



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

Análisis sistemático de variables determinantes en la producción de nanopartículas poliméricas de Eudragit® RS, RL y PCL por el método de nanoprecipitación

PATROCINANTE

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

DIRECTORES DE MEMORIA

Prof. Javier O. Morales M.
Laboratorio de *Drug Delivery*
Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Prof. Eduardo Berríos
Departamento de Química Orgánica y Físicoquímica

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Miguel Orlando Jara González

Santiago de Chile, 2016

CONTENIDO

ÍNDICE DE ECUACIONES, FIGURAS Y TABLAS	v
Ecuaciones	v
Figuras.....	v
Tablas.....	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1
Polímeros hidrofóbicos como matrices para nanoprecipitación	1
Dinámica molecular, el microscopio virtual	2
HIPÓTESIS.....	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	4
MATERIALES	5
MÉTODOS EXPERIMENTALES	6
Sección experimental de ERS/ERL	6
Nanoprecipitación de ERS/ERL	6
Metodologías de mezclado.....	6
Metodología 1 (M1).....	6
Metodología 2 (M2).....	6
Metodología 3 (M3).....	6
Caracterización de las Nanopartículas de ERS/ERL.....	7
Sección experimental de PCL.....	7
Nanoprecipitación de PCL.....	7

Caracterización de las Nanopartículas de PCL	7
MÉTODOS COMPUTACIONALES	8
Dinámica molecular atomística.....	8
Dinámica molecular Coarse Grain.....	10
RESULTADOS.....	13
Resultados de Eudragit® RS.....	13
Estudio de las variables determinantes en la producción de NpERS	13
Reducción del tamaño promedio y PDI por aumento de la Razón S/A	13
Reducción del potencial zeta por parte del agente estabilizante	14
Eliminación de agregados por aumento del flujo de adición y reducción del τ_{mix}	15
Cambios en la metodología de mezclado reduce PDI de las NpERS	18
Reducción de la PDI por aumento de la concentración de ERS	19
Mezcla de solvente reduce el tamaño de partícula y PDI	21
Otras variables investigadas.....	23
Resultados de Eudragit® RL	24
Estudio de las variables determinantes en la producción de NpERL.....	24
Resultados de Policaprolactona.....	26
Estudio de las variables determinantes en la producción de NpPCL	26
Aumento del tamaño por razón S/A creciente	26
Efecto del diámetro interno de la aguja en Tamaño y PDI	27
El uso de un agente estabilizante adecuado produce NpPCL monodispersas.....	28
Efecto de la razón S/A en NpPCL estabilizadas con SDS	31
Efecto de la concentración de la fase solvente en NpPCL estabilizadas con SDS	32
Efecto de la concentración de la fase solvente a diferente razón S/A en NpPCL estabilizadas con SDS.....	33
Efecto del peso molecular de PCL en las NpPCL.....	34

Efecto de la composición de la fase solvente en las NpPCL	37
Efecto del DIA en las NpPCL estabilizadas con SDS y acetonitrilo como fase solvente.....	39
Encapsulación de Fármaco con baja solubilidad acuosa.....	40
Resultados de Dinámica molecular	42
DISCUSIÓN	45
CONCLUSIÓN	49
LIMITACIONES	50
PROYECCIONES	50
REFERENCIAS	51
ANEXO I	59
MARCO TEÓRICO DEL MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN	59
ANEXO II.....	69
LÍNEA DE COMANDO PARA LA GENERACIÓN DE MODELO ATOMÍSTICO.....	69
Generar molécula en formato .pdb.....	69
Generar archivo .rtp	69
Generar formatos iniciales para Gromacs (.gro y .top).....	73
Minimización de Energía en el Vacío.....	73
Generación de la caja y solvatación de la PCL-20.....	76
Equilibración del sistema	77
Dinámica Molecular.....	79
ANEXO III.....	80
DETALLES DEL MÉTODO PARA MD USANDO GROMACS PARA MODELO COARSE GRAIN	80
Mapping	80

ÍNDICE DE ECUACIONES, FIGURAS Y TABLAS

Ecuaciones

Ecuación 1. Potencial de Lennard-Jones 12-6. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ϵ es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas. Los términos r^{-12} y r^{-6} dan cuenta del potencial de repulsión y atracción respectivamente.	9
Ecuación 2. Potencial de Lennard-Jones 9-6. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ϵ es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas.	11
Ecuación 3. Potencial de Lennard-Jones 12-4. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ϵ es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas.	11
Ecuación 4. Ecuación de Mark-Houwink, Donde η es la viscosidad intrínseca, M es el peso molecular del polímero, a y K son los parámetros de Mark-Houwink, que dependen del sistema polímero-solvente y de la temperatura.	35

Figuras

Figura 1. Dispositivo de mezclado utilizado en la metodología 1. En la parte superior se encuentra la fase solvente que se inyecta sobre la fase antisolvente por medio de agujas (intercambiables). El sistema se encuentra bajo agitación magnética.	6
Figura 2. Representación de los tres residuos utilizados para la construcción de la cadena polimérica con 20 unidades monoméricas. Los residuos LII y LIF son los iniciales y terminales respectivamente, que se cuentan por 18 residuos LIG.	9
Figura 3. Mapping utilizado para la conversión del modelo atomístico en Coarse Grain. Cada residuo de PCL se separó en tres Beads. El agua se representó como tres moléculas por Bead.	10
Figura 4. Ecuaciones utilizadas para calcular las constantes A y C de los potenciales de Lennard-Jones 12-4 y 9-6.	11
Figura 5. Tamaño promedio y PDI de las NpERS a distinta razón S/A.	14
Figura 6. Reducción del potencial Zeta a medida que la concentración de P188 aumenta. Los tamaños y PDI fueron similares en todas las formulaciones (datos no mostrados).	15

Figura 7. Efecto del DIA en el tiempo de mezclado (ver Anexo I). A medida que se reduce el DIA el tiempo de mezclado es menor.	16
Figura 8. Distribución de tamaño de partículas de NpERS a distintos DIA. Se aprecia que a medida que se aumenta la población de agregados se reduce en tamaño hasta desaparece y aumentar la población de partículas de ~50 nm.....	17
Figura 9. Micrografía SEM de NpERS realizadas con DIA de 0,838. La flecha y círculo rojo destacan una NpERS. La barra blanca representa 2 μ m.	17
Figura 10. Tamaño promedio y PDI a distintas metodologías. Se observa que a medida que el DIA con M1 se reduce el tamaño promedio y PDI. La M2 Y M3 a pesar que aumentan el tamaño promedio por perder turbulencia, reducen la PDI por una dispersión del solvente más homogénea en una escala de tiempo menor. Sólo M1 (0,838), M2 y M3 fueron monomodales.	19
Figura 11. Distribución de tamaños de NpERS a distintas concentraciones del polímero. Se observa que a medida que aumenta la concentración las poblaciones de agregados se van reduciendo y forman una distribución de tamaños monomodal. El perfil de 40mg/mL es similar a los logrados después de 20 mg/mL, por razones de la representación gráfica se omiten.	20
Figura 12. Tamaño promedio y PDI a distintas concentraciones de ERS. Se aprecia que el tamaño promedio no varía apreciablemente en el rango estudiado, a pesar que las distribuciones de tamaño son muy diferentes.	21
Figura 13. Tamaño promedio y PDI de NpERS a medida que la fase solvente se enriquece en metanol. Se observa que a medida que aumenta el contenido de metanol el tamaño de partícula es menor. El último punto tiene un aumento significativo de PDI porque ERS no es totalmente soluble y se nanoprecipitó utilizando una dispersión opaca.	23
Figura 14. Estructura de ERS/ERL, ambos polímeros poseen el peso molecular de 32.000 g/mol. Se diferencian en la proporción de los grupos x : y : z, ERS posee una proporción de 0,1 : 2 : 1, mientras que ERL es 0,2 : 2 : 1.	24
Figura 15. Distribución de tamaños de NpERL a distintas concentraciones del polímero. Se observa que a medida que aumenta la concentración las poblaciones de agregados se van reduciendo y se forma una distribución de tamaños monomodal a los 40mg/mL de ERL.	25
Figura 16. Tamaño promedio de NpPCL a distintas razones S/A.	27
Figura 17. Comparación del tamaño promedio de NpPCL a distintas razones S/A variando la concentración de PCL.	27
Figura 18. Efecto del diámetro interno de la aguja (DIA) en el tamaño y PDI de las NpPCL.	28

Figura 19. Estructuras moleculares de los agentes estabilizantes de tipo estérico y de tipo iónico utilizados para estabilizar las NpPCL.	29
Figura 20. Efecto de la concentración de quitosano y alginato en la PDI. Un aumento en la concentración, aumenta la PDI, por un incremento en la viscosidad de la fase antisolvente.	30
Figura 21. Efecto de la concentración de SDS en el tamaño promedio y potencial zeta. No se observan cambios significativos en los resultados al aumentar la concentración de SDS.	31
Figura 22. Efecto de la razón S/A en el tamaño promedio y la PDI. Se observa que las variables permanecen constantes con el aumento de la razón S/A.	32
Figura 23. Efecto de la concentración de PCL en la fase solvente en términos de tamaño promedio y PDI. Se observa que no existen grandes variaciones en las concentraciones investigadas.	33
Figura 24. Comparación del efecto de la razón S/A en el tamaño promedio a distintas concentraciones de PCL. Se observa que en todos los casos una mayor concentración provoca un aumento en el tamaño de las partículas.	34
Figura 25. Efecto de la concentración de hPCL en el tamaño promedio y PDI. Se observa que un aumento en la concentración provoca un marcado aumento de ambas variables. Solamente la formulación de 1 mg/mL no presentó AVAS.	35
Figura 26. Efecto de la Razón S/A en tamaño de partícula y PDI de las NphPCL, utilizando una concentración de 6 mg/mL del polímero. Se observa que solamente a 0,5 el tamaño varía de forma apreciable. Todas las formulaciones presentaron AVAS.	36
Figura 27. Efecto de la composición de la fase solvente (acetona-acetonitrilo) en el tamaño promedio y PDI de las NpPCL. Se observa que las variables permanecen constantes, excepto a 50% de acetona que podría ser una variación por el método de fabricación.	38
Figura 28. Efecto del DIA en el tamaño de partícula y PDI. Se observa que una reducción en el DIA disminuye el tamaño de partícula, sin embargo aumenta notablemente la aparición de AVAS.	39
Figura 29. Tamaño promedio y PDI de NpPCL realizadas a distintos porcentajes en peso de loperamida con respecto al peso del polímero. Se observa que al aumentar la cantidad de loperamida existe una disminución del tamaño siempre en condiciones monodispersas ($PDI < 0.1$).	40
Figura 30. Micrografía TEM de NpPCL-Lop 20%, la barra blanca representa 1 μm	41

Figura 31. Representación del radio de giro (R_g) y la distancia end-to-end R_{ee} de una cadena polimérica reticulada.....	42
Figura 32. Representación de modelos de la unidad monomérica de PCL. (A) Modelo utilizado en el trabajo de Di Pasquale et al. (B) Modelo que se utilizó en este trabajo.	43
Figura 33. Representación de los modelos atomísticos y Coarse Grain. (A) PCL-Atom en vacío. (B) PCL-CG en vacío. (C) PCL-Atom precipitada en medio acuoso. (D) PCL-CG precipitada en agua Coarse Grain (esferas plateadas).	44

Tablas

Tabla 1. Detalle de la composición de cada Bead utilizada en el modelo Coarse Grain.	10
Tabla 2. Valores de σ , ϵ , A y C de las interacciones no-enlazantes entre las beads utilizadas en el modelo Coarse Grain	12
Tabla 3. Efecto del Needle Gauge (NG) y su diámetro interno (DIA) en el tiempo de mezclado y la velocidad lineal de la inyección de 4 mL de fase solvente.	16
Tabla 4. ¹ Volumen molar de los solventes y valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción. Los datos utilizados para los cálculos provienen de Van Krevelen et al. ⁵⁰	22
Tabla 5. Valores de los coeficientes de difusión mutua y razón de intercambio calculada de los sistemas solvente-agua. (*) Datos extraídos de Derlacki et al. ⁵¹ (·) Datos extraídos de Kim et al. ⁴⁷	22
Tabla 6. ¹ Volumen molar de los solventes y valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción solvente-antisolvente. Los Datos utilizados para los cálculos provienen de provenientes de Van Krevelen et al. ⁵⁰	38
Tabla 7. Valores de los coeficientes de difusión mutua y razón de intercambio calculada de los sistemas solvente-agua. Datos extraídos de Kim et al. ⁴⁷	38
Tabla 8. Valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción polímero-solvente. Valores se calcularon a partir del trabajo de Bordes et al. ¹³	39
Tabla 9. Comparación de los valores obtenidos de radio de giro (R_g) y distancia end-to-end R_{ee} en los modelos atomísticos y Coarse Grain.	43
Tabla 10. Comparación del número de partículas utilizadas en los modelos atomístico y Coarse Grain de una cadena de PCL con 20 unidades monoméricas, y los tiempos necesarios para realizar una dinámica molecular.	44

RESUMEN

En los últimos años la mayoría de los fármacos producidos por la industria farmacéutica innovadora presentan problemas de solubilidad acuosa, lo que reduce la biodisponibilidad de estos y dificulta su formulación. Una opción para vehiculizar estos fármacos es mediante el uso de la nanotecnología utilizando matrices poliméricas. Para la generación de nanopartículas poliméricas, el método de nanoprecitación es una opción interesante, ya que es simple, rápido, escalable y utiliza materiales poco tóxicos. Sin embargo, su principal limitante es la facilidad con que se generan agregados.

El objetivo de este trabajo es encontrar las condiciones para la generación de nanopartículas poliméricas de reducido tamaño (menores a 150 nm), con distribución de tamaños monodispersa y monomodal, en un solo paso, de forma reproducible y sin la necesidad de utilizar filtros.

La primera parte de este trabajo corresponde al desarrollo experimental para encontrar las condiciones adecuadas de producción. Aquí, se busca desarrollar un protocolo para obtener una población de nanopartículas monodispersa a partir de los polímeros Eudragit® RS, Eudragit® RL y policaprolactona, polímeros de propiedades variadas. Esto permitirá tener un mayor espectro de nanovehículos disponibles para encapsular fármacos con propiedades fisicoquímicas diversas. La segunda parte de este trabajo emplea la química computacional, específicamente la dinámica molecular, para realizar modelos que permitan comprender el fenómeno en la escala de átomos y moléculas, difícil de observar con los equipos disponibles. De este modo, se desarrolla un modelo de policaprolactona *Coarse Grain* para dinámica molecular que permite realizar simulaciones en tiempos acotados y ofrezca la posibilidad de complejizarse sin elevados costos computacionales.

Dentro de los principales hallazgos de este trabajo, se encuentra la generación de nanopartículas monodispersas de polímeros hidrofóbicos, con estructuras variadas a través de la sistematización diferentes estrategias. En lo que respecta a la dinámica molecular, el modelo *Coarse Grain* de policaprolactona precipita en medio acuoso y es capaz de reducir el tiempo de simulación 20 veces.

Este trabajo logra generar de forma rápida y reproducible un espectro de nanovehículos monodispersos para futuras aplicaciones, además de facilitar el diseño de nuevas formulaciones considerando el protocolo establecido. Estas nanopartículas serían útiles para realizar posteriores estudios biológicos con mayor trazabilidad.

ABSTRACT

In the last few years, most innovative drugs produced by the pharmaceutical industry exhibit aqueous solubility problems, impairing their formulation and reducing their bioavailability. An option for drug delivery is the use nanotechnology based on polymeric matrices. For the generation of these nanoparticles, the nanoprecipitation method is an interesting option, being simple, fast, scalable and susceptible to formulate using less toxic materials. Nevertheless, the main limitation of this technique is the nanoparticle tendency to aggregate.

The aim of this work is, firstly, to find the conditions for the generation of polymeric nanoparticles of reduced size (less than 150 nm), in a single step, with a monodisperse and monomodal size distribution, and without the use of filters. We used the polymers Eudragit® RS, Eudragit® RL and polycaprolactone (polymers with different physicochemical characteristics), to obtain a wide spectrum of nanoparticles for drug encapsulation. Secondly, to understand the process at a molecular and atomic scale (both difficult to observe with the available equipment), we explored the use of computational chemistry, specifically molecular dynamics. Thus, a polycaprolactone molecular dynamics Coarse Grain model was developed to simulate in short time lapses, and with the potential to enhance the complexity without high computational costs.

Among the principal findings of this thesis, conditions for monomodal nanoparticles of hydrophobic polymers were found, with diverse structures through the systematization of different strategies. Regarding molecular dynamics, the polycaprolactone Coarse Grain model showed the polymer precipitation in aqueous medium and was capable of reducing the simulation time 20-fold. These findings could be used in formulating nanoparticles that could allow achieving more traceable biological studies.

INTRODUCCIÓN

Las nanopartículas poliméricas (Nps) se aplican en entrega de fármacos (*drug delivery*) con el fin de mejorar la biodisponibilidad, farmacocinética y biodistribución de los fármacos, además de reducir efectos adversos y permitir direccionar con selectividad a los sitios de acción (*targeting*).¹⁻

³ Dependiendo del material y método de fabricación, se obtienen Nps de variados tamaños y formas ofreciendo propiedades y potenciales terapéuticos únicos. Sin embargo, los efectos adversos y mecanismos de toxicidad también se modifican.^{4,5}

La nanoprecipitación es un método de fabricación de especial interés debido al uso de solventes poco tóxicos, rapidez y simpleza.⁶ Este método ocurre en un solo paso y es escalable para aplicaciones industriales.⁷ Experimentalmente, consiste en agregar una solución orgánica (de un solvente miscible con agua) de un polímero (insoluble en agua) sobre un volumen acuoso, para lograr la precipitación del polímero. Este método es principalmente útil para encapsular fármacos hidrofóbicos, aunque existen trabajos que han logrado encapsular otras moléculas tales como, fármacos hidrofílicos y proteínas.⁸ La metodología es simple, pero su principal limitante es la facilidad con que se generan agregados y poblaciones de tamaños de partícula polidispersas.⁹

Partículas de distinto tamaño presentan distintos comportamientos de biodistribución, excreción y acumulación entre otros, dificultando las conclusiones de los estudios.¹⁰ Preguntas como ¿quién produce el efecto terapéutico?, ¿las partículas de 100 nm?, ¿las de 500 nm?, ¿los agregados? son difíciles de responder en producciones de partículas con más de una población de partículas y PDI > 0,3.

Por esto, es relevante determinar las condiciones adecuadas para la generación de nanopartículas poliméricas de reducido tamaño, con distribuciones de tamaño monodispersas y monomodales para aplicaciones biológicas.¹⁰ Esto permite relacionar de manera adecuada los efectos observados en estudios de aplicación biológica, con las características de la única población de nanopartículas.

