7.7 (1.2)
<b>F20 60 mg</b>	1	25	35.5 (16.4)	0.565 (0.280)	-5.3 (1.1)
<b>F20 60 mg</b>	2	25	24.5 (24.8)	0.895 (0.182)	-3.3 (0.6)
<b>F20 60 mg</b>	3	25	21.3 (16.6)	0.740 (0.301)	-5.1 (0.9)
<b>F20 60 mg</b>	4	25	14.0 (18.7)	0.638 (0.378)	-2.9 (0.4)
<b>F20 60 mg</b>	0	25	10.9 (0.2)	0.322 (0.035)	-7.7 (1.2)
<b>F20 60 mg</b>	1	4	70.9 (46.5)	0.914 (0.115)	-5.4 (0.7)
<b>F20 60 mg</b>	2	4	24.9 (2.2)	0.340 (0.089)	-4.4 (0.6)
<b>F20 60 mg</b>	3	4	151.7 (104.0)	0.425 (0.082)	-5.2 (0.1)
<b>F20 60 mg</b>	4	4	174.0 (15.0)	0.310 (0.036)	-4.3 (0.3)

## ANEXO II

Datos del estudio de estabilidad de las formulaciones de NE.

Formulación	Tiempo (Semanas)	Temperatura (°C)	Tamaño/nm	PDI	ZP /mV
<b>F3</b>	0	25	132.6 (19.2)	0.198 (0.017)	-55.7 (4.1)
<b>F3</b>	1	25	164.5 (28.5)	0.214 (0.034)	-62.0 (0.8)
<b>F3</b>	1	4	125.8 (37.8)	0.217 (0.006)	-69.5 (3.8)
<b>F3</b>	2	25	153.0 (16.3)	0.243 (0.011)	-65.8 (1.7)
<b>F3</b>	2	4	89.7 (55.8)	0.229 (0.031)	-74.8 (11.2)
<b>F3</b>	3	25	142.7 (10.6)	0.172 (0.011)	-20.5 (0.6)
<b>F3</b>	3	4	183.8 (4.7)	0.171 (0.017)	-18.9 (1.0)
<b>F3</b>	4	25	134.8 (78.5)	0.169 (0.061)	-23.1 (3.2)
<b>F3</b>	4	4	115.5 (23.8)	0.228 (0.023)	-31.0 (2.7)
<b>F3 NFD 10</b>	0	25	63.0 (24.3)	0.204 (0.015)	-78.1 (4.0)
<b>F3 NFD 10</b>	1	25	118.5 (13.3)	0.192 (0.008)	-78.0 (7.6)
<b>F3 NFD 10</b>	1	4	110.2 (51.7)	0.263 (0.047)	-73.5 (4.9)
<b>F3 NFD 10</b>	2	25	84.1 (48.2)	0.184 (0.033)	-67.2 (4.4)
<b>F3 NFD 10</b>	2	4	115.2 (8.9)	0.201 (0.012)	-69.8 (1.8)
<b>F3 NFD 10</b>	3	25	121.0 (49.5)	0.198 (0.040)	-25.6 (2.4)
<b>F3 NFD 10</b>	3	4	165.1 (13.1)	0.172 (0.034)	-18.9 (1.4)
<b>F3 NFD 10</b>	4	25	130.4 (7.5)	0.228 (0.004)	-31.9 (3.5)
<b>F3 NFD 10</b>	4	4	186.1 (16.2)	0.160 (0.013)	-22.8 (1.1)
<b>F3 NFD 25</b>	0	25	41.1 (21.6)	0.245 (0.006)	-52.3 (1.8)
<b>F3 NFD 25</b>	1	25	73.9 (35.1)	0.241 (0.032)	-58.2 (1.4)
<b>F3 NFD 25</b>	1	4	90.9 (45.6)	0.212 (0.009)	-67.3 (1.5)
<b>F3 NFD 25</b>	2	25	83.1 (46.1)	0.247 (0.011)	-69.1 (3.3)
<b>F3 NFD 25</b>	2	4	70.9 (21.0)	0.347 (0.017)	-69.2 (1.3)
<b>F3 NFD 25</b>	3	25	155.0 (13.7)	0.190 (0.020)	-18.6 (0.3)
<b>F3 NFD 25</b>	3	4	145.2 (13.7)	0.200 (0.024)	-15.8 (0.3)
<b>F3 NFD 25</b>	4	25	100.1 (42.7)	0.184 (0.017)	-35.8 (0.6)
<b>F3 NFD 25</b>	4	4	146.4 (8.3)	0.221 (0.037)	-29.1 (1.8)
<b>F4</b>	0	25	56.4 (2.0)	0.313 (0.028)	-61.5 (3.5)
<b>F4</b>	1	25	184.3 (33.7)	0.307 (0.036)	-11.2 (0.1)
<b>F4</b>	1	4	91.3 (49.7)	0.389 (0.015)	-70.4 (1.7)
<b>F4</b>	2	25	40.9 (6.7)	0.441 (0.072)	-66.1 (3.2)
<b>F4</b>	2	4	119.8 (56.9)	0.422 (0.068)	-72.0 (3.6)
<b>F4</b>	3	25	96.6 (45.0)	0.300 (0.015)	-7.8 (0.4)