Polímeros hidrofóbicos como matrices para nanoprecipitación

Este trabajo se enfocó en la elaboración de un protocolo que permita generar nanopartículas homogéneas en un solo paso y sin la necesidad de utilizar filtros u otro método de separación. Se trabajó con polímeros de variadas características como Eudragit® RS (ERS), Eudragit® RL (ERL)

y policaprolactona (PCL) a dos pesos moleculares diferentes. ERS y ERL son copolímeros biocompatibles sintetizados de los ésteres ácidos del acrilato y metacrilato. Estos polímeros son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos como etanol y acetona.¹¹ Las estructuras de estos polímeros difieren sólo en la cantidad de amonios cuaternarios presentes en sus unidades monoméricas, encontrándose en doble proporción en el ERL. El hinchamiento es independiente de pH, pero el agua es capaz de permear más fácilmente por ERL que por ERS, por la mayor cantidad de grupos amonio cuaternarios.¹² La policaprolactona (PCL) es un polímero biodegradable, un poliéster alifático obtenido por la polimerización de anillo abierto de caprolactona. PCL es insoluble en agua y soluble en solventes orgánicos como ácido acético, acetona, acetonitrilo, tetrahidrofurano, entre otros.¹³ El principal producto de biodegradación de PCL es el ácido 6-hidroxicaproico que es removido por el metabolismo;¹⁴ por esta razón, PCL se considera biocompatible y se ha utilizado en variadas aplicaciones biomédicas.¹⁵

Dinámica molecular, el microscopio virtual

Para profundizar en los fenómenos que rigen la nanoprecipitación y la encapsulación de fármacos, se puede hacer uso de la Dinámica Molecular (MD, *Molecular Dynamics*). Algunos plantean que la MD es una especie de “microscopio virtual” que permite observar fenómenos en escalas de tiempo y tamaño imposibles con los equipos actuales.¹⁶ La MD se encarga de resolver las ecuaciones de *Newton* (ecuaciones de movimiento) de un sistema. De las trayectorias de los movimientos de los átomos y moléculas es posible calcular una gran cantidad de propiedades (*e.g.* entalpía de vaporización, coeficiente de difusión, densidad).¹⁷ El objetivo final es relacionar de forma directa propiedades microscópicas (masas de átomos, interacciones, geometría molecular, etc.) con las propiedades macroscópicas (cambios de entalpía, coeficientes de difusión, viscosidad, etc.).¹⁸ Un modelamiento atómico representa de forma detallada el sistema en cuanto a enlaces químicos, ángulos de enlace, ángulos de torsión, interacciones electrostáticas y de Van der Waals entre otras características.¹⁹ Una limitante de estas simulaciones son las bajas escalas de tiempo y de longitud que se pueden modelar, por los elevados costos computacionales.²⁰ Para acceder a escalas de tiempo y longitud mayores se pueden utilizar modelos de *Coarse-Grain* (CG), muy populares para aplicaciones de modelamiento biomolecular.²¹ En CG, una agrupación de átomos se representa como una partícula o *bead*, reduciendo el número de interacciones que se deben calcular y los costos computacionales.²²

Con todo lo anterior, este trabajo plantea que es posible optimizar un método para la obtención de nanopartículas poliméricas monodispersas, útiles para *drug delivery*, por medio de un análisis sistemático de las variables que determinan el proceso de nanoprecipitación por antisolvente de ERS, ERL y PCL, además de explorar el uso de la dinámica molecular.

HIPÓTESIS

Es posible generar nanopartículas poliméricas de reducido tamaño, monodispersas y monomodales por el método de nanoprecipitación en un solo paso y de forma reproducible, modificando variables de producción y formulación.

OBJETIVO GENERAL

Identificar las variables más importantes que determinan la obtención de nanopartículas monodispersas, utilizando el método de nanoprecipitación por antisolvente de los polímeros ERS, ERL y PCL.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un método estandarizado de fabricación de nanopartículas de ERS y ERL por el método de nanoprecipitación por antisolvente e identificar las variables más relevantes del proceso.
2. Desarrollar un método estandarizado para fabricar nanopartículas de PCL por el método de nanoprecipitación por antisolvente.
3. Generar un modelo *Coarse Grain* de PCL para futuras aplicaciones en dinámica molecular.
4. Explorar la incorporación de un fármaco con baja solubilidad acuosa dentro de formulaciones seleccionadas.

MATERIALES

- Eudragit® RS (ERS) (Evonik Industries, Essen, Germany)
- Eudragit® RL (ERL) (Evonik Industries, Essen, Germany)
- Acetona (Merck, Darmstadt, Germany)
- Metanol (Merck, Darmstadt, Germany)
- Acetonitrilo (Merck, Darmstadt, Germany)
- Agua MiliQ (Millipore, Sao Paulo, Brazil)
- Poloxámero 188 (P188) (Spectrum Chemical, New Brunswick, NJ)
- Poloxámero 407 (P407) (Spectrum Chemical, New Brunswick, NJ)
- Policaprolactona 10.000 Mn (PCL) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Policaprolactona 80.000 Mn (hPCL) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)
- Tween 20 (J.T. Baker, Phillipsburg, USA)
- Lycoat RS 720 EXP (Roquette, Lestrem, Francia)
- Alginato de sodio de baja viscosidad (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Quitosano de bajo peso molecular (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Polivinilpirrolidona K15 (PVP) (ISP Technologies, Inc, NJ, USA)
- Dodecilsulfato de sodio (SDS) (Merck, Darmstadt, Alemania)
- Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Sigma Aldrich, St. Louis)
- Loperamida-HCl (Lop) (AK Scientific, Inc., San Francisco, USA)

MÉTODOS EXPERIMENTALES

Sección experimental de ERS/ERL

Nanoprecipitación de ERS/ERL

Soluciones de ERS o ERL en acetona (o metanol) forman la fase solvente u orgánica. Esta fase se mezcló por diferentes metodologías con la fase antisolvente u acuosa compuesta de agua MilliQ con/sin el estabilizante estérico poloxámero 188 o 407. Luego la fase solvente se retiró de la mezcla a través de rotavaporación.

Metodologías de mezclado

Metodología 1 (M1)

La fase solvente se inyectó de forma manual al centro del vórtex generado por la agitación magnética del antisolvente como muestra la Figura 1. El diámetro interno de la aguja (DIA) fue una variable modificable.

Metodología 2 (M2)

Similar a la M1, pero se vertió la fase solvente sin la utilización de agujas, ofreciendo un mezclado más homogéneo en un corto intervalo de tiempo.

Metodología 3 (M3)

Similar a la M2, pero en este caso se vertió la fase antisolvente sobre la fase solvente.

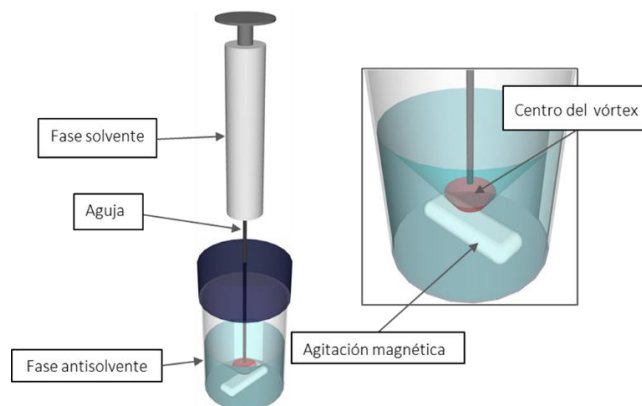


Figura 1. Dispositivo de mezclado utilizado en la metodología 1. En la parte superior se encuentra la fase solvente que se inyecta sobre la fase antisolvente por medio de agujas (intercambiables). El sistema se encuentra bajo agitación magnética.

Caracterización de las Nanopartículas de ERS/ERL

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.

La morfología de las partículas se analizó por microscopía de transmisión electrónica (TEM) y microscopía electrónica de barrido (SEM) 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 0,5% durante 2 minutos para teñir la muestra, se retiró el exceso y se dejó secar durante la noche. En el caso de SEM, las formulaciones fueron liofilizadas y el sólido resultante fue recubierto con una mezcla de oro/paladio.

Sección experimental de PCL

Nanoprecipitación de PCL

Soluciones de PCL en acetona forman la fase solvente u orgánica. Esta fase se mezcló por diferentes metodologías con la fase antisolvente u acuosa compuesta de agua MiliQ (con/sin el estabilizante). Para el proceso de mezclado, se utilizó M1 descrito con anterioridad. Luego la fase solvente se retiró de la mezcla a través de rotavaporación. Se utilizó Policaprolactona de Mn 10.000 Da y de 80.000 Da. La fase solvente fue intercambiable con acetonitrilo y mezclas acetonitrilo-acetona. Los estabilizantes utilizados fueron: Tween 20, Lycoat RS 720 EXP, poloxámero 188 y 407, alginato de sodio de baja viscosidad, quitosano de bajo peso molecular, polivinilpirrolidona K15, dodecilsulfato de sodio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

Para la encapsulación de un fármaco con baja solubilidad acuosa, se escoge Loperamida-HCl (Lop) como fármaco modelo (clase II del sistema de clasificación biofarmacéutica), esta se incorporó en la fase solvente como una solución en metanol. La cuantificación de Lop se realizó por HPLC-UV/Vis PerkinElmer Flexar a una longitud de onda de 210 nm.

Caracterización de las Nanopartículas de PCL

De forma similar a las nanopartículas de RS/RL, se caracterizó distribución de tamaños, tamaño promedio, polidispersidad, potencial zeta y morfología.

MÉTODOS COMPUTACIONALES

Los equipos disponibles en laboratorio no permiten observar qué sucede a nivel molecular en escala de tiempo en que ocurre la nanoprecitación, escala en rango de los nanosegundos.^{23,24} En busca de acceder a la escala molecular, se hace uso de herramientas de la química computacional donde una de ellas es la dinámica molecular.

Se utilizó un clúster de 16 nodos, cada uno compuesto por 16 CPU. Las CPU tenían 4 GB de memoria RAM disponible y el sistema operativo es ROCKS basado en CENTOS. Se instaló el *Software* Gromacs versión 5.1.2,²⁵ para realizar la dinámica molecular.

Dinámica molecular atomística

La simulación atomística utilizó el campo de fuerza OPLS,²⁶ especial para modelamientos de moléculas orgánicas.¹⁹ Di Pasquale *et al.*²⁴ realizaron una dinámica molecular de PCL utilizando el mismo campo de fuerza (OPLS), por lo que se utilizó este trabajo como base para la generación del modelo atomístico control.

El modelo de PCL utilizado fue de 20 monómeros y los extremos de la cadena fueron metilados. Para generar la cadena de PCL se utilizaron 3 tipos de residuos, los residuos LII, LIG y LIF que se muestran en la Figura 2. LII y LIF son los residuos con extremos metilados inicial y final, respectivamente. El residuo LIG se repite 18 veces dentro de la cadena.

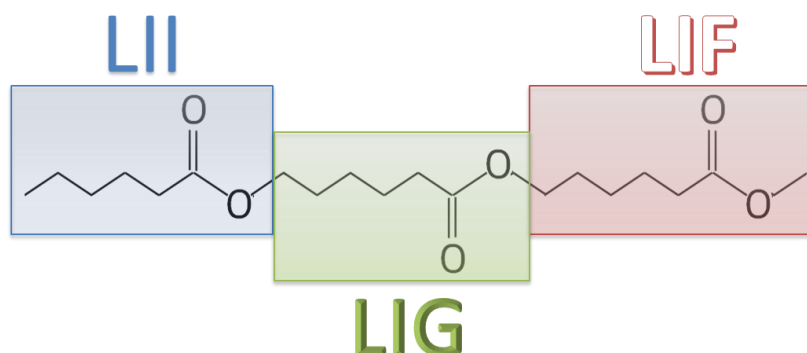


Figura 2. Representación de los tres residuos utilizados para la construcción de la cadena polimérica con 20 unidades monoméricas. Los residuos LII y LIF son los iniciales y terminales respectivamente, que se componen por 18 residuos LIG.

Las cargas asignadas a cada átomo utilizando el campo de fuerza OPLS para cada residuo se muestran en la Tabla A1., Tabla A2. y Tabla A3 (ver Anexo II). Los potenciales no-enlazantes utilizados fueron del tipo Lennard-Jones 12-6²⁷ y *Gromacs* los calcula de acuerdo a la Ecuación 1.

$$U_{LJ}(r) = 4 \varepsilon \left\{ \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right\}$$

Ecuación 1. Potencial de Lennard-Jones 12-6. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ε es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas. Los términos r^{-12} y r^{-6} dan cuenta del potencial de repulsión y atracción respectivamente.

Se utilizó el modelo de agua SPC²⁸ y el tiempo de cada paso fue de 1 fs. Las simulaciones se realizaron con el termostato Berendsen,²⁹ con una constante de acoplamiento de $\tau_T = 0,1$ ps para mantener la temperatura del sistema cercana a 300 K. Para estabilizar la presión a 1 bar, se utilizó el barómetro Berendsen con una constante de acoplamiento de $\tau_P = 0,5$ ps.

Dinámica molecular *Coarse Grain*

Los modelos atomísticos complejos requieren de elevados costos computacionales. Una forma de reducirlos es utilizando modelos de *Coarse Grain* que pueden acelerar las simulaciones entre 2,5 a 5 mil veces.³⁰ Para el modelo CG de PCL se usó la estructura del modelo atomístico. Se generaron 3 tipos de *beads* para PCL y una para el agua (Figura 3.). La composición de cada *bead* se especifica en la Tabla 1.

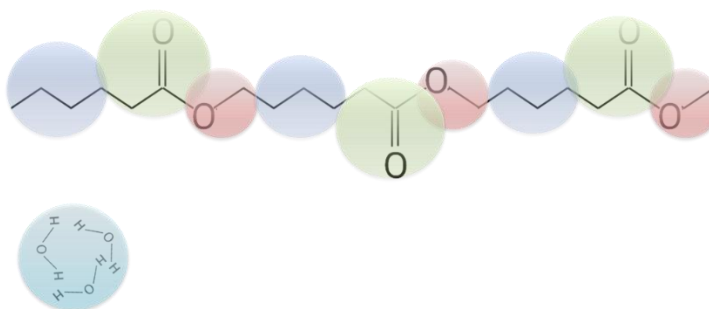


Figura 3. Mapping utilizado para la conversión del modelo atomístico en *Coarse Grain*. Cada residuo de PCL se separó en tres *Beads*. El agua se representó como tres moléculas por *Bead*.

Tabla 1. Detalle de la composición de cada *Bead* utilizada en el modelo *Coarse Grain*.

Monómero de CG	Estructura química
S	$CH_3CH_2CH_2CH_2 - / - CH_2CH_2CH_2 -$
A	$-CH_2CO -$
B	$-OCH_2 - / - OCH_3$
W	$(H_2O)_3$

Se requirió modificar el script *backward.py*³¹ para que reconociera los fragmentos del polímero y formara las *beads*. Los valores de la interacciones polímero-polímero y polímero-W son del trabajo de Loverde *et al.*,³² las interacciones W-W son del trabajo de Shinoda *et al.*³³ Se utilizaron dos tipos de interacciones de Lennard-Jones, las LJ 9-6 y las LJ 12-4, las que se describen por la Ecuación 2. y Ecuación 3. respectivamente.

$$U_{LJ}(r) = \frac{27}{4} \varepsilon \left\{ \left(\frac{\sigma}{r} \right)^9 - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^6 \right\}$$

Ecuación 2. Potencial de Lennard-Jones 9-6. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ε es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas.

$$U_{LJ}(r) = \frac{3\sqrt{3}}{2} \varepsilon \left\{ \left(\frac{\sigma}{r} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r} \right)^4 \right\}$$

Ecuación 3. Potencial de Lennard-Jones 12-4. Donde U_{LJ} es el potencial de Lennard-Jones, ε es la profundidad del potencial, σ es la distancia finita en que el potencial entre las partículas es cero y r es la distancia entre las partículas.

Dado que se usaron potenciales de Lennard-Jones distintos a las L J 12-6, el procedimiento es distinto en *Gromacs*. Fue necesario generar tablas y calcular los valores de A y C (Figura 4.) para cada tipo de potencial de Lennard-Jones, en vez de utilizar los valores de σ y ε .

LJ 12-4	LJ 9-6
$A = \frac{3\sqrt{3}}{2} \varepsilon \sigma^{12}$	$A = \frac{27}{4} \cdot \varepsilon \cdot \sigma^9$
$C = \frac{3\sqrt{3}}{2} \varepsilon \sigma^4$	$C = \frac{27}{4} \cdot \varepsilon \cdot \sigma^6$

Figura 4. Ecuaciones utilizadas para calcular las constantes A y C de los potenciales de Lennard-Jones 12-4 y 9-6.

Los valores de σ , ε , A y C de las interacciones no-enlazantes utilizadas en el modelo CG se muestran en la Tabla 2., así como su tipo de potencial de Lennard-Jones.

Tabla 2. Valores de σ , ϵ , A y C de las interacciones no-enlazantes entre las beads utilizadas en el modelo Coarse Grain .

Pares	Tipo	σ (nm)	ϵ (kJ/mol)	C	A
W-S	L J 9-6	0,423	2,13384	0,08251024	0,00624495
S-S	L J 9-6	0,41	2,42672	0,07780842	0,00536263
S-A	L J 9-6	0,48	1,92464	0,15889151	0,01757213
S-B	L J 9-6	0,35	1,29704	0,01609405	0,00069003
A-A	L J 9-6	0,4585	1,962296	0,12305644	0,01186103
A-B	L J 9-6	0,4033	1,8292448	0,05313063	0,00348522
B-B	L J 9-6	0,3713	1,87911808	0,03323591	0,00170131
W-W	L J 12-4	0,4371	3,74468	0,35513201	0,00047319
W-A	L J 12-4	0,4478	1,50624	0,15735568	0,00025442
W-B	L J 12-4	0,395	2,9288	0,18523796	0,00010978

Los parámetros de *Stretching* y *Bending* se encuentran en la Tabla A4. y Tabla A5. respectivamente (ver Anexo III). Las interacciones se limitaron hasta una distancia de 0,15 nm. Se utilizó el termostato *V-rescale* con una constante de acoplamiento de $\tau_T = 1,0$ ps para mantener la temperatura del sistema cercana a 300 K. Para estabilizar la presión a 1 bar, se utilizó el barómetro *Parrinello-Rahman* con una constante de acoplamiento de $\tau_P = 12,0$ ps.

RESULTADOS

Resultados de Eudragit® RS

En busca de nanopartículas de Eudragit® RS (NpERS) para posteriores estudios biológicos, se requirió experimentar distintas variables para generar Nps con una distribución de tamaños monomodal (una población) y monodispersa ($PDI < 0,1$). Esto permite relacionar de manera adecuada los efectos observados en estudios biológicos, con las características como tamaño y potencial zeta. Partículas de distinto tamaño presentan distintos comportamientos de biodistribución, excreción y acumulación entre otros.¹⁰

Estudio de las variables determinantes en la producción de NpERS

Estudios previos sirvieron de base para generar la metodología de mezclado (M1). En esta investigación se estandarizó la velocidad de mezclado, la inyección de la fase solvente sobre la antisolvente, rangos de concentraciones, entre otras variables. Se lograron formulaciones con un tamaño promedio de hasta 50 nm, pero sistemáticamente con alta polidispersión ($PDI > 0,3$) y poblaciones de agregados sobre los 4000 nm. La técnica DLS es simple y rápida, pero el modelo de cálculo detrás ocupa muchas suposiciones, entre ellas la esfericidad de las partículas.^{34,35} No se recomienda informar resultados solo por la técnica DLS sin contrastar la información con técnicas microscópicas, sobre todo para muestras polidispersas y/o con agregados.¹⁰ No fue factible realizar TEM/SEM a cada una de las muestras de este trabajo, por lo que se empleó mayoritariamente la técnica DLS para ver las tendencias generales de todas las variables investigadas. La distribución de tamaños se representó por intensidad para enfatizar la presencia de agregados.³⁶ Las formulaciones con distribuciones de tamaño monomodal observadas por DLS fueron confirmadas por técnicas microscópicas.

Reducción del tamaño promedio y PDI por aumento de la Razón S/A

Para eliminar la población de agregados y reducir la PDI se intentó modificar la razón volumen solvente/antisolvente (razón S/A) utilizadas en el proceso de nanoprecipitación. En la Figura 5. los datos muestran que cuando la razón S/A es entre 2,0/6,0 a 4,0/6,0 existe una pequeña reducción del tamaño promedio y luego a S/A mayores aumenta el tamaño promedio. En general la PDI siempre se encontró cercana a 0,25. Se consideró que una razón S/A de 4,0/6,0 sería la condición óptima, por permitir agregar masas mayores de polímero (mayor volumen de fase orgánica a igual

concentración), sin un aumento del tamaño ni PDI. En el trabajo de Bilati *et al.*⁸ también se modificó la razón S/A desde 0,05 a 0,6 y no encontró un efecto negativo en la formación de Nps de PLGA y PLA, llegando a la conclusión de que esta variable es más modificable que la concentración de la fase solvente para aumentar la concentración de Nps en la suspensión final. El aumento de tamaño promedio sobre la razón 5,0/5,0 se debería a la pérdida de supersaturación y un aumento en el τ_{mix} por el mayor volumen de fase solvente.^{37,38}

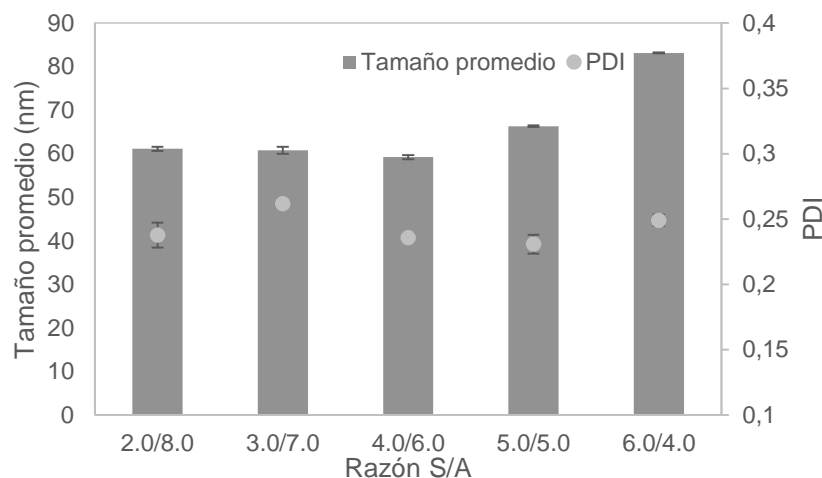


Figura 5. Tamaño promedio y PDI de las NpERS a distinta razón S/A.

Reducción del potencial zeta por parte del agente estabilizante

Se pensó que agregar un agente estabilizante del tipo estérico como P188 podría ayudar a evitar la agregación, como lo visto en Seremeta *et al.*³⁹ donde reportaron NpERS con distribución de tamaños monomodales, en una metodología que poseía un paso de filtrado.

Este experimento consistió en modificar la fase antisolvente a distintas concentraciones de P188, y nanoprecipitar ERS a una misma concentración. Los resultados mostraron que los tamaños promedio y PDI se mantuvieron sin variaciones apreciables. Este efecto fue quizás por una tensión superficial constante ya que todas las muestras se encontraron sobre la concentración micelar crítica de p188 ($1,5 \times 10^{-3}$ g/100 mL).⁴⁰ Bilati *et al.*⁸ observaron que al nanoprecipitar PLA y PLGA no hubo un cambio en los tamaños de partícula. En este trabajo, se observó que la estabilidad de almacenamiento de las NpERS con P188 al 0,5% fue menor al guardar las muestras por un mes; en cambio, las muestras hechas sin P188 permanecieron estables (datos no mostrados).

Al aumentar la concentración de P188 se observó una reducción del potencial zeta como muestra la Figura 6. La estabilización electrostática sería más relevante que la estérica en estas partículas, ERS presenta grupos amonios cuaternarios capaces de estabilizar por si solos las partículas por medio de fuerzas electrostáticas.¹¹ De aquí en adelante se abandonó la utilización de P188 por desestabilizar las partículas, y otras variables fueron estudiadas en busca de eliminar la población de agregados.

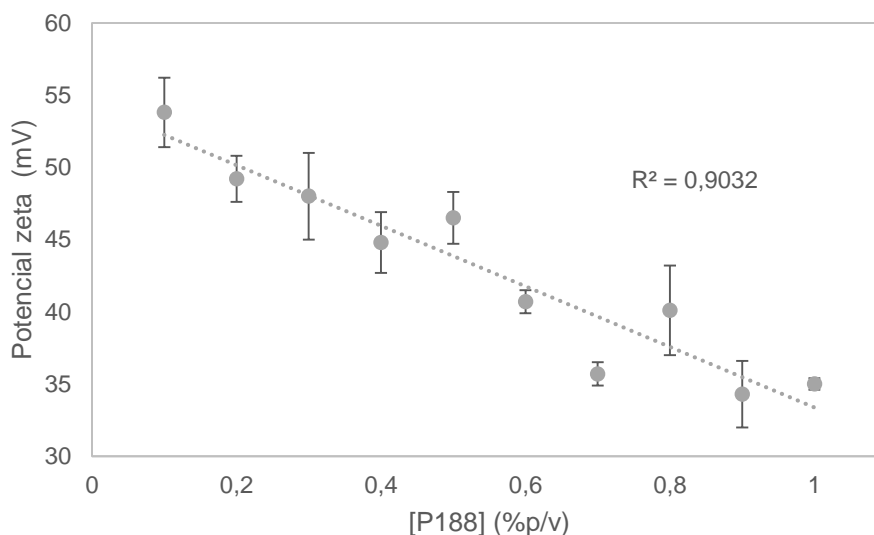


Figura 6. Reducción del potencial Zeta a medida que la concentración de P188 aumenta. Los tamaños y PDI fueron similares en todas las formulaciones (datos no mostrados).

Eliminación de agregados por aumento del flujo de adición y reducción del τ_{mix}

A continuación se investigó si esos agregados se generaban en un primer momento del contacto del solvente con el antisolvente, donde la hidrodinámica es relevante para la transferencia de masas, como se reporta en trabajos de precipitación con antisolvente utilizando fluidos supercríticos,^{41,42} aun cuando este corresponde a un sistema distinto, sus principios son similares a los de este trabajo.

El experimento constó en ver el efecto del diámetro interno de la aguja (DIA) usada para la inyectar solvente sobre el antisolvente. Es importante mencionar que el aparato de la Figura 1. es manual,

en este caso un mayor calibre aumenta la turbulencia que se manifiesta como un flujo continuo al caer el solvente sobre el antisolvente (reduce τ_{mix}) (ver Anexo I). Por el contrario, una reducción se manifiesta como un fino goteo, este flujo discontinuo que enlentece el mezclado (aumenta τ_{mix}). En la Tabla 3. se muestra las velocidades lineales y τ_{mix} al inyectar con diferentes DIA. En el Figura 7. se gráfica el aumento exponencial del τ_{mix} con la reducción del DIA.

Tabla 3. Efecto del Needle Gauge (NG) y su diámetro interno (DIA) en el tiempo de mezclado y la velocidad lineal de la inyección de 4 mL de fase solvente.

NG (G)	DIA (mm)	Volumen fase solvente (mL)	τ_{mix} (s)	Velocidad Lineal (mL/s)
18	0,838	4	1,1 ± 0,1	3,5 ± 0,32
21	0,514	4	2,7 ± 0,4	1,5 ± 0,19
25	0,260	4	6,3 ± 0,3	0,6 ± 0,02
27	0,210	4	13,4 ± 0,5	0,3 ± 0,01

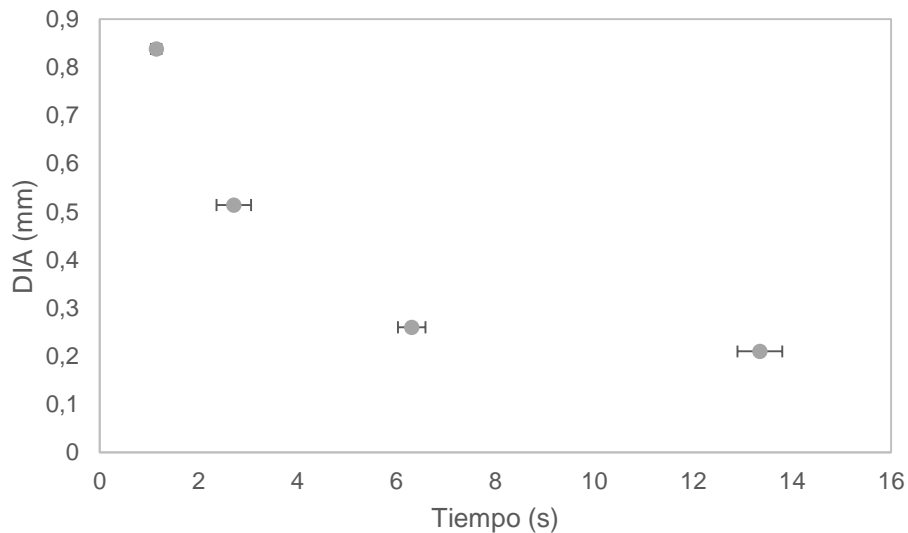


Figura 7. Efecto del DIA en el tiempo de mezclado (ver Anexo I). A medida que se reduce el DIA el tiempo de mezclado es menor.

El resultado del experimento (Figura 8.) mostró que al aumentar el DIA, la población de agregados se redujo hasta su desaparición, aumentando las partículas de la población menor a 100 nm. La población monomodal de NpERS medida por DLS (DIA de 0,838 mm), se confirmó utilizando microscopia electrónica de barrido (Figura 9.), tal como se recomienda en el trabajo de Gaumet *et*

al.¹⁰ En la micrografía se observan NpERS homogéneas con morfología esférica. Esto se debería a que una reducción del τ_{mix} y un flujo turbulento aumentan la transferencia de masa y la consecuente supersaturación homogénea del polímero, aumentando la velocidad del proceso de nucleación, y reduciendo la de agregación y crecimiento.^{9,38,43}

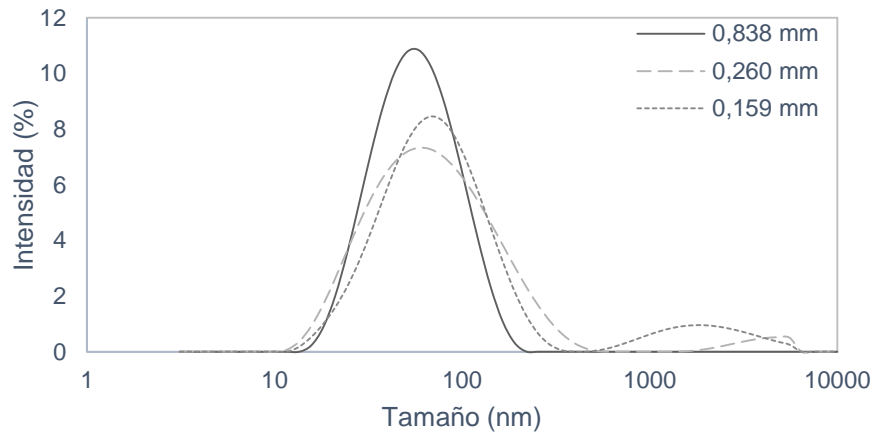


Figura 8. Distribución de tamaño de partículas de NpERS a distintos DIA. Se aprecia que a medida que se aumenta la población de agregados se reduce en tamaño hasta desaparece y aumentar la población de partículas de ~50 nm.

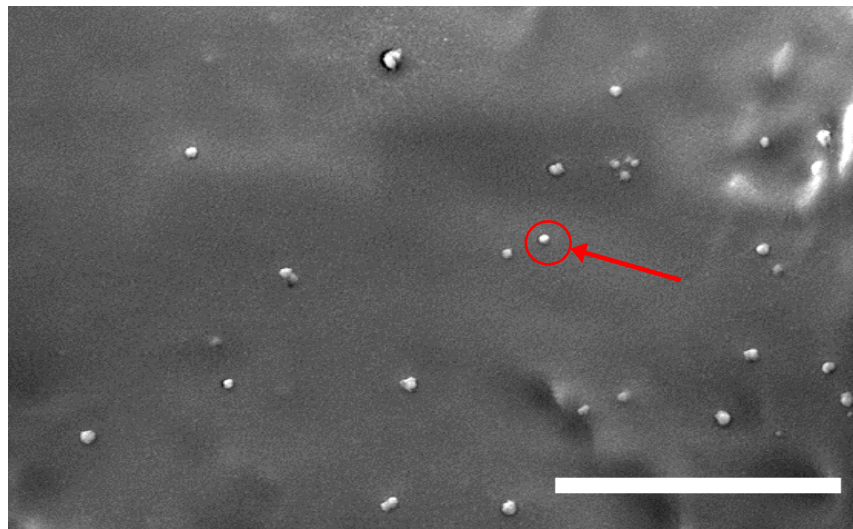


Figura 9. Micrografía SEM de NpERS realizadas con DIA de 0,838. La flecha y círculo rojo destacan una NpERS. La barra blanca representa 2 µm.

Cambios en la metodología de mezclado reduce PDI de las NpERS

Con los resultados de la Figura 8., surgió la idea de verter sin utilizar agujas y se desarrolló la M2. La M3 surge al revisar el trabajo de Tan *et al.*⁴⁴ en el cual agregan la fase solvente sobre la antisolvente.

En la Figura 10. se observa que el utilizar la M1 con calibres mayores (reducción del τ_{mix} y aumento de turbulencia) conduce a una disminución del tamaño promedio y una reducción de la PDI, por un aumento de la supersaturación y velocidad de nucleación. La presión extra lograda a calibres mayores ayudaría a dispersar estos núcleos y reduciría el crecimiento de las partículas.³⁷ Tanto M1 (0,838), M2 y M3 generaron NpERS con distribución de tamaños monomodales.

Cuando se realizó la metodología M2, los tamaños promedio aumentan con una reducción de la PDI, en comparación con la metodología M1 usando la aguja de 0,838 mm (mayor DIA). Utilizando M2 se pierde turbulencia, pero la trayectoria de la transferencia de masas alcanza zonas más profundas dentro de la fase antisolvente con mayor homogeneidad y un bajo τ_{mix} , generando partículas más monodispersas con un tamaño levemente mayor debido a una leve reducción de la supersaturación en comparación con M1. En el caso de M3, existe un aumento gradual de supersaturación a medida que ingresa el medio acuoso sobre el orgánico. El τ_{mix} es mayor que M2 debido a que es necesario verter un volumen mayor (mL fase antisolvente > mL fase solvente). El aumento de la supersaturación es menor que M2, pero aún más homogéneo, conduciendo a partículas más monodispersas y de mayor tamaño que M2.⁴⁴ En otros trabajos que compararon M2 con M3 también se observó una reducción de tamaño y mayor PDI al usar M2; sin embargo, M3 produce una significativa reducción de la PDI a pesar del aumento de tamaño.^{44,45}

El principal problema de las metodologías M2 y M3 es el aumento de variabilidad entre lotes (datos no mostrados) por una mayor dependencia del proceso con el operario.

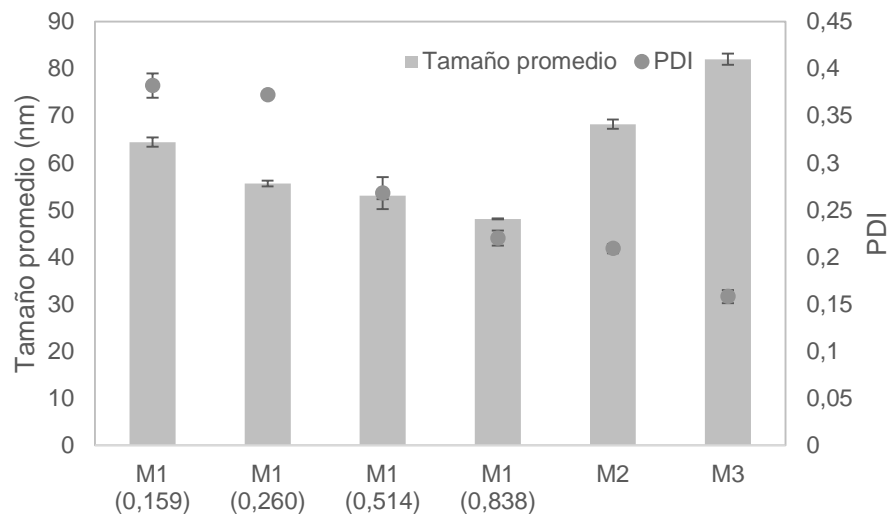


Figura 10. Tamaño promedio y PDI a distintas metodologías. Se observa que a medida que el DIA con M1 se reduce el tamaño promedio y PDI. La M2 Y M3 a pesar que aumentan el tamaño promedio por perder turbulencia, reducen la PDI por una dispersión del solvente más homogénea en una escala de tiempo menor. Sólo M1 (0,838), M2 y M3 fueron monomodales.

Reducción de la PDI por aumento de la concentración de ERS

Una vez lograda la obtención de una distribución de tamaños monomodal, el siguiente objetivo fue observar el efecto de la concentración de ERS en la producción de NpERS, que junto a la razón S/A son variables relevantes para el límite de Ouzo (ver Anexo I).⁴⁶ La variación en la concentración de ERS también incorpora el efecto de la viscosidad en la fase solvente, su resistencia a la transferencia de masa, y la supersaturación lograda en el momento de la nanoprecipitación.⁴⁷

En el experimento se hizo un barrido de la concentración de ERS entre 5-40 mg/mL. En la Figura 11. se observa cómo cambia la distribución de tamaños a diferentes concentraciones, se aprecia en la figura que luego de cierta concentración el proceso de nanoprecipitación conduce a la formación de partículas homogéneas sin la presencia de agregados. Luego de 20 mg/mL la distribución de tamaños es similar hasta 40 mg/mL.

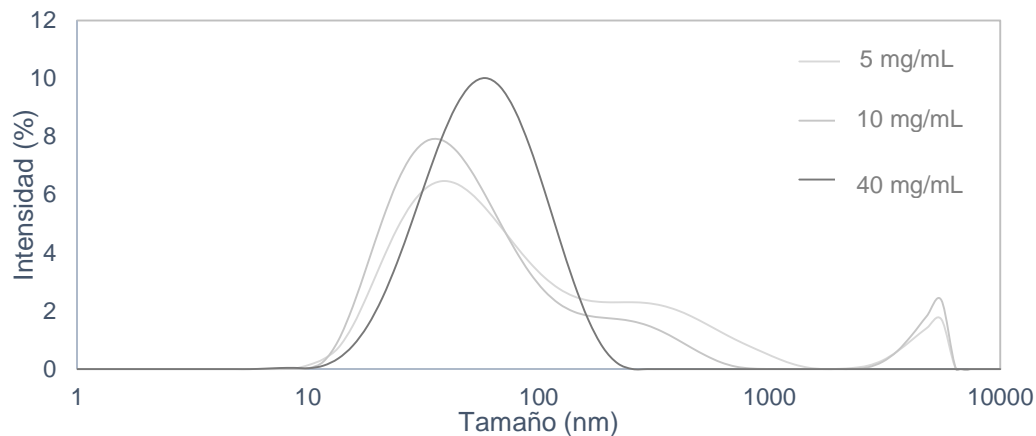


Figura 11. Distribución de tamaños de NpERS a distintas concentraciones del polímero. Se observa que a medida que aumenta la concentración las poblaciones de agregados se van reduciendo y forman una distribución de tamaños monomodal. El perfil de 40mg/mL es similar a los logrados después de 20 mg/mL, por razones de la representación gráfica se omiten.

En la Figura 12. Los datos muestran que el tamaño promedio siempre se encuentra entre los 40 a 60 nm sin grandes cambios, a pesar de la distribución de tamaños distinta (Figura 11.). Es relevante reportar la distribución de tamaños de partícula, ya que guiarse sólo por la información de tamaño promedio puede conducir a conclusiones erróneas.¹⁰ La PDI se reduce por la desaparición de los agregados luego de los 20 mg/mL, pasando de una distribución bimodal a una monomodal. Este cambio en la distribución de tamaños se debería a que se alcanzó la concentración lo suficientemente alta como para separar los procesos de nucleación y crecimiento por un aumento en la supersaturación, sin tener un efecto negativo en la difusión de las cadenas poliméricas por un aumento de la viscosidad. Lepeltier *et al.*⁹ reportó que en un bajo τ_{mix} , los tamaños tienen a hacerse independientes de la concentración del polímero. Trabajos que utilizan diagramas de fases como el de Stainmesse *et al.*⁴⁸ presentan el mismo comportamiento.