<b>Formulación</b>	<b>Tiempo (Semanas)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tamaño/nm</b>	<b>PDI</b>	<b>ZP /mV</b>
<b>F4</b>	3	4	38.3 (19.6)	0.380 (0.071)	-52.7 (3.4)
<b>F4</b>	4	25	90.7 (32.4)	0.311 (0.008)	-14.1 (0.9)
<b>F4</b>	4	4	59.4 (15.0)	0.345 (0.041)	-65.0 (1.8)
<b>F4 NFD 10</b>	0	25	42.0 (3.6)	0.361 (0.030)	-72.6 (5.6)
<b>F4 NFD 10</b>	1	25	91.5 (95.1)	0.268 (0.016)	-7.9 (0.3)
<b>F4 NFD 10</b>	1	4	45.8 (5.5)	0.363 (0.074)	-68.1 (0.9)
<b>F4 NFD 10</b>	2	25	81.6 (67.1)	0.278 (0.027)	-67.0 (3.1)
<b>F4 NFD 10</b>	2	4	83.1 (64.3)	0.341 (0.064)	-70.5 (4.2)
<b>F4 NFD 10</b>	3	25	112.6 (68.5)	0.270 (0.032)	-27.3 (2.3)
<b>F4 NFD 10</b>	3	4	136.5 (53.8)	0.270 (0.014)	-11.9 (0.6)
<b>F4 NFD 10</b>	4	25	92.4 (72.5)	0.295 (0.023)	-25.7 (4.3)
<b>F4 NFD 10</b>	4	4	64.9 (24.7)	0.360 (0.014)	-26.3 (2.3)
<b>F4 NFD 25</b>	0	25	42.0 (15.8)	0.393 (0.020)	-74.2 (6.3)
<b>F4 NFD 25</b>	1	25	191.7 (5.6)	0.253 (0.010)	-13.2 (1.6)
<b>F4 NFD 25</b>	1	4	107.0 (23.1)	0.358 (0.040)	-70.7 (0.3)
<b>F4 NFD 25</b>	2	25	72.7 (70.9)	0.375 (0.011)	-68.7 (3.3)
<b>F4 NFD 25</b>	2	4	70.4 (70.1)	0.373 (0.013)	-72.6 (3.5)
<b>F4 NFD 25</b>	3	25	150.0 (77.3)	0.239 (0.024)	-10.8 (0.5)
<b>F4 NFD 25</b>	3	4	191.5 (47.8)	0.230 (0.022)	-11.2 (0.6)
<b>F4 NFD 25</b>	4	25	66.5 (43.6)	0.269 (0.042)	-19.5 (1.5)
<b>F4 NFD 25</b>	4	4	91.4 (48.3)	0.350 (0.137)	-19.5 (1.9)
<b>F4 NFD 50</b>	0	25	40.0 (9.2)	0.370 (0.018)	-77.3 (2.4)
<b>F4 NFD 50</b>	1	25	74.0 (36.7)	0.338 (0.050)	-89.6 (26.6)
<b>F4 NFD 50</b>	1	4	66.3 (38.3)	0.311 (0.027)	-69.7 (3.3)
<b>F4 NFD 50</b>	2	25	110.1 (65.7)	0.390 (0.011)	-75.2 (4.2)
<b>F4 NFD 50</b>	2	4	135.1 (70.0)	0.351 (0.072)	-73.4 (3.2)
<b>F4 NFD 50</b>	3	25	115.3 (80.4)	0.256 (0.006)	-23.9 (1.2)
<b>F4 NFD 50</b>	3	4	169.4 (22.8)	0.239 (0.022)	-21.3 (0.9)
<b>F4 NFD 50</b>	4	25	80.6 (54.3)	0.257 (0.021)	-17.6 (0.2)
<b>F4 NFD 50</b>	4	4	67.3 (44.5)	0.303 (0.058)	-22.2 (1.7)