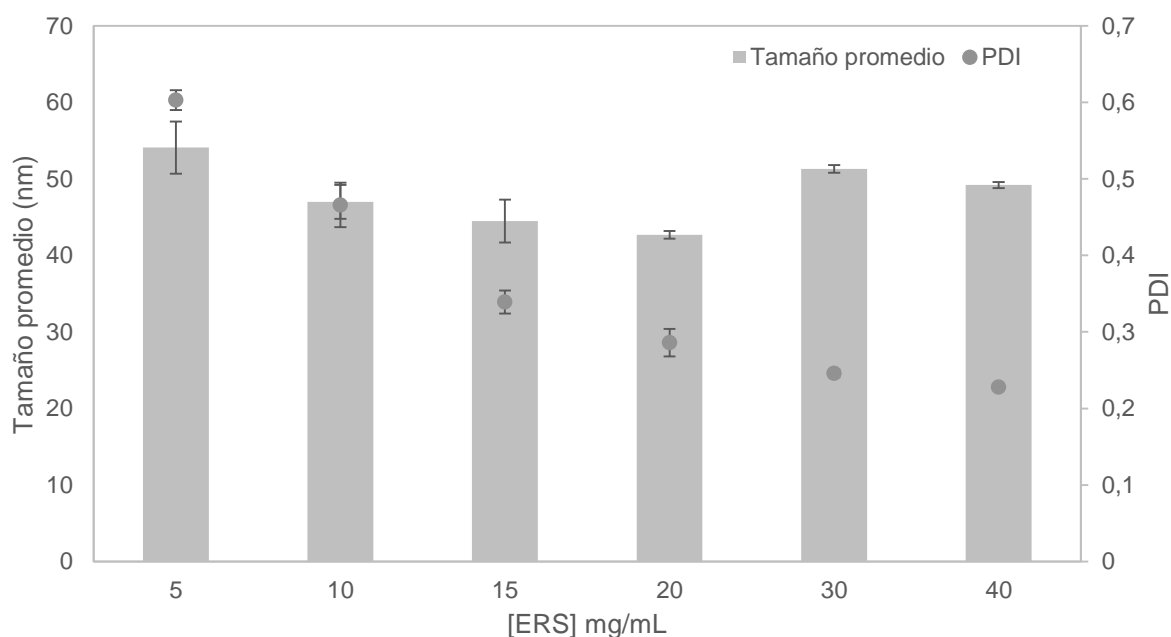


Figura 12. Tamaño promedio y PDI a distintas concentraciones de ERS. Se aprecia que el tamaño promedio no varía apreciablemente en el rango estudiado, a pesar que las distribuciones de tamaño son muy diferentes.

Mezcla de solvente reduce el tamaño de partícula y PDI

Luego de ver el efecto de la concentración del polímero en las NpERS obtenidas, se decidió determinar la relevancia del solvente utilizado en el proceso de nanoprecipitación. Según Galindo-Rodriguez *et al.*⁴⁹ las interacciones entre la fase solvente y antisolvente afectan en las características de las nanopartículas obtenidas, formas de cuantificar esa interacción pueden ser la $\Delta\delta_{S-A}$ (Ecuación A8.) y el χ_{S-A} (Ecuación A9.). A menor valor de ambos, se esperaría una mayor interacción entre el solvente y antisolvente, manifestándose como una mayor miscibilidad y una mejor difusión del solvente en el antisolvente.

En los experimentos hasta ahora mencionados la fase solvente usada fue acetona, que posee una $\Delta\delta_{S-A}$ de 34,4 MPa^{1/2} calculada por la Ecuación A8. (Tabla 4.). Se probó metanol, solvente en el cual ERS es soluble y que posee un menor $\Delta\delta_{S-A}$ (22,5 MPa^{1/2}). Se realizaron mezclas con acetona en distintas proporciones, a una concentración de ERS de 20 mg/mL. No se intentó trabajar a mayores concentraciones de ERS, debido a que posee una menor solubilidad en metanol. El experimento se realizó utilizando la metodología de mezclado M2.

Tabla 4. Volumen molar de los solventes y valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción. Los datos utilizados para los cálculos provienen de Van Krevelen et al.⁵⁰

Solvente	V_{s^1} (cm^3/mol)	δ^1 ($\text{MPa}^{1/2}$)	χ_{s-A}	$\Delta\delta_{s-A}$ ($\text{MPa}^{1/2}$)
Acetona	73,3	20,25	22,78	34,37
Metanol	52,4	29,45	7,28	22,50
Agua	18	48	-	-

Se aprecia en la Figura 13. que metanol reduce el tamaño promedio de las NpERS, por su menor $\Delta\delta_{s-A}$ y χ_{s-A} (Tabla 4.). Esto se traduce en que metanol difunde más rápido en el agua, lo que concuerda al comparar la Razón de Intercambio (R) calculada con la Ecuación A10, de los sistemas acetona-agua y metanol-agua (Tabla 5.).

Tabla 5. Valores de los coeficientes de difusión mutua y razón de intercambio calculada de los sistemas solvente-agua. (*)Datos extraídos de Derlacki et al.⁵¹ (·) Datos extraídos de Kim et al.⁴⁷

Solvente	D_{s-w} (cm^2/s)	D_{w-s} (cm^2/s)	R
Acetona	$1,040 \times 10^{-5} \cdot$	$6,201 \times 10^{-5} \cdot$	0,1677·
Metanol	$1,563 \times 10^{-5} *$	$2,190 \times 10^{-5} *$	0,7134

La mayor difusión del solvente en el antisolvente arrastra consigo las cadenas poliméricas, aumentando la nucleación, reduciendo el crecimiento y agregación, generando partículas de menor tamaño y más homogéneas.⁹

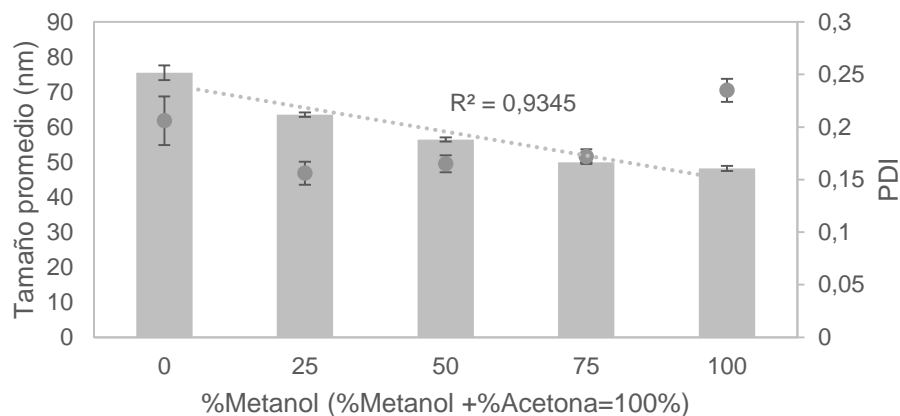


Figura 13. Tamaño promedio y PDI de NpERS a medida que la fase solvente se enriquece en metanol. Se observa que a medida que aumenta el contenido de metanol el tamaño de partícula es menor. El último punto tiene un aumento significativo de PDI porque ERS no es totalmente soluble y se nanoprecipitó utilizando una dispersión opaca.

Otras variables investigadas

Se modificó la razón S/A variando solamente el volumen de agua (volumen fase solvente constante). El mayor volumen de antisolvente permitió aumentar la velocidad de agitación usando M1 a razón S/A de 4,0/6,0; 4,0/8,0 y 4,0/10,0 con velocidades de 550, 650 y 800 rpm respectivamente. Los tamaños obtenidos en el rango de estudiado son prácticamente los mismos, pero la PDI tuvo una pequeña disminución de 0,239 a 0,185 a partir de la razón 4,0/8,0. En el mismo rango hubo una modesta reducción del potencial zeta de 5 mV, probablemente por la mayor dilución del medio. Lo más relevante es que se redujo la probabilidad de aparición de agregados al aumentar el volumen de antisolvente, por un aumento de la supersaturación.

También en la misma línea se estudió el efecto de nanoprecipitar a distintas temperaturas, se probó con las temperaturas de 4, 20 y 50°C. Solo se observó diferencias notables a los 50°C donde las partículas fueron 20 nm más grande, con una PDI de 0,22 a 0,167 y un leve aumento en el potencial zeta de aproximadamente 5 mV.

Resultados de Eudragit® RL

Estudio de las variables determinantes en la producción de NpERL

Continuando el trabajo previo de generación de nanopartículas poliméricas monodispersas por el método de nanoprecipitación, se probó utilizar el polímero ERL. Este polímero es prácticamente idéntico a ERS, salvo por que el grupo amonio cuaternario se encuentra en doble proporción en la unidad monomérica de la Figura 14.

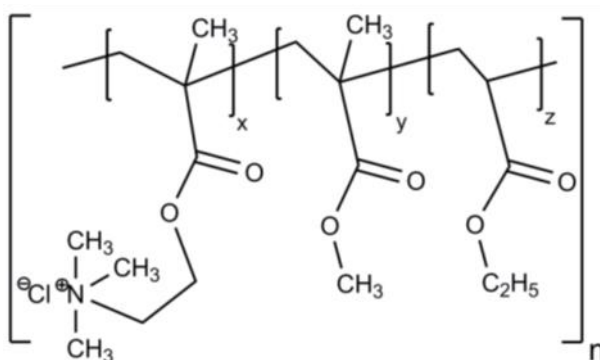


Figura 14. Estructura de ERS/ERL, ambos polímeros poseen el peso molecular de 32.000 g/mol. Se diferencian en la proporción de los grupos $x : y : z$, ERS posee una proporción de 0,1 : 2 : 1, mientras que ERL es 0,2 : 2 : 1.

Al extrapolar la metodología desarrollada para ERS, se probó el efecto de la razón S/A, concentración de ERL, DIA, metodología de mezclado, velocidad de agitación y concentración de agente estabilizante (P188 y P407). En cada uno de los experimentos desarrollados, las tendencias fueron similares a las logradas con ERS; sin embargo, las NpERL fueron entre 5 a 15 nm más pequeñas que las NpERS. Trabajos como el de Legrand *et al.*² observaron que mientras mayor sea la hidrofilia de un polímero, menor es el tamaño de partícula.

La diferencia más notable de ERL con respecto a ERS, es la concentración en la cual se forma una distribución de tamaños monomodal. ERS alcanzó esta distribución a los 20 mg/mL (Figura 11.), en cambio ERL recién a los 40 mg/mL presenta una sola población de partículas como muestra la Figura 15. El polímero ERL por poseer mayor cantidad de grupos amonio cuaternario (mayor hidrofilia), interaccionaría más con la fase antisolvente y requeriría concentraciones mayores para alcanzar una supersaturación adecuada.

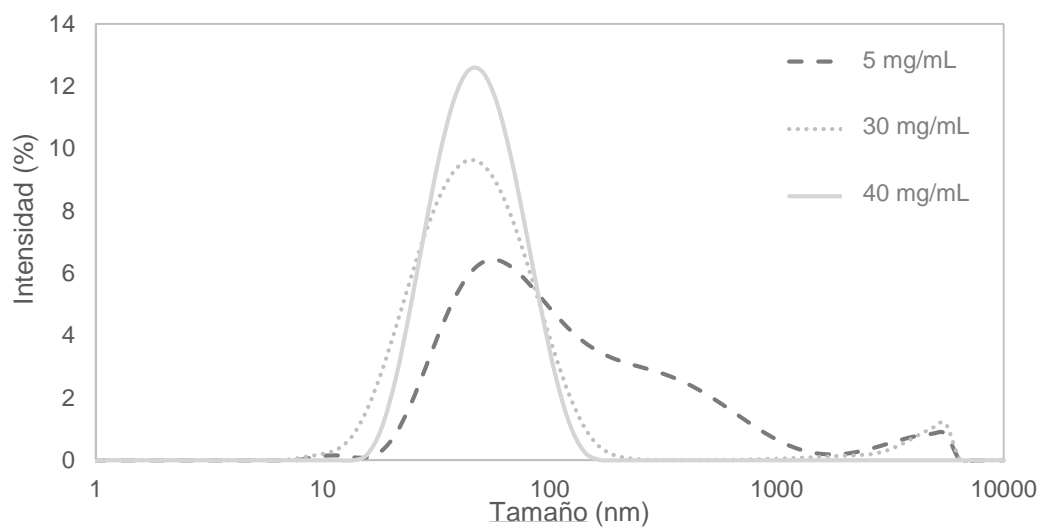


Figura 15. Distribución de tamaños de NpERL a distintas concentraciones del polímero. Se observa que a medida que aumenta la concentración las poblaciones de agregados se van reduciendo y se forma una distribución de tamaños monomodal a los 40mg/mL de ERL.

Resultados de Policaprolactona

Estudio de las variables determinantes en la producción de NpPCL

Generadas las nanopartículas poliméricas monomodales de los polímeros ERS y ERL, se utilizó el polímero policaprolactona (PCL) por ser neutro, biodegradable y biocompatible¹⁴ a diferencia de ERS/ERL. Al extrapolar la metodología desarrollada para ERS, se generaron agregados y poblaciones polidispersas. Se experimentó variando la concentración de PCL y razón S/A, pero sistemáticamente se generaron agregados visiblemente apreciables (AVAS) no medibles por DLS, concepto que se puede relacionar con el de “rendimiento de fabricación” en literatura.^{2,48,49,52,53} Un aumento de AVAS implica una menor cantidad de nanopartículas (menor rendimiento de fabricación) generadas en el proceso de nanoprecipitación.

Aumento del tamaño por Razón S/A creciente

Se observó que un aumento en la razón S/A aumentó el tamaño promedio de las NpPCL a una concentración de 1 mg/mL (Figura 16.) producto de una reducción en la supersaturación y un aumento del τ_{mix} .^{37,38} (ver Anexo I). Se eligieron la razón S/A de 0,125 y 0,5 para comparar el efecto a distintas concentraciones por presentar el menor tamaño y PDI respectivamente. Se aprecia en la (Figura 17.) que a medida que aumenta la concentración de PCL, la diferencia de tamaño entre ambas razones S/A se va reduciendo porque la pérdida de supersaturación por el aumento de la razón S/A se compensa con el aumento de la concentración del polímero. En concentraciones mayores los agregados no se pueden eliminar a pesar de una disminución de la razón S/A.²

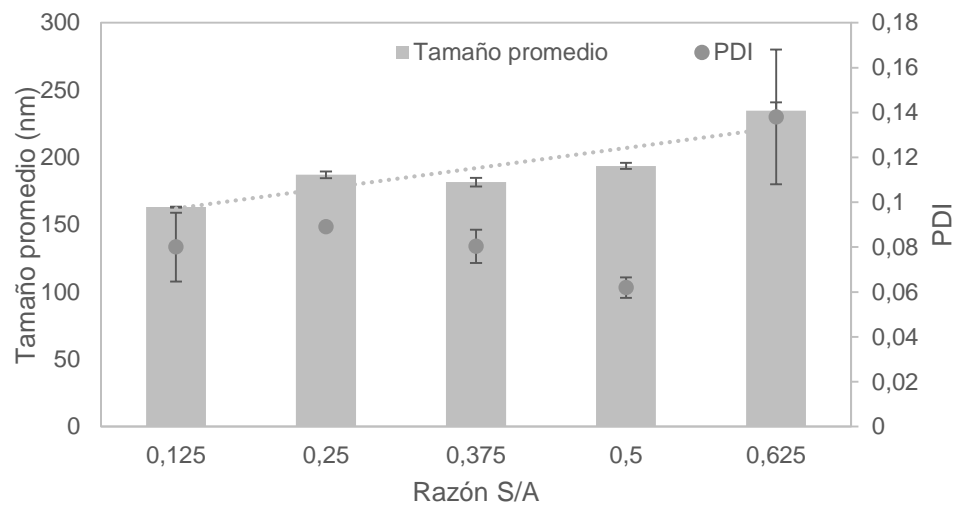


Figura 16. Tamaño promedio de NpPCL a distintas razones S/A.

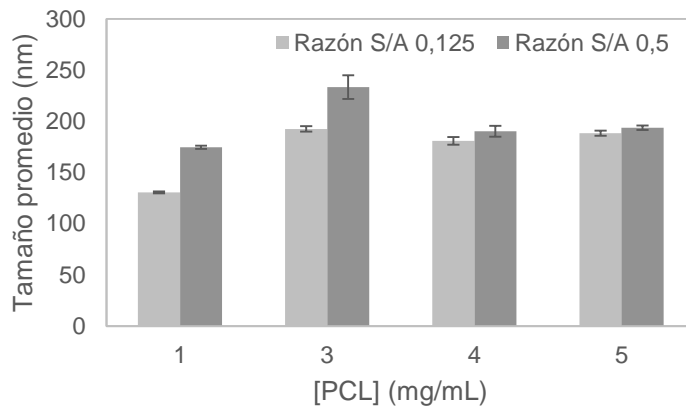


Figura 17. Comparación del tamaño promedio de NpPCL a distintas razones S/A variando la concentración de PCL.

Efecto del diámetro interno de la aguja en Tamaño y PDI

Al igual que en ERS se probó con diferentes DIA para inyectar la fase solvente. La variación del DIA influye en la turbulencia y τ_{mix} ,^{37,38} pudiendo modificar la morfología, tamaño de partícula y polidispersión.⁴¹

En la Figura 18. se aprecia el efecto de la variación del DIA utilizando PCL a 6 mg/mL en acetoneitrilo. Una reducción de DIA provocó una disminución del tamaño promedio, efecto similar

al observado en el trabajo de Lengsfeld *et al.*⁴² Sin embargo, aumentó el tamaño de los AVAS con la consecuente reducción del rendimiento de fabricación, lo que originó suspensiones menos opalescentes. Al igual que con ERS, el DIA de 0,838 mm se escogió para los experimentos posteriores por generar una menor cantidad de AVAS.

Este aumento en la polidispersión (no observable por DLS) al reducir el DIA, es producto de un aumento del τ_{mix} , y una reducción de la supersaturación y turbulencia.^{39,54}

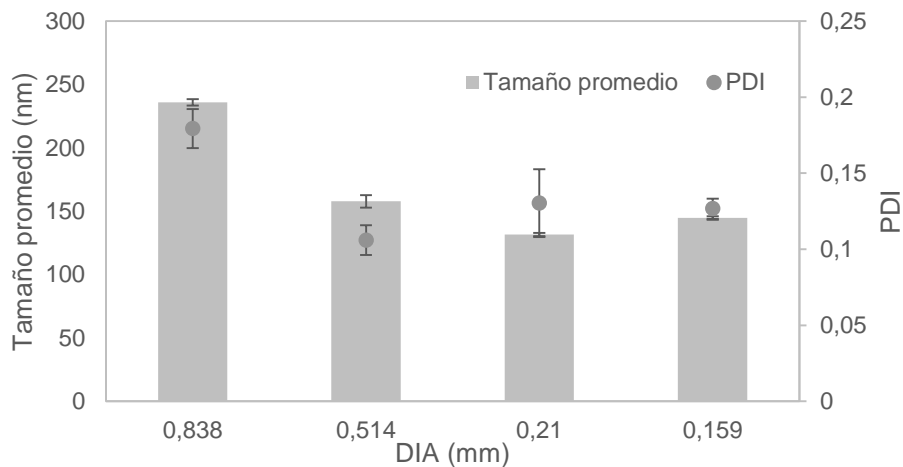


Figura 18. Efecto del diámetro interno de la aguja (DIA) en el tamaño y PDI de las NpPCL.

El uso de un agente estabilizante adecuado produce NpPCL monodispersas

A diferencia de ERS, PCL no presenta grupos cargados que otorguen estabilidad electrostática al coloide. Todas las muestras realizadas generaron partículas con bajo potencial zeta (-5 mV) y con grandes agregados que fueron imposibles de evaluar por DLS (el equipo reportó PDI < 0,1, a pesar de los agregados). Estos potenciales no son recomendados para almacenamiento, Mohanraj *et al.*⁵⁵ recomiendan potenciales con magnitud superior a los 30 mV para una adecuada estabilidad coloidal. La elección del agente estabilizante adecuado aumentaría el τ_{precip} y reduciría el Da (Ecuación A6.), aumentando la supersaturación y velocidad de nucleación en relación a la velocidad de crecimiento. Se decidió agregar agentes estabilizantes de tipo estérico y del tipo iónico (Figura 19.).

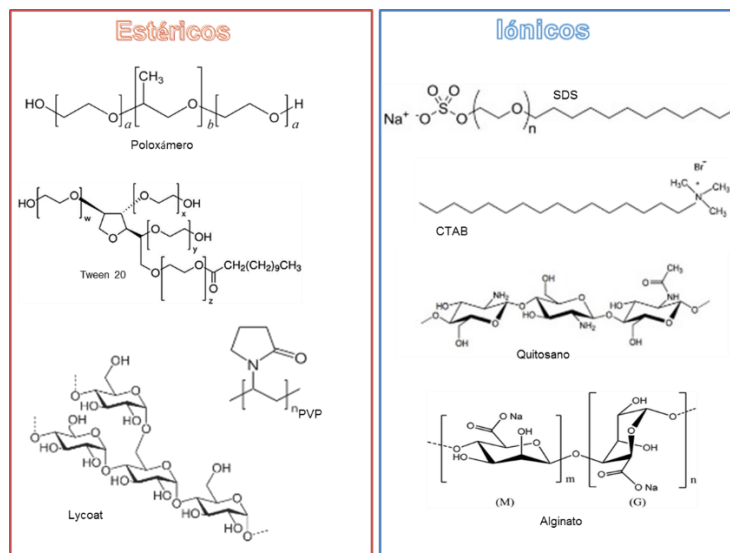


Figura 19. Estructuras moleculares de los agentes estabilizantes de tipo estérico y de tipo iónico utilizados para estabilizar las NpPCL.

Se observó que los agentes estabilizantes de tipo estérico (P188, P407, PVP y Tween 20) fueron incapaces de estabilizar las NpPCL realizadas con una concentración de PCL de 1 mg/mL en acetona. En el trabajo de Molpeceres *et al.*⁵⁴ utilizaron P188 para estabilizar NpPCL. En su metodología, los autores diluían las muestras antes de medir y reportaron partículas monodispersas con PDI menores a 0,1, sin mostrar la distribución de tamaños de partícula ni potencial zeta. Resultados similares se obtuvieron en este trabajo al medir por DLS luego de separar los AVAS.

Solamente el estabilizante estérico Lycoat (un almidón modificado) logró generar partículas monodispersas a la concentración investigada. Posiblemente porque las partículas generadas poseían un potencial zeta aproximado de -20 mV.

Al utilizar los agentes estabilizantes de tipo iónico, quitosano generó un notable aumento de los agregados sobre los 1000 nm (población mayoritaria) y un aumento de la PDI > 0,3. Alginato, otro polisacárido logró eliminar los agregados de PCL. Al igual que quitosano se observó un aumento del tamaño promedio y PDI al aumentar la concentración. Aumentó el tamaño promedio desde los 100 nm hasta los 220 nm al aumentar la concentración desde los 0,02 a 0,2% p/v (datos no mostrados). Ambos polímeros aumentaron la PDI con un incremento en la concentración del agente estabilizante como muestra la Figura 20. Estos resultados se explican por el aumento de la

viscosidad de la fase antisolvente que produce un polímero de gran peso molecular como quitosano y alginato.³⁸ Este aumento de la viscosidad dificulta la velocidad de difusión del solvente y de las cadenas poliméricas de PCL.⁵⁶

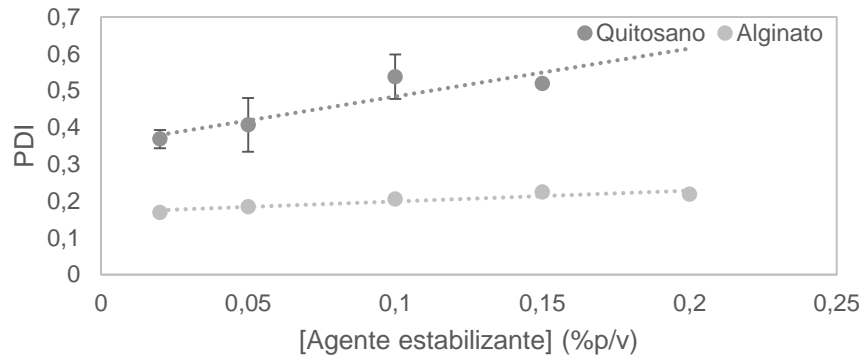


Figura 20. Efecto de la concentración de quitosano y alginato en la PDI. Un aumento en la concentración, aumenta la PDI, por un incremento en la viscosidad de la fase antisolvente.

Los estabilizantes CTAB y SDS, detergentes de tipo iónico, fueron eficaces en eliminar los agregados visibles, reducir el tamaño promedio y PDI. De ambos estabilizantes SDS tuvo resultados más reproducibles desde concentraciones a 0,05% a 0,5% p/v (Figura 21.), un aumento en la concentración de SDS aumentó la magnitud del potencial zeta, pero el tamaño permaneció constante similar a lo visto en el trabajo de Bilati *et al.*⁸ Una vez estabilizadas las partículas, estas serían independientes de la concentración del agente estabilizante, similar al comportamiento de ERS con P188. El detergente CTAB en cambio, logró eliminar los AVAS, pero en algunas mediciones por DLS aparecieron agregados sobre los 1000 nm (datos no mostrados).

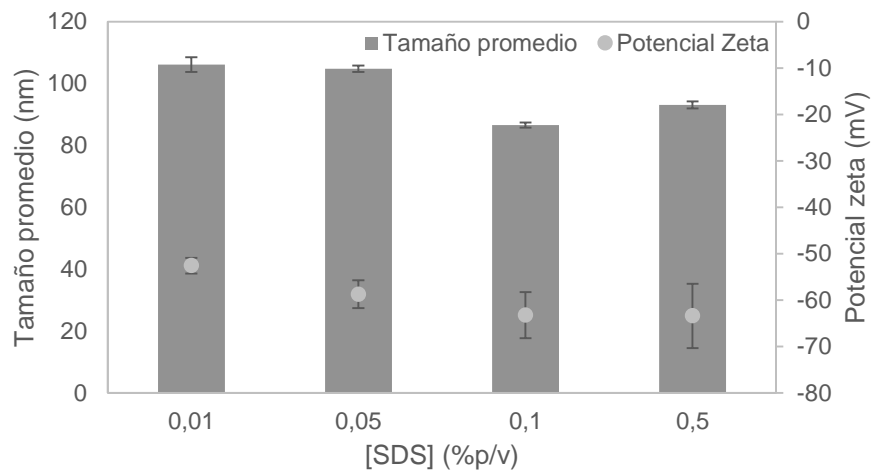


Figura 21. Efecto de la concentración de SDS en el tamaño promedio y potencial zeta. No se observan cambios significativos en los resultados al aumentar la concentración de SDS.

Se decidió probar el mejor resultado de agente estabilizante de tipo iónico y de tipo estérico para nanoprecipitar PCL a 5 mg/mL (concentración 5 veces mayor). Se generaron NpPCL con Lycoat y con SDS, ambos coloides no presentaron AVAS y tuvieron distribuciones de tamaño monomodales en DLS. Al día siguiente de la medición las NpPCL realizadas con Lycoat se encontraron agregadas, probablemente por la baja magnitud de potencial zeta (-20 mV).⁵⁵ Se decidió continuar utilizando SDS a pesar de su toxicidad,⁵⁷ por resultar en distribución de tamaños monodispersas y monomodales. Esto permitió determinar el efecto de modificar variables y sus efectos en tamaño promedio, potencial zeta y PDI.

Se determinó que en el proceso de nanoprecipitación para evitar la agregación de las partículas es relevante la estabilización eléctrica de las partículas en una primera instancia, para reducir las interacciones polímero-polímero en el proceso difusivo de las cadenas, además de evitar la agregación de núcleos ya formados (aumenta τ_{precip})(ver Anexo I).

Efecto de la Razón S/A en NpPCL estabilizadas con SDS

La Figura 22. muestra el efecto de la razón S/A en las NpPCL estabilizadas con SDS y distribución de tamaños monomodal. Se utilizó PCL a una concentración de 1 mg/mL, SDS a 0,5 %p/v y razón S/A creciente. Se determinó que, en el rango estudiado, el aumento en el τ_{precip} por la estabilización de SDS, y el bajo τ_{mix} por la metodología de mezclado hacen la nanoprecipitación

independiente de la razón S/A. En el trabajo de Bilati *et al.*⁸ también modificaron la razón S/A desde 0,05 a 0,6 y no encontraron un efecto negativo en la formación de Nps de PLGA y PLA.

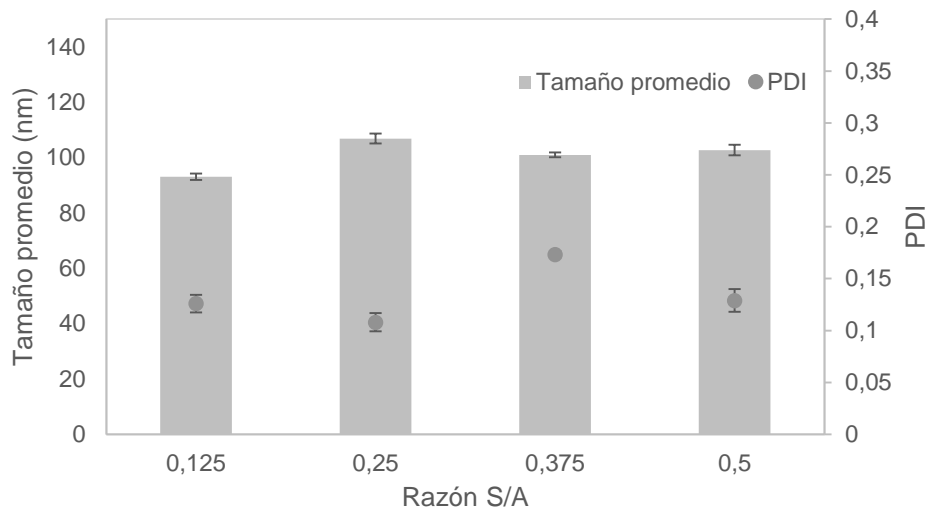


Figura 22. Efecto de la razón S/A en el tamaño promedio y la PDI. Se observa que las variables permanecen constantes con el aumento de la razón S/A.

Efecto de la concentración de la fase solvente en NpPCL estabilizadas con SDS

Se determinó el efecto de la concentración de PCL (Figura 23.), el experimento se realizó utilizando una concentración de SDS al 0,5% p/v y una razón S/A de 0,5. Dado las diferencias tan sutiles en la concentración no se observó un marcado aumento del tamaño promedio con el aumento de la concentración de PCL. Nuevamente un bajo τ_{mix} y un gran τ_{precip} provocaron que los tamaños tiendan a hacerse independientes de la concentración del polímero,⁹ con una leve tendencia al aumento por un aumento en la viscosidad de la fase solvente.⁴⁹ La variabilidad por inyección sería más relevante que el leve aumento en la viscosidad de la fase solvente en la NpPCL resultantes.

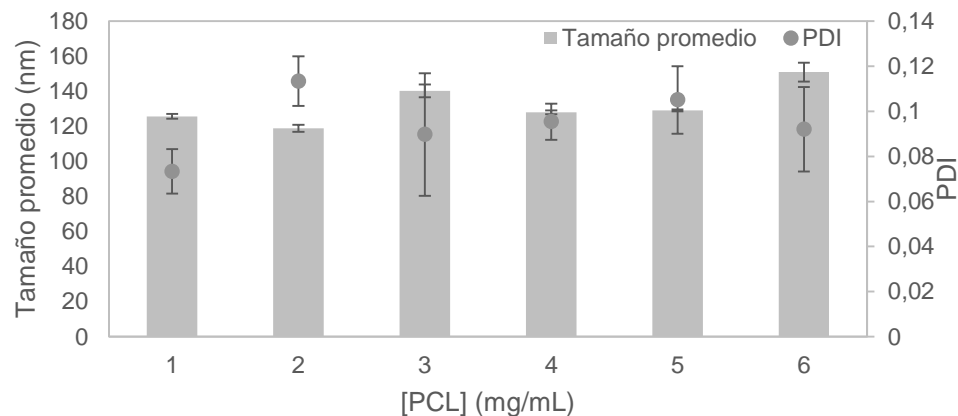


Figura 23. Efecto de la concentración de PCL en la fase solvente en términos de tamaño promedio y PDI. Se observa que no existen grandes variaciones en las concentraciones investigadas.

Efecto de la concentración de la fase solvente a diferente razón S/A en NpPCL estabilizadas con SDS

Se repitió el experimento para determinar el efecto de la razón S/A a distintas concentraciones de PCL. Se utilizó PCL a 1 y 6 mg/mL (Figura 24.), y en todas las razones S/A una mayor concentración condujo a un aumento en el tamaño promedio. El aumento de la concentración incrementaría la viscosidad de la fase solvente, dificultando su difusión a través de la fase antisolvente.^{44,54,56} Se volvió a confirmar que los tamaños tienden a hacerse independientes de la razón S/A con NpPCL estabilizadas a determinada concentración.⁸

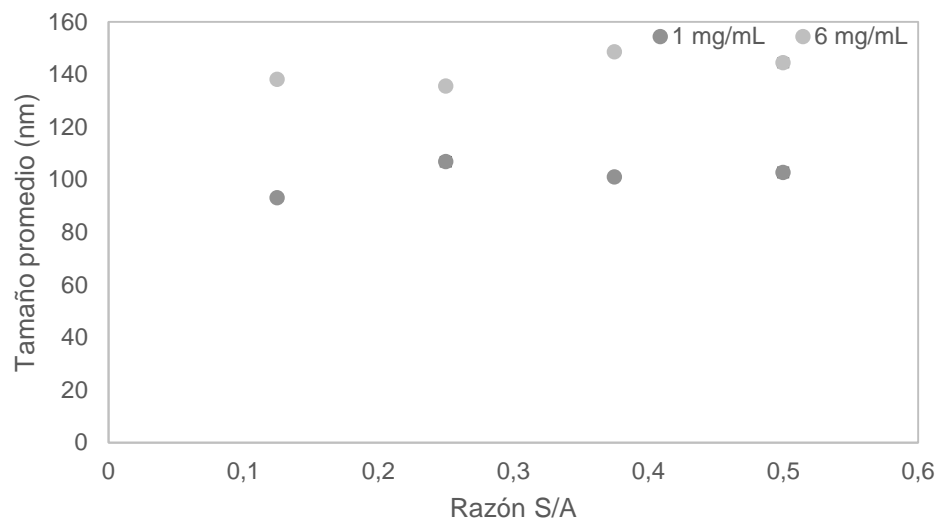


Figura 24. Comparación del efecto de la razón S/A en el tamaño promedio a distintas concentraciones de PCL. Se observa que en todos los casos una mayor concentración provoca un aumento en el tamaño de las partículas.

Efecto del peso molecular de PCL en las NpPCL

Para estudiar el efecto del peso molecular del polímero a precipitar, se comparó con la policaprolactona de 10.000 g/mol (PCL) una de 80.000 g/mol (hPCL). Se utilizó hPCL a una razón S/A de 0,5; con concentraciones de 1 mg/mL hasta 6 mg/mL y SDS con una concentración de 0,5% p/v (Figura 25.). Solamente la concentración PCL a 1 mg/mL generó NpPCL en ausencia de agregados, mientras que a concentraciones mayores se generaron AVAS que incluso eran capaces de recubrir el agitador magnético. A pesar de eso, las mediciones por DLS arrojaron distribuciones de tamaño de partícula monomodales y monodispersas. Se determinó que aumentar la concentración hPCL aumenta el tamaño promedio y PDI de las pocas NphPCL que se formaron. Los AVAS aumentaron y bajó el rendimiento de fabricación, comportamiento similar al observado en los experimentos de Legrand *et al.*² y Bilati *et al.*⁸ En hPCL los cambios de concertación implican una variación considerable de la viscosidad según la ecuación de Mark-Houwink⁵⁰(Ecuación 4.).

$$[\eta] = KM^a$$

Ecuación 4. Ecuación de Mark-Houwink, Donde η es la viscosidad intrínseca, M es el peso molecular del polímero, a y K son los parámetros de Mark-Houwink, que dependen del sistema polímero-solvente y de la temperatura.

De la ecuación se deduce que un aumento en la masa molecular del polímero conlleva un aumento en la viscosidad de la fase solvente a igual concentración de PCL y hPCL. Legrand *et al.*² utilizando ácido poliláctico (PLA) observó que un aumento del peso molecular conduce a un aumento de la viscosidad, y mientras mayor sea el peso molecular, el incremento de la viscosidad es más pronunciado al aumentar la concentración del polímero.

El aumento de la concentración provocaría que en el proceso de difusión, las cadenas poliméricas tiendan a mantenerse asociadas por un aumento de las interacciones polímero-polímero, aumentando el tamaño de las partículas.⁴⁹

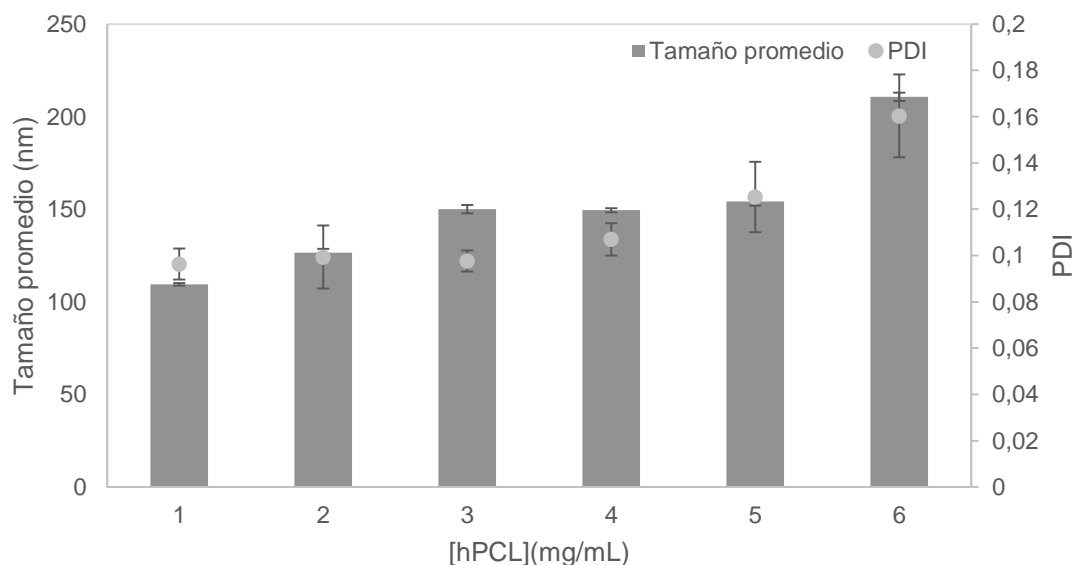


Figura 25. Efecto de la concentración de hPCL en el tamaño promedio y PDI. Se observa que un aumento en la concentración provoca un marcado aumento de ambas variables. Solamente la formulación de 1 mg/mL no presentó AVAS.

Se intentó reducir la razón S/A utilizando hPCL a 6 mg/mL (Figura 26.). Al reducir la razón S/A desde 0,5 se observó una reducción del tamaño promedio a un valor aproximadamente constante, posiblemente por la viscosidad constante de la fase solvente. La cantidad de AVAS aumentó al incrementar la razón S/A, por un aumento de la masa de polímero.

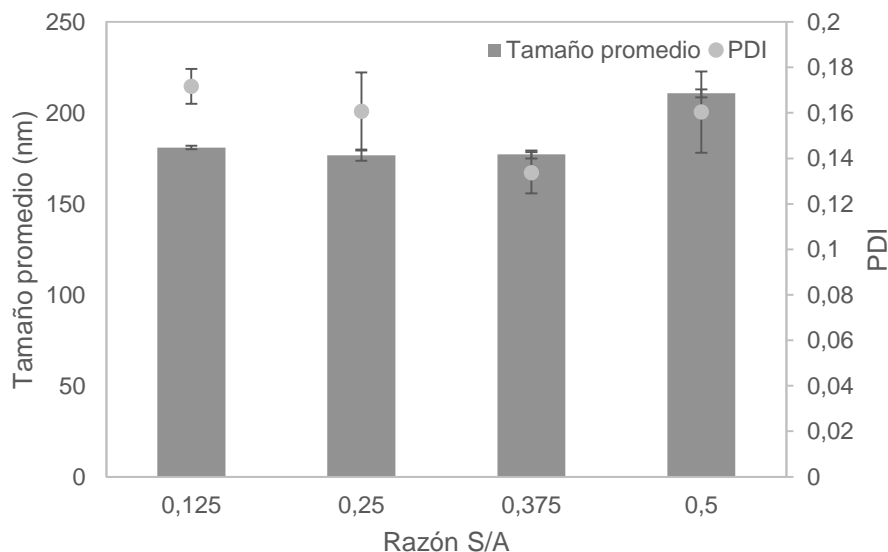


Figura 26. Efecto de la Razón S/A en tamaño de partícula y PDI de las NphPCL, utilizando una concentración de 6 mg/mL del polímero. Se observa que solamente a 0,5 el tamaño varía de forma apreciable. Todas las formulaciones presentaron AVAS

Se concluyó que hPCL no es apta para formar NphPCL con altos rendimientos utilizando la metodología propuesta. El trabajo de Stepanyan *et al.*³⁸ también observó una fuerte dependencia del tamaño de partícula en relación al peso molecular de la PCL. Legrand *et al.*² determinó que una baja hidrofiliicidad (extremo carboxílico de la cadena) en las cadenas poliméricas de PLA de mayor peso molecular, impide la formación de sistemas nanodispersos y conduce a la formación de agregados, incluso a bajas concentraciones. Además, los autores reportaron que utilizando PLA del mismo peso molecular, pero con los extremos carboxilos esterificados, el tamaño aumenta al doble al nanoprecipitar. Del experimento se concluye que las cargas facilitarían la interacción con la fase solvente. Bilati *et al.*⁸ al comparar PLGA y PLA llegó a la misma conclusión, en todos los casos las partículas de mayor tamaño fueron las del polímero más hidrofóbico (PLA).

El elevado peso molecular y la ausencia de cargas dificultarían el proceso de difusión generando grandes agregados, las interacciones Van der Waals entre las cadenas poliméricas serían muy fuertes y tenderían a agruparse. En cambio, al nanoprecipitar ERS existe una repulsión entre las cadenas poliméricas por encontrarse ionizadas, facilitando su separación, difusión y formación de núcleos. La variable peso molecular por sí sola no determinaría la formación de agregados. En un estudio fuera del objetivo principal de este trabajo, se utilizó la metodología para formar Nps de los polímeros aniónicos Eudragit® L, Eudragit® S y Eudragit® L 100-55, con pesos moleculares

de 125.000, 125.000 y 320.000 g/mol respectivamente. Todos los polímeros formaron Nps monodispersas y monomodales, a pesar de tener pesos moleculares mayores que NphPCL (80.000 g/mol).

Efecto de la composición de la fase solvente en las NpPCL

Se realizó un experimento para determinar la influencia de la composición de la fase solvente. Se disolvió PCL en acetona, acetonitrilo y mezclas de ambos solventes (Figura 27.). Se inyectó PCL a una concentración de 1 mg/mL y una razón S/A de 0,125. Se observa que a medida que la fase solvente se enriquece en acetonitrilo existe una leve disminución de la PDI y el tamaño permanece constante.

Se observa que los valores de $\Delta\delta_{S-A}$ y χ_{S-A} del sistema acetonitrilo-agua (Tabla 6.) son menores que del sistema acetona-agua. Esto se traduce en que acetonitrilo difunde más rápido por el agua, lo que conlleva al comparar la Razón de Intercambio (R) calculada con la Ecuación A10. de los sistemas solvente-agua (Tabla 7.). Pareciera que $\Delta\delta_{S-A}$ es más relevante para explicar los resultados que χ_{S-A} . La diferencia de $\Delta\delta_{S-A}$ de los sistemas acetonitrilo-agua y acetona-agua es tan baja, que explicaría el leve efecto en la reducción de la PDI sin una variación apreciable del tamaño. Se calculó el parámetro de interacción polímero-solvente (χ_{P-S}) para determinar si tiene un efecto como en los trabajos de Choi *et al.*⁵⁸ y Kim *et al.*⁴⁷ En la Tabla 8. se observa que la afinidad de PCL es mayor con acetona que con acetonitrilo, una mayor interacción provocaría tamaños mayores porque parte del solvente queda dentro de la nanopartículas. En este caso el efecto es modesto y se concluye que ambos solventes son intercambiables, lo que ofrece la posibilidad de utilizarlos dependiendo de las características fisicoquímicas de la molécula a encapsular.

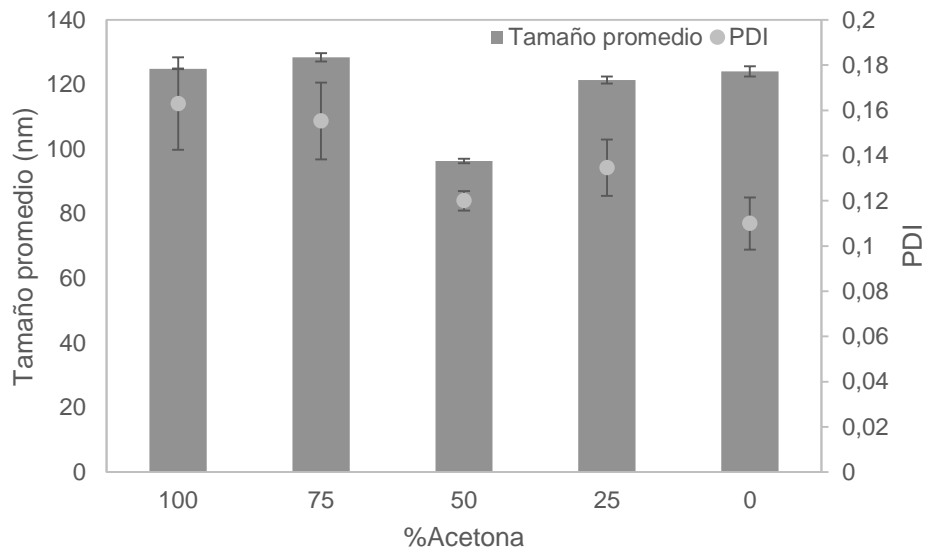


Figura 27. Efecto de la composición de la fase solvente (acetona-acetonitrilo) en el tamaño promedio y PDI de las NpPCL. Se observa que las variables permanecen constantes, excepto a 50% de acetona que podría ser una variación por el método de fabricación.

Tabla 6. Volumen molar de los solventes y valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción solvente-antisolvente. Los Datos utilizados para los cálculos provienen de provenientes de Van Krevelen et al.⁵⁰

Solvente	V_s^t (cm^3/mol)	δ^t ($\text{MPa}^{1/2}$)	χ_{S-A}	$\Delta\delta_{S-A}$ ($\text{MPa}^{1/2}$)
Acetona	73,3	20,25	22,78	34,37
Acetonitrilo	40,4	24,3	9,16	31,22
Agua	18	48	-	-

Tabla 7. Valores de los coeficientes de difusión mutua y razón de intercambio calculada de los sistemas solvente-agua. Datos extraídos de Kim et al.⁴⁷

Solvente	D_{s-w} (cm^2/s)	D_{w-s} (cm^2/s)	R
Acetona	$1,040 \times 10^{-5}$	$6,201 \times 10^{-5}$	0,1677
Acetonitrilo	$1,242 \times 10^{-5}$	$4,753 \times 10^{-5}$	0,2613

Tabla 8. Valores calculados de parámetros de solubilidad e interacción polímero-solvente. Valores se calcularon a partir del trabajo de Bordes et al.¹³

Solvente	χ_{p-s}	$\Delta\delta_{p-s}$ (MPa ^{1/2})
Acetona	0,0089	5,94
Acetonitrilo	0,3450	13,41
Agua	5,8219	37,24

Efecto del DIA en las NpPCL estabilizadas con SDS y acetonitrilo como fase solvente

Con las NpPCL estabilizadas con SDS (población monomodal) y sabiendo que acetonitrilo condujo a tamaños de partícula levemente menores. Se experimentó nuevamente el efecto de modificar el DIA (Figura 28.). Se utilizó una razón S/A de 0,5 y PCL a una concentración de 6 mg/mL en acetonitrilo. Se observó que reducir el DIA provocó una reaparición de los AVAS y su aumento con la medida que disminuía el calibre, mismo comportamiento visto en la Figura 18. Las mediciones por DLS mostraron una reducción del tamaño promedio de las NpPCL y distribuciones de tamaños de partícula nuevamente monodispersas y monomodales.

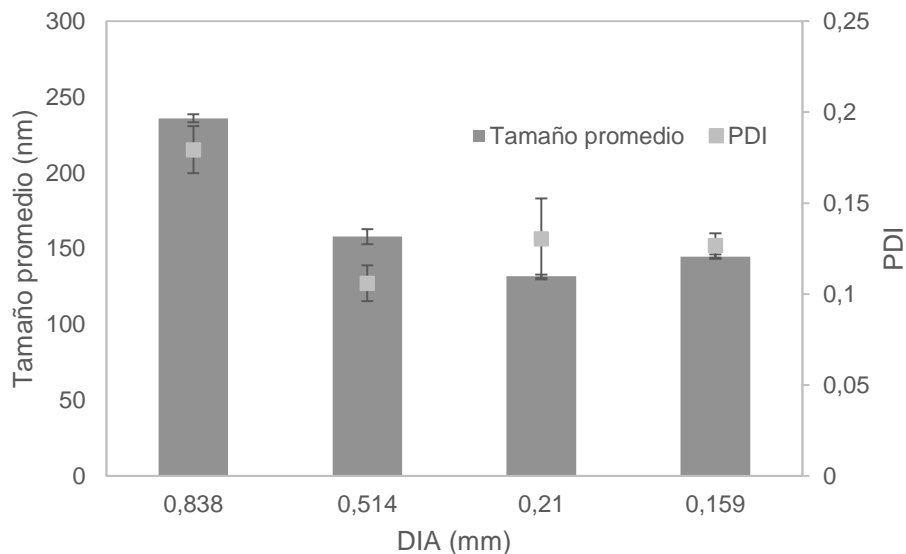


Figura 28. Efecto del DIA en el tamaño de partícula y PDI. Se observa que una reducción en el DIA disminuye el tamaño de partícula, sin embargo aumenta notablemente la aparición de AVAS.

Encapsulación de Fármaco con baja solubilidad acuosa

Una vez generadas las NpPCL con distribución de tamaños monomodal, se procedió a incorporar Loperamida-HCl (Lop) dentro de las NpPCL(NpPCL-Lop). Se utilizó PCL a 5 mg/mL, una razón S/A de 0,5 y concentraciones crecientes de Lop (Figura 29.). Los porcentajes de Lop son en razón al peso del polímero. Un aumento en la concentración de Lop provocó una reducción del tamaño promedio de aproximadamente 50 nm. Esta reducción del tamaño podría deberse a que la carga positiva de Loperamida encapsulada provocaría una compactación al aproximar las cadenas poliméricas a través de sus grupos éster. En el trabajo de Mazzarino *et al.*⁵⁹ también se observa una compactación en NpPCL con curcumina encapsulada, sugirieron que la reducción de 20-30 nm en el tamaño se debió a una mayor interacción entre el fármaco y el polímero en el núcleo de la partícula.

La NpPCL a un 20% de Lop tuvo una eficiencia de encapsulación (EE) de $15,7 \pm 0,5\%$ y un tamaño de 159 ± 11 nm (Figura 30.). La baja EE se explica por la gran concentración de SDS utilizada y su capacidad de solubilizar el fármaco en la fase acuosa, muchos trabajos han reportado que un aumento en la concentración del agente estabilizante reduce la EE.^{54,60,61}

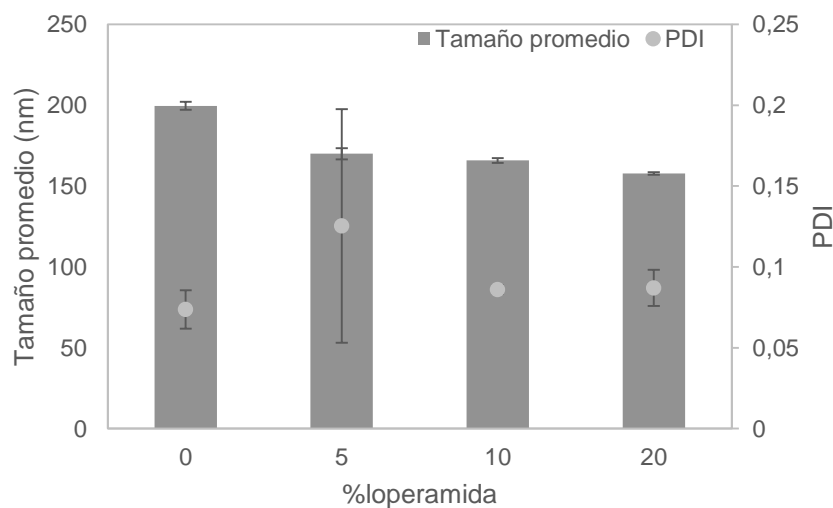


Figura 29. Tamaño promedio y PDI de NpPCL realizadas a distintos porcentajes en peso de loperamida con respecto al peso del polímero. Se observa que al aumentar la cantidad de loperamida existe una disminución del tamaño siempre en condiciones monodispersas ($PDI < 0.1$).

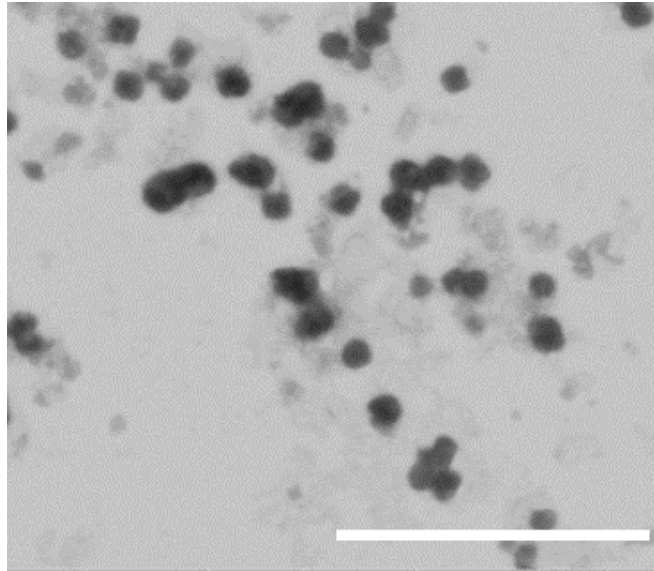


Figura 30. Micrografía TEM de NpPCL-Lop 20%, la barra blanca representa 1 μ m.

Resultados de Dinámica molecular

Se logró hacer un modelo atomístico similar al de Di Pasquale *et al.*,²⁴ donde se comparó el radio de giro promedio al cuadrado $\langle R_g^2 \rangle$, y la distancia *end-to-end* promedio al cuadrado $\langle R_{ee}^2 \rangle$ de ambas PCL-20 rodeadas de agua. Se utilizan los valores al cuadrado porque así fueron reportados por el autor. El radio de giro (R_g) en las partículas representa la distancia desde su superficie hasta su centro de masa, y es proporcional al radio hidrodinámico según Kok y Rudin,⁶² propiedad que en este trabajo se ha utilizado para estimar el tamaño de partícula.

Al comparar el $\langle R_g^2 \rangle$ del modelo de Di Pasquale *et al.*²⁴ con el modelo de este trabajo, en ambos casos se obtuvo un valor de $\langle R_g^2 \rangle$ de 0,60 nm², confirmando una correcta asignación de las cargas en el campo de fuerza

La distancia *end-to-end* $\langle R_{ee} \rangle$ mide la longitud entre los extremos de una cadena polimérica como muestra la Figura 31.

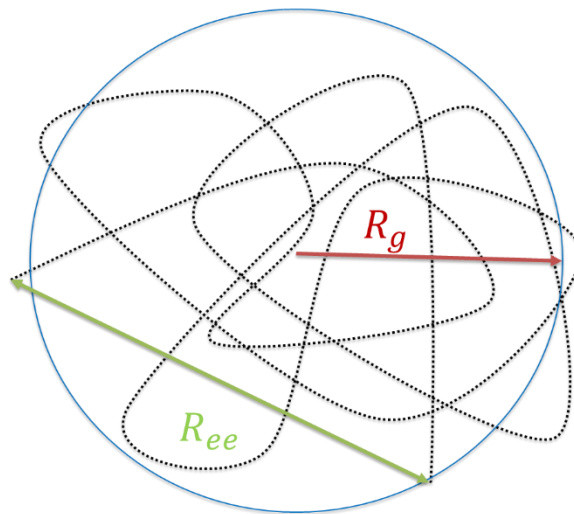


Figura 31. Representación del radio de giro (R_g) y la distancia *end-to-end* $\langle R_{ee} \rangle$ de una cadena polimérica reticulada.

Al comparar el valor de $\langle R_{ee}^2 \rangle$ de Di Pasquale *et al.*²⁴ su valor se encuentra en 2,16 nm², versus los 1,28 nm² que se obtuvieron en este trabajo, diferencia menor si se calcula la raíz cuadrada.

La diferencia de $\langle R_{ee}^2 \rangle$ se debe a la utilización de unidades monoméricas distintas como muestra la Figura 32. En este trabajo la unidad monomérica utilizada comienza con una cadena alquílica a diferencia del modelo de Di Pasquale *et al.*²⁴ que comienza con un metoxi, grupo con mayor polaridad. Modificar los extremos de una misma cadena polimérica pueden provocar un cambio en las propiedades del polímero (e.g. temperatura de transición vítrea), por una modificación de las interacciones no-enlazantes.⁶³ En este caso los extremos representan una pequeña parte del sistema y por ello $\langle R_g^2 \rangle$ permanece constante, la diferencia de polaridad de los extremos explicaría la diferencia de $\langle R_{ee}^2 \rangle$, un extremo menos polar tendería a ubicarse más al centro de la partícula. Se concluye que en términos de $\langle R_{ee}^2 \rangle$, ambos modelos no son comparables.

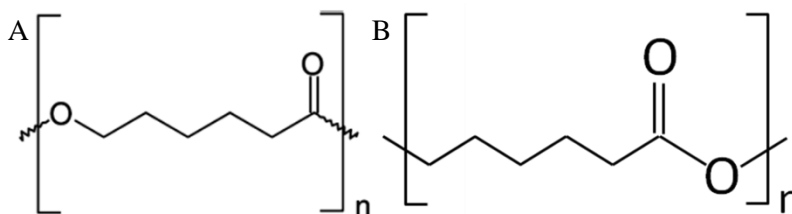


Figura 32. Representación de modelos de la unidad monomérica de PCL. (A) Modelo utilizado en el trabajo de Di Pasquale *et al.* (B) Modelo que se utilizó en este trabajo.

En lo que respecta al modelo de PCL-CG este logró precipitar en agua y se obtuvieron los valores de R_g y R_{ee} (forma en que reporta Gromacs) y se compararon con el modelo atomístico como muestra Tabla 9.

Tabla 9. Comparación de los valores obtenidos de radio de giro (R_g) y distancia end-to-end $\langle R_{ee} \rangle$ en los modelos atomísticos y Coarse Grain.

Modelo	R_g (nm)	R_{ee} (nm)
Atomístico	0,776	1,195
Coarse Grain	0,689	1,495

Son valores cercanos a pesar de las grandes diferencias entre ambos modelos, el modelo CG no tiene tantas restricciones para plegarse como uno atomístico. Una forma adecuada de hacer la comparación es transformar el modelo CG a atomístico por medio de *backmapping*, y comparar en un mismo nivel.³¹ El modelo PCL-CG logró precipitar en el medio acuoso al igual que el modelo atomístico como muestra la Figura 33.

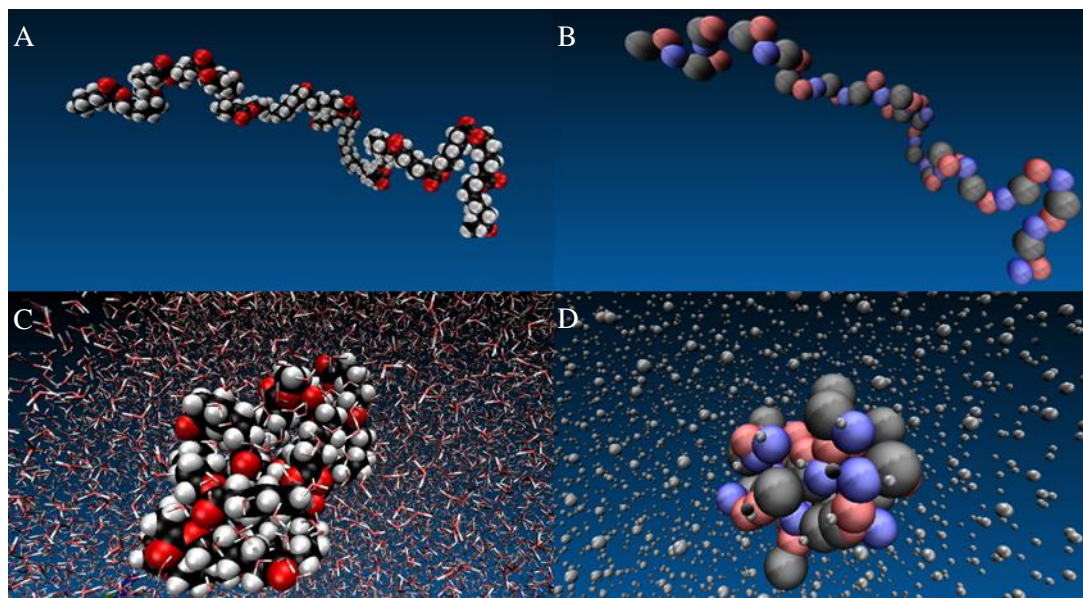


Figura 33. Representación de los modelos atomísticos y Coarse Grain. (A) PCL-Atom en vacío. (B) PCL-CG en vacío. (C) PCL-Atom precipitada en medio acuoso. (D) PCL-CG precipitada en agua Coarse Grain (esferas plateadas).

Se logró realizar un modelo CG para futuras aplicaciones (ej: encapsulación de fármacos) que “corre” en 5 horas, un tiempo muy corto al ser comparado con el modelo atomístico que corrió en aproximadamente 4 días. El modelo de PCL-CG permitiría aumentar el largo de la cadena polimérica, el número de cadenas poliméricas e incluso agregar fármacos ya que disminuye apreciablemente los costos computacionales. En la Tabla 10. se hace una comparación entre el número de partículas simuladas y el tiempo necesario.

Tabla 10. Comparación del número de partículas utilizadas en los modelos atomístico y Coarse Grain de una cadena de PCL con 20 unidades monoméricas, y los tiempos necesarios para realizar una dinámica molecular.

Modelo	Partículas de PCL	Partículas de agua	Total de partículas	Tiempo aproximado
Atomístico	365	65915	66280	4 días
Coarse Grain	60	4425	4485	5 horas

Este modelo de PCL-CG permitirá hacer pruebas teóricas de encapsulación de fármacos y los mecanismos involucrados en la nanoprecipitación de una manera más eficiente.

DISCUSIÓN

Se requiere de nanopartículas con distribución de tamaño monomodal y monodispersas, adecuadamente caracterizadas para poder relacionar el tamaño con el efecto en estudios *in-vivo* e *in-vitro*.¹⁰ El método de nanoprecipitación por antisolvente es simple y rápido para la generación de nanopartículas poliméricas, y tiene el potencial de ofrecer altos niveles de encapsulación de moléculas hidrofóbicas.⁶⁴ La principal limitante del método es la facilidad con la que se generan partículas polidispersas y agregados.⁶⁵ Lograr una supersaturación homogénea del soluto hidrofóbico sería determinante en la obtención de partículas pequeñas y monodispersas.⁹ Muchos trabajos han realizado diagramas de fases del sistema ternario compuesto de soluto hidrofóbico, solvente y antisolvente. En estas investigaciones las áreas que permiten la obtención en nanopartículas monodispersas son muy angostas^{46,48,66,67} y se alcanzan con muy bajas concentraciones y razón S/A, ofreciendo poco rendimiento en la generación de Nps. Otros autores en cambio, han preferido agregar concentraciones mayores y filtrar los agregados en miras de mayores rendimientos en la generación de nanopartículas.^{2,15}

En este trabajo modificando las variables de mezclado y formulación fue factible utilizar concentraciones altas y generar nanopartículas monodispersas. Estas se lograron en un paso y utilizando materiales de bajo costo, no fue necesario utilizar filtros, lo que redujo tiempo y costos.

La generación de nanopartículas monodispersas dependió notoriamente de las variables de mezclado, modificando por ejemplo la metodología de mezclado (MM) y el DIA (Figura 8. y Figura 10.). Estas variables afectan principalmente el tiempo (τ_{mix}) y la homogeneidad del mezclado como se observó en el trabajo Matteucci *et al.*,³⁷ estos autores demostraron que un bajo τ_{mix} puede compensar la falta de turbulencia en el mezclado. En este trabajo con una rápida inyección manual se lograron nanopartículas homogéneas, la clave fue lograr una gran supersaturación homogénea del polímero.

Tal como menciona Lepeltier *et al.*,⁹ una vez que el (τ_{mix}) es lo suficientemente bajo los resultados en tamaño y PDI se hacen menos dependientes de variables de formulación como concentración de polímero, agente estabilizante y razón S/A. De esas variables, la concentración es la que presentó un menor rango de tolerancia tal como han observado autores como Bilati *et al.*,⁸ quienes observaron que aumentar la viscosidad de la fase solvente tiene un mayor impacto por dificultar

la transferencia de masa. Para incrementar la transferencia de masa, existe consenso en que un aumento de la interacción solvente-antisolvente conduce a una disminución del tamaño y PDI, por un aumento en la difusión y arrastre de las cadenas poliméricas.^{2,8,44,47,49,58}

Se determinó que las características estructurales del polímero afectan en el proceso de nanoprecipitación. Algo similar fue descrito por Legrand *et al.*,² donde utilizando PLA los autores determinaron que mientras mayor era el balance hidrofílico/lipofílico, menor era el tamaño promedio de sus partículas y mayores eran los rendimientos de fabricación (menores agregados al filtrar). Al comparar los polímeros estudiados en este trabajo y ordenarlos por balance hidrofílico/lipofílico en orden creciente es: hPCL < PCL < ERS < ERL, y los tamaños fueron alrededor de 200, 120, 50 y 35 nm respectivamente. Un mayor carácter anfifílico del polímero permitiría mayor estabilización en la superficie, PCL (polímero neutro) requirió la utilización de agentes estabilizantes iónicos para otorgar este carácter, sin embargo, estos no fueron capaces de estabilizar hPCL por su elevado peso molecular y mayor hidrofobicidad. Los polímeros catiónicos ERS/ERL, se estabilizaron por si solos con sus grupos cargados, ERL al disponer el doble de cargas produjo partículas de menor tamaño. Probablemente por un aumento de la repulsión entre las cadenas poliméricas en el proceso difusivo.

Autores como Choi *et al.*⁵⁸ y Kim *et al.*⁴⁷ cuantificaron las interacciones polímero-solvente y notaron que un aumento de estas conduce a partículas de mayor tamaño porque parte del solvente permanece dentro de las partículas. En este trabajo se cuantificó la interacción de PCL-solvente y se determinó que acetona conduce a partículas de mayor tamaño por una mayor interacción con PCL. La dinámica molecular atomística de Di Pasquale *et al.*²⁴ confirma la existencia de clústers de solvente que se ubican alrededor de la nanopartícula, por el pequeño tamaño de la cadena polimérica de PCL (una cadena de 10 unidades monoméricas) ese trabajo no pudo ver moléculas de solvente en el interior de la partícula. Con respecto a ERS/ERL, no se pudo calcular los parámetros de interacción por la existencia de grupos cargados, los cálculos se realizan asumiendo que los grupos son apolares (su existencia afecta los cálculos). Existen trabajos como el de Wang *et al.*⁶⁸ que reportan un parámetro de solubilidad de 19,2 MPa^{1/2}; sin embargo, en este trabajo no fue posible utilizar ese valor ya que no contempla la carga puntual de los grupos amonio cuaternarios. Esos trabajos utilizan ERS como para recubrimientos farmacéuticos, proceso en los cuales no hay ionización. En este trabajo, el usar ese valor habría conducido a conclusiones

erróneas al compararlo con el de PCL que posee uno de $19,7 \text{ MPa}^{1/2}$, valor más cercano al del agua y que teóricamente habría conducido a partículas de menor tamaño.

Existen trabajos que han nanoprecipitado alguno de los polímeros investigados en este trabajo (ERS, ERL y PCL). En el caso de ERS trabajos como los de Eidi *et al.*⁶⁹ reportan NpERS con tamaño promedio de $54,2 \pm 6 \text{ nm}$ y una “baja” PDI de $0,5 \pm 0,04$, con potencial zeta aproximado de $+ 40,6 \pm 5 \text{ mV}$. Al analizar la metodología ellos utilizaron una concentración de 20 mg/mL lo que según nuestro trabajo conduciría al tamaño promedio reportado. Además, utilizaron P188 a una concentración de $0,5 \text{ \% p/v}$, que produce un valor de potencial zeta dentro del rango que se mostró en la Figura 6. Ellos mencionan que $0,5$ es una baja PDI; sin embargo, según Gaumet *et al.*¹⁰ una baja PDI debe ser menor a $0,1$; de lo contrario se deben reportar las distribuciones de tamaño de partícula, sobre todo para estudios biológicos. La elevada PDI que reportaron se explica por el lento mezclado que reportan en su sección de metodología, con esa PDI debiesen existir grandes agregados micrométricos que restan validez a los ensayos de citotoxicidad del trabajo.

Trabajos como el de Gargouri *et al.*⁷⁰ usan la misma metodología para estudios biológicos con resultados similares. En ese trabajo solamente se refieren a tamaño promedio, omitiendo PDI y la distribución de tamaño de partículas. La metodología original proviene de Bodmeier *et al.*¹¹ y fue desarrollada en 1991, mucho antes de conocer la influencia de muchas variables de mezclado.

En el caso de ERL el trabajo de Das *et al.*⁷¹ reporta que obtiene “buenos” PDI; sin embargo, en la mayoría de sus formulaciones, los valores publicados eran sobre $0,250$ y cinco de ellas superaban los $0,9$. El trabajo no mostró distribuciones de tamaño de partícula, pero reportó tamaños promedios, por ejemplo una muestra de tamaño $134,2 \pm 4,5 \text{ nm}$ tuvo una PDI de $0,985$. Es importante reflexionar que con esa PDI el tamaño promedio no es representativo de esas partículas. Por la experiencia en este trabajo, al analizar la metodología utilizaban 5 mg/mL de ERL, lo que conduce a poblaciones muy polidispersas como se mostró en la (Figura 15.). Es importante mencionar que el tamaño de partícula y PDI es relevante dependiendo de la aplicación que se desee: en ese caso, por ser aplicaciones oculares, la polidispersión no sería un factor tan relevante como lo sería en un inyectable.

Existen muchos más ejemplo de nanoprecipitación de PCL, uno de los primeros fue el de Stainmesse *et al.*⁴⁸ donde se determinó la importancia de la constante dieléctrica, concentración de fase solvente y razón S/A. En el trabajo de Molpeceres *et al.*⁵⁴ se realizó un estudio sistemático

para determinar el efecto de variables como temperatura, calibre de inyección, razón S/A, concentración de fases solvente y antisolvente. En sus investigaciones utilizaron un aparato similar al de este trabajo intercambiando la inyección manual por inyección con presión de nitrógeno. Observaron que el tamaño se redujo notablemente al aumentar el calibre de inyección y aumentar la presión con la que se expulsaba la fase solvente, y que luego permanecía invariante a pesar de modificar variables como razón S/A y concentración, similar a lo que se obtuvo en nuestro trabajo y en Stepanyan *et al.*³⁸ Lamentablemente no informan distribuciones de tamaño de partícula ni potenciales zeta, sin embargo, el uso de P188 posiblemente resultó en agregados por disminuir el potencial zeta.

Finalmente, en este trabajo se logró desarrollar un protocolo para la obtención de nanopartículas con distribución de tamaño monomodal aplicando el conocimiento de trabajos provenientes de la ingeniería química y fisicoquímica principalmente. El análisis sistemático del proceso de nanoprecipitación de ERL, ERS, y PCL identificó las variables claves que permitieron también adaptar el proceso satisfactoriamente para la generación de nuevas nanopartículas de los polímeros aniónicos Eudragit® S, L y L 100-55 (datos no mostrados). Todas las nanopartículas resultaron cumplir el criterio de distribuciones monomodales, validando el método desarrollado.

CONCLUSIÓN

Se desarrolló un protocolo detallado para la obtención de nanopartículas poliméricas con distribución de tamaño monomodal por el método de nanoprecitación para los polímeros ERS, ERL y PCL, en un solo paso y sin la necesidad de utilizar filtros. Se comprendió con gran detalle las variables que afectan el proceso de nanoprecitación. Además, se logró encapsular un fármaco de baja solubilidad acuosa dentro de las nanopartículas de policaprolactona, lamentablemente con eficiencias de encapsulación bajas.

Se generó un modelo *Coarse Grain* de policaprolactona con 20 unidades monoméricas que permite reducir notablemente los tiempos de simulación, permitiendo complejizar el sistema al agregar fármacos, surfactantes u otra molécula- Este modelo permitirá simular el proceso de nanoprecitación en escalas de tiempos y tamaño imposibles de observar con los equipos de laboratorio disponibles.

LIMITACIONES

Por razones de tiempo y costos no se pudo realizar TEM o SEM a cada una de las muestras, para validar lo observado por DLS en cada una de las muestras como se sugiere en el trabajo de Gaumet *et al.*

Los resultados obtenidos se replican con variaciones en rango de 10 a 15 nm producto de la variabilidad en la inyección manual del dispositivo de mezclado, restando reproducibilidad al método.

La dinámica molecular se basa en muchos supuestos, los resultados no necesariamente son cercanos a los experimentales. Faltan más experimentos computacionales para validar los números obtenidos en la simulación.

PROYECCIONES

Probar la posibilidad de utilizar mezclas de agentes estabilizantes para reducir el contenido de SDS de las NpPCL por problemas de toxicidad y mantener un potencial zeta adecuado. Aumentar la encapsulación de loperamida en las NpPCL y encapsular una mayor variedad de fármacos. Extrapolar el método a la generación de nuevas nanopartículas poliméricas por nanoprecitación.

Incorporar el modelo PCL-CG dentro de una esfera de acetona que se encontrará en una caja de agua, en busca de replicar lo que sucede en la nanoprecitación. Luego aumentar el número de cadenas poliméricas y agregar distintos fármacos en resolución atómica o CG, para predecir su incorporación dentro de la matriz polimérica, rendimientos de encapsulación y liberación. Generar cadenas poliméricas en resolución CG más largas y probar los mismos conceptos.

REFERENCIAS

1. Kumar, A., Mansour, H. M., Friedman, A. & Blough, E. R. *Nanomedicine in Drug Delivery*. (CRC Press, 2013).
2. Legrand, P. *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. *Int. J. Pharm.* **344**, 33–43 (2007).
3. Villiers, M. M. de, Aramwit, P. & Kwon, G. S. *Nanotechnology in Drug Delivery*. (Springer Science & Business Media, 2008).
4. Catalan-Figueroa, J. *et al.* Nanomedicine and nanotoxicology: the pros and cons for neurodegeneration and brain cancer. *Nanomed.* **11**, 171–187 (2016).
5. De Jong, W. H. & Borm, P. J. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine* **3**, 133–149 (2008).
6. Fessi, H., Puisieux, F., Devissaguet, J. P., Ammoury, N. & Benita, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55**, R1–R4 (1989).
7. Schubert, S., Joseph T. Delaney, J. & Schubert, U. S. Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). *Soft Matter* **7**, 1581–1588 (2011).
8. Bilati, U., Allémann, E. & Doelker, E. Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.* **24**, 67–75 (2005).
9. Lepeltier, E., Bourgaux, C. & Couvreur, P. Nanoprecipitation and the ‘Ouzo effect’: Application to drug delivery devices. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **71**, 86–97 (2014).

10. Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R. & Delie, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 1–9 (2008).
11. Bodmeier, R., Chen, H., Tyle, P. & Jarosz, P. Spontaneous formation of drug-containing acrylic nanoparticles. *J. Microencapsul.* **8**, 161–170 (1991).
12. Azarmi, S., Farid, J., Nokhodchi, A., Bahari-Saravi, S. M. & Valizadeh, H. Thermal treating as a tool for sustained release of indomethacin from Eudragit RS and RL matrices. *Int. J. Pharm.* **246**, 171–177 (2002).
13. Bordes, C. *et al.* Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. *Int. J. Pharm.* **383**, 236–243 (2010).
14. Wu, C., Jim, T. F., Gan, Z., Zhao, Y. & Wang, S. A heterogeneous catalytic kinetics for enzymatic biodegradation of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles in aqueous solution. *Polymer* **41**, 3593–3597 (2000).
15. Lince, F., Marchisio, D. L. & Barresi, A. A. Strategies to control the particle size distribution of poly- ϵ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications. *J. Colloid Interface Sci.* **322**, 505–515 (2008).
16. Casado, J. F. Diseño de un simulador de dinámica molecular basado en CORBA. (2011).
17. van Gunsteren, W. F. & Berendsen, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications, and Perspectives in Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **29**, 992–1023 (1990).
18. Allen, M. P. & Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids*. (Clarendon Press, 1989).
19. Ortiz, V., Nielsen, S. O., Klein, M. L. & Discher, D. E. Computer simulation of aqueous block copolymer assemblies: Length scales and methods. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **44**, 1907–1918 (2006).

20. Müller-Plathe, F. Coarse-graining in polymer simulation: from the atomistic to the mesoscopic scale and back. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **3**, 755–769 (2002).
21. Marrink, S. J., de Vries, A. H. & Mark, A. E. Coarse Grained Model for Semiquantitative Lipid Simulations. *J. Phys. Chem. B* **108**, 750–760 (2004).
22. Yesylevskyy, S. O., Schäfer, L. V., Sengupta, D. & Marrink, S. J. Polarizable Water Model for the Coarse-Grained MARTINI Force Field. *PLOS Comput Biol* **6**, e1000810 (2010).
23. Cheng, J. C. & Fox, R. O. Kinetic Modeling of Nanoprecipitation using CFD Coupled with a Population Balance. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 10651–10662 (2010).
24. Di Pasquale, N., Marchisio, D. L., Barresi, A. A. & Carbone, P. Solvent Structuring and Its Effect on the Polymer Structure and Processability: The Case of Water–Acetone Poly- ϵ -caprolactone Mixtures. *J. Phys. Chem. B* **118**, 13258–13267 (2014).
25. Abraham, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1–2**, 19–25 (2015).
26. Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tirado-Rives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11225–11236 (1996).
27. Lennard-Jones, J. E. Cohesion. *Proc. Phys. Soc.* **43**, 461 (1931).
28. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F. van & Hermans, J. in *Intermolecular Forces* (ed. Pullman, B.) 331–342 (Springer Netherlands, 1981).
29. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., Gunsteren, W. F. van, DiNola, A. & Haak, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* **81**, 3684–3690 (1984).
30. van Gunsteren, W. F. *et al.* Biomolecular Modeling: Goals, Problems, Perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4064–4092 (2006).

31. Wassenaar, T. A., Pluhackova, K., Böckmann, R. A., Marrink, S. J. & Tieleman, D. P. Going Backward: A Flexible Geometric Approach to Reverse Transformation from Coarse Grained to Atomistic Models. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 676–690 (2014).
32. Loverde, S. M., Klein, M. L. & Discher, D. E. Nanoparticle Shape Improves Delivery: Rational Coarse Grain Molecular Dynamics (rCG-MD) of Taxol in Worm-Like PEG-PCL Micelles. *Adv. Mater.* **24**, 3823–3830 (2012).
33. Shinoda, W., DeVane, R. & Klein, M. L. Coarse-grained molecular modeling of non-ionic surfactant self-assembly. *Soft Matter* **4**, 2454–2462 (2008).
34. Malvern Instruments Limited. Dynamic light scattering common terms defined - Inform white paper. (2011).
35. Washington University in St.Louis. Dynamic Light Scattering (DLS). (2016). Available at: <http://www.nano.wustl.edu/doc/Instrument%20Manuals%20and%20Protocols/DLS%20Final.pdf>.
36. Malvern Instruments Limited. Intensity-volume-number distribution - Technical Note. (2014).
37. Michal E Matteucci, M. A. H. Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: mixing energy versus surfactant stabilization. *Langmuir ACS J. Surf. Colloids* **22**, 8951–9 (2006).
38. Stepanyan, R., Lebouille, J. G. J. L., Slot, J. J. M., Tuinier, R. & Stuart, M. A. C. Controlled Nanoparticle Formation by Diffusion Limited Coalescence. *Phys. Rev. Lett.* **109**, 138301 (2012).
39. Seremeta, K. P., Chiappetta, D. A. & Sosnik, A. Poly(ϵ -caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly(ϵ -caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **102**, 441–449 (2013).

40. Prasad, K. N. *et al.* Surface activity and association of ABA polyoxyethylene—polyoxypropylene block copolymers in aqueous solution. *J. Colloid Interface Sci.* **69**, 225–232 (1979).
41. de Diego, Y. P., Pellikaan, H. C., Wubbolts, F. E., Witkamp, G. J. & Jansens, P. J. Operating regimes and mechanism of particle formation during the precipitation of polymers using the PCA process. *J. Supercrit. Fluids* **35**, 147–156 (2005).
42. Lengsfeld, C. S., Delplanque, J. P., Barocas, V. H. & Randolph, T. W. Mechanism Governing Microparticle Morphology during Precipitation by a Compressed Antisolvent: Atomization vs Nucleation and Growth. *J. Phys. Chem. B* **104**, 2725–2735 (2000).
43. Horn, D. & Rieger, J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase—Theory, Experiment, and Use. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 4330–4361 (2001).
44. Tan, Y. *et al.* Fabrication of Size-Controlled Starch-Based Nanospheres by Nanoprecipitation. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **1**, 956–959 (2009).
45. Hornig, S. & Heinze, T. Efficient Approach To Design Stable Water-Dispersible Nanoparticles of Hydrophobic Cellulose Esters. *Biomacromolecules* **9**, 1487–1492 (2008).
46. Vitale, S. A. & Katz, J. L. Liquid Droplet Dispersions Formed by Homogeneous Liquid–Liquid Nucleation: ‘The Ouzo Effect’. *Langmuir* **19**, 4105–4110 (2003).
47. Kim, J. H. *et al.* Fabrication of poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles using a simple fluidic device with a tapered glass capillary and the effect of thermodynamic parameters. *J. Pharm. Investig.* **45**, 157–161 (2014).
48. Stainmesse, S., Orecchioni, A.-M., Nakache, E., Puisieux, F. & Fessi, H. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **273**, 505–511 (1995).

49. Galindo-Rodriguez, S., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Physicochemical Parameters Associated with Nanoparticle Formation in the Salting-Out, Emulsification-Diffusion, and Nanoprecipitation Methods. *Pharm. Res.* **21**, 1428–1439 (2004).
50. Van Krevelen, D. W. & Te Nijenhuis, K. in *Properties of Polymers (Fourth Edition)* (eds. by, D. W. V. K. & Nijenhuis, K. T.) 189–227 (Elsevier, 2009).
51. Derlacki, Z. J., Easteal, A. J., Edge, A. V. J., Woolf, L. A. & Roksandic, Z. Diffusion coefficients of methanol and water and the mutual diffusion coefficient in methanol-water solutions at 278 and 298 K. *J. Phys. Chem.* **89**, 5318–5322 (1985).
52. Murakami, H., Kobayashi, M., Takeuchi, H. & Kawashima, Y. Preparation of poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* **187**, 143–152 (1999).
53. Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P. & Puisieux, F. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int. J. Pharm.* **146**, 233–238 (1997).
54. Molpeceres, J., Guzman, M., Aberturas, M. R., Chacon, M. & Berges, L. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *J. Pharm. Sci.* **85**, 206–213 (1996).
55. Mohanraj, V. J. & Chen, Y. Nanoparticles - A review. *Trop. J. Pharm. Res.* **5**, 561–573 (2006).
56. Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. & Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24**, 1113–1128 (1998).
57. Bantsev, V. *et al.* Mechanisms of Ocular Toxicity Using the in Vitro Bovine Lens and Sodium Dodecyl Sulfate as a Chemical Model. *Toxicol. Sci.* **73**, 98–107 (2003).

58. Choi, S.-W., Kwon, H.-Y., Kim, W.-S. & Kim, J.-H. Thermodynamic parameters on poly(d,l-lactide-co-glycolide) particle size in emulsification–diffusion process. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **201**, 283–289 (2002).
59. Mazzarino, L. *et al.* Elaboration of chitosan-coated nanoparticles loaded with curcumin for mucoadhesive applications. *J. Colloid Interface Sci.* **370**, 58–66 (2012).
60. Budhian, A., Siegel, S. J. & Winey, K. I. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *Int. J. Pharm.* **336**, 367–375 (2007).
61. Song, X. *et al.* Dual agents loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug entrapment efficiency. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **69**, 445–453 (2008).
62. Kok, C. M. & Rudin, A. Relationship between the hydrodynamic radius and the radius of gyration of a polymer in solution. *Makromol. Chem. Rapid Commun.* **2**, 655–659 (1981).
63. Salem, A. K. *et al.* Synthesis and Characterisation of a Degradable Poly(lactic acid)–Poly(ethylene glycol) Copolymer with Biotinylated End Groups. *Biomacromolecules* **2**, 575–580 (2001).
64. Mora-Huertas, C. E., Fessi, H. & Elaissari, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.* **385**, 113–142 (2010).
65. Brick, M. C., Palmer, H. J. & Whitesides, T. H. Formation of Colloidal Dispersions of Organic Materials in Aqueous Media by Solvent Shifting†. *Langmuir* **19**, 6367–6380 (2003).
66. Aubry, J., Ganachaud, F., Cohen Addad, J.-P. & Cabane, B. Nanoprecipitation of Polymethylmethacrylate by Solvent Shifting:1. Boundaries. *Langmuir* **25**, 1970–1979 (2009).
67. Yan, X. *et al.* Simple but precise engineering of functional nanocapsules through nanoprecipitation. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **53**, 6910–6913 (2014).
68. Wang, C.-C. *et al.* Influence of plasticizers on the mechanical properties of pellets containing Eudragit® RS 30 D. *Int. J. Pharm.* **152**, 153–163 (1997).

69. Eidi, H. *et al.* Drug delivery by polymeric nanoparticles induces autophagy in macrophages. *Int. J. Pharm.* **422**, 495–503 (2012).
70. Gargouri, M. *et al.* Optimization of a New Non-viral Vector for Transfection: Eudragit Nanoparticles for the Delivery of a DNA Plasmid. *Technol. Cancer Res. Treat.* **8**, 433–443 (2009).
71. Das, S., Suresh, P. K. & Desmukh, R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **6**, 318–323 (2010).
72. Sterling, C. V. & Scriven, L. E. Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the marangoni effect. *AIChE J.* **5**, 514–523 (1959).
73. Di Pasquale, N., Marchisio, D. L. & Barresi, A. A. Model validation for precipitation in solvent-displacement processes. *Chem. Eng. Sci.* **84**, 671–683 (2012).
74. Botet, R. The ‘ouzo effect’, recent developments and application to therapeutic drug carrying. *J. Phys. Conf. Ser.* **352**, 12047 (2012).
75. Ganachaud, F. & Katz, J. L. Nanoparticles and Nanocapsules Created Using the Ouzo Effect: Spontaneous Emulsification as an Alternative to Ultrasonic and High-Shear Devices. *ChemPhysChem* **6**, 209–216 (2005).
76. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB. Available at: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>. (Accessed: 5th November 2016)
77. Pure water solvent. Available at: <http://cgmartini.nl/index.php/downloads/example-applications/63-pure-water-solvent>. (Accessed: 6th November 2016)

ANEXO I

MARCO TEÓRICO DEL MÉTODO DE NANOPRECIPITACIÓN

El método de nanoprecipitación (también conocido como precipitación por desplazamiento de solvente o precipitación por antisolvente)^{6,11} es simple, rápido y utiliza solventes poco tóxicos. Consta de mezclar una solución polimérica (en solvente orgánico) con agua. El solvente debe ser miscible en agua (ej.: etanol, acetona, etc.) y el polímero insoluble en medio acuoso. La solución polimérica se conoce como fase solvente. El agua opcionalmente puede tener un agente estabilizante de coloides (ej: emulsificantes) y se llama fase antisolvente. Este método es especialmente útil para la encapsulación de fármacos hidrofóbicos que deben cumplir con el requisito de ser solubles en la fase solvente.⁵⁶ El efecto de los fármacos puede ser obviado al investigar las condiciones de fabricación, ya que no tienen un gran impacto en el tamaño final de las nanopartículas que en su mayoría están constituidas por el polímero, facilitando la caracterización y la búsqueda de tendencias.¹⁵

Una vez que el solvente toma contacto con el antisolvente, se generan “remolinos” como describe Quintanar-Guerrero *et al.*,⁵⁶ producto de las turbulencias interfaciales⁷² y diferencias térmicas del sistema. Estos “remolinos” generarían nano-gotas de solvente que reducirían su tamaño a medida que avanza el proceso de difusión. La difusión de la fase solvente dentro de la antisolvente, ocasiona la precipitación del polímero mediado por los mecanismos de nucleación, crecimiento y agregación.^{9,15,43,73}

La precipitación del polímero se puede explicar por la teoría clásica de la nucleación,⁹ ocurre cuando el polímero supera su supersaturación crítica, y espontáneamente fluctuaciones de concentración ocasionan que las cadenas poliméricas formen núcleos (separación de fases). La supersaturación se puede alcanzar por modificaciones de temperatura, presión o adición de un tercer componente, este último caso es relevante en nanoprecipitación al cambiar la solubilidad del soluto. Estas modificaciones producen que la separación de fases sea energéticamente favorable, generando los núcleos.⁴³ La energía libre (ΔG) de formación de estos núcleos, asumiendo forma esférica y tensión superficial independiente del tamaño viene dada por la Ecuación A1.

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_v$$

Ecuación A1. Variación de energía libre en la nucleación. Donde ΔG_s es el aumento de energía libre producto de la formación de una nueva superficie, y ΔG_v es la reducción de energía libre volumétrica por la separación de fases.

La Ecuación A1. se puede expresar como la Ecuación A2.

$$\Delta G = 4\pi r^2 \gamma + \frac{4}{3} \pi r^3 \Delta g_v$$

Ecuación A2. Donde r es el radio de núcleo, γ la tensión superficial, y Δg_v la diferencia de energía libre por unidad de volumen entre las dos fases.

Se observa que para que exista el proceso de nanoprecipitación, la reducción de ΔG por la separación de fases debe ser lo suficientemente grande como para compensar la tensión superficial de la nueva interfase en formación.

No todos los núcleos conducen a la formación de nanopartículas, para que suceda la nanoprecipitación el radio de los núcleos debe ser mayor al radio crítico (r^*) (Ecuación A3.).

$$r^* = -\frac{2\gamma}{\Delta g_v}$$

Ecuación A3. Radio crítico (r^).*

El radio crítico representa el máximo de energía libre que deben superar los núcleos para ser estables y crecer (Figura A1.). Núcleos con radios menores al radio crítico, se redisuelven.⁴³

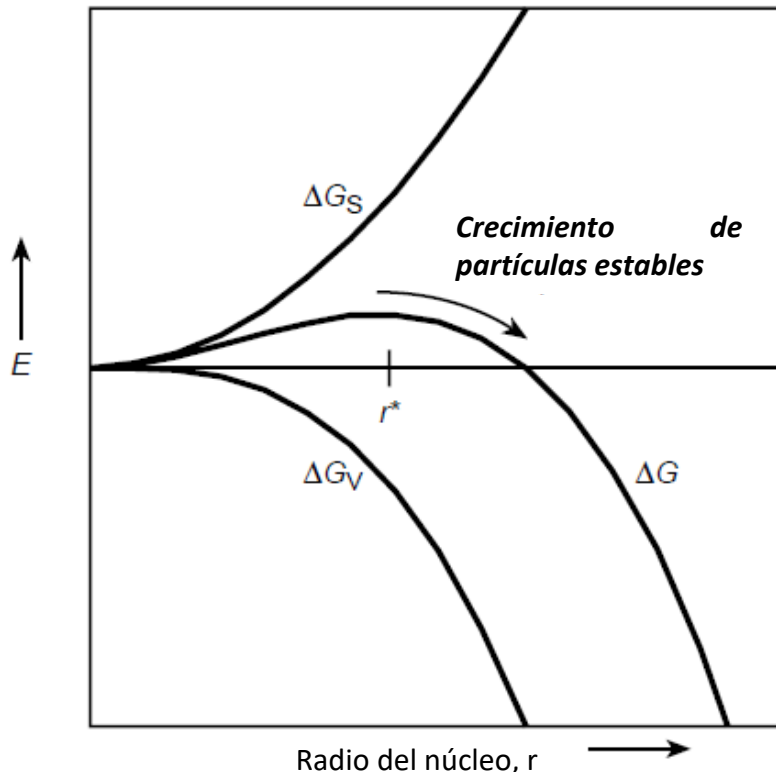


Figura A1. Diagrama de energía para explicar el proceso de nucleación. ΔG es la energía libre de una partícula con radio r , ΔG_s es la energía libre superficial, ΔG_v es la energía libre volumétrica y r^* es el radio crítico. Partículas con $r > r^*$ son capaces de crecer, de lo contrario se redisuelven. (Diagrama extraído de Horn y Rieger, 2001).

La velocidad de formación de estos núcleos se describe por la velocidad de nucleación (J) según la Ecuación A4.

$$J = \frac{2D}{d^5} e^{-\frac{16\pi\gamma^3\bar{v}^2}{3k^3T^3(\ln(S))^2}}$$

Ecuación A4. Velocidad de nucleación. Donde S es la supersaturación, k la constante de Boltzmann, T la temperatura, γ la tensión superficial, y d, D, \bar{v} son el diámetro, difusión y volumen molecular del polímero respectivamente.

Como se observa en la Ecuación A4., la principal variable modificable en laboratorio es la supersaturación del polímero (S), definida por Ecuación A5.⁷³

$$S = \frac{\text{Concentración local del soluto}}{\text{Límite de solubilidad en la mezcla}}$$

Ecuación A5. Supersaturación (S).

Para modificar S se puede aumentar la concentración polímero, aumentar turbulencia de mezclado o cualquier otro método que permita aumentar la velocidad de la transferencia de masa.⁴² Un aumento de la supersaturación del polímero, aumenta la velocidad de nucleación y promueve que los núcleos superen el radio crítico e inicien el proceso de crecimiento. En el crecimiento, cadenas poliméricas circundantes a los núcleos precipitan en la superficie de estos. Este proceso está limitado por el coeficiente de difusión (D) de las cadenas poliméricas a la superficie de los núcleos.

La principal limitante del método de nanoprecitación es la facilidad de generación de agregados y nanopartículas con distribuciones de tamaños polidispersas. Lepeltier *et al.*⁹ sostienen que es clave separar en el tiempo los procesos de nucleación y crecimiento para evitar la agregación de las partículas (Figura A2.).

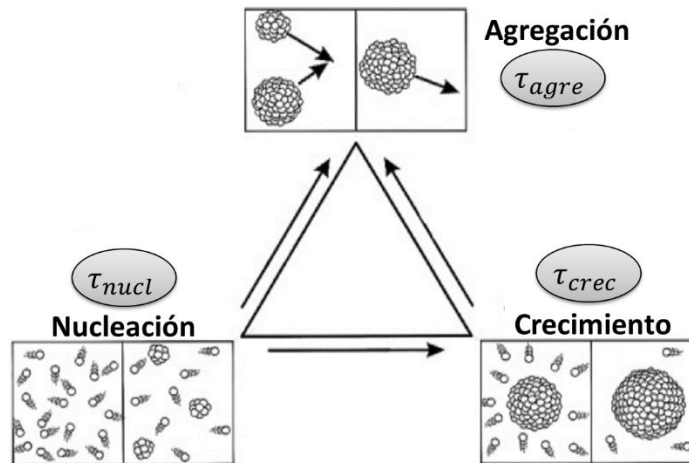


Figura A2. Mecanismo de la precipitación (Extraído de Matteucci *et al.*³⁷).

Un mezclado rápido y homogéneo permite una supersaturación elevada y uniforme, un aumento de la velocidad de nucleación y su separación del proceso de crecimiento. Esto genera nanopartículas de reducido tamaño, con distribuciones de tamaño monodispersas y monomodales³⁷.

En el trabajo de Horn y Rieger⁴³ se menciona que la mezcla de dos líquidos se divide en macro-, meso- y micromezclado. Las mezclas suceden en diferentes escalas de longitud, el macromezclado ocurre en escala de decímetros, el mesomezclado en milímetros y micromezclado en micrómetros. El más relevante y determinante en la nanoprecipitación es el micromezclado. Este sucede en flujos turbulentos y produce que las dos capas de líquidos (solvente y antisolvente) se envuelvan la una a la otra, reduciendo cada vez más el grosor de estas hasta formar verdaderas “láminas” de reducido tamaño que aumentan la transferencia de masa (Figura A3.).



Figura A3. Representación bi-dimensional de la mezcla de dos flujos en condiciones turbulentas. (Extraído de Horn y Rieger).⁴³

Entre estas “láminas” se desarrolla la máxima supersaturación del sistema y el comienzo de la precipitación. Por lo tanto, es crítico lograr mezclados turbulentos, lograr una elevada supersaturación y velocidad de nucleación. Investigaciones previas han determinado que se puede obtener una supersaturación uniforme y elevada con tiempos de mezclados cortos (τ_{mix}), sin necesidad de números de Reynolds (Re) muy elevados.³⁷ Los autores describen nanopartículas con distribuciones de tamaño similares usando un menor tiempo de mezclado a pesar de haber reducido el Re a la mitad. Para relacionar los procesos de mezclado y precipitación, el número de Damkohler (Da) definido en la Ecuación A6. ha sido utilizado previamente.

$$Da = \frac{\tau_{mix}}{\tau_{precip}}$$

Ecuación A6. Número de Damkohler (Da). Donde τ_{mix} es el tiempo de mezclado y τ_{precip} es el tiempo de precipitación.

El tiempo de precipitación está compuesto por:

$$\tau_{precip} = \tau_{crecimiento} + \tau_{agregación}$$

Dónde $\tau_{crecimiento}$ es el tiempo en que los núcleos crecen por la deposición de polímero en su superficie y $\tau_{agregación}$ es el tiempo en el cual los núcleos crecen por la agregación de dos partículas ya formadas. En condiciones de mezclado bajas, Da y τ_{mix} son altos. Esto indica baja supersaturación, menor velocidad de nucleación en relación a la velocidad de crecimiento, generando partículas de mayor tamaño y polidispersas.^{37,38}

Otro enfoque de estudio de la nanoprecipitación se ha realizado considerando principalmente diagramas de fase (Figura A4.). En esta estrategia, la elección de las proporciones adecuadas de fase solvente, antisolvente y polímero permitirían la obtener espontáneamente partículas de reducido tamaño, con distribuciones monodispersas y monomodales, sin necesidad de aplicar energía, agitación y agentes estabilizantes. Vitale y Katz⁴⁶ denominaron este fenómeno como “efecto *Ouzo*” debido a la similitud con la preparación del licor griego llamado Ouzo. Este licor está formado por una solución alcohólica del aceite de anís, a la cual se le agrega agua, pasando de un aspecto translúcido a uno lechoso.⁴⁶ El concepto inicialmente se aplicó para separación de fases líquido-líquido (*e.g.* nanoemulsiones) y con el tiempo avanzó a otros solutos hidrofóbicos como cristales y polímeros (*e.g.* nanocápsulas, nanocristales y nanopartículas poliméricas).⁹

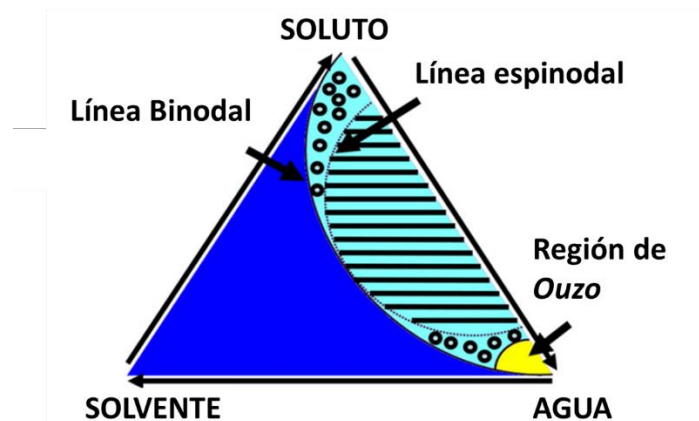


Figura A4. Diagrama de fases, entre las líneas binodal y espinodal se encuentra la región metastable donde se generan nanopartículas por el mecanismo de nucleación y crecimiento. Dentro de la región metastable se encuentra la región Ouzo, que genera nanopartículas de reducido tamaño y homogéneas sin necesidad de agregar agentes estabilizantes o energía. (Diagrama extraído de Lepeltier et al.⁹).

La región del diagrama de fases que conduce a la formación de nanopartículas es la región metaestable. Esta región se encuentra entre las curvas binodal (límite de miscibilidad) y espinodal (límite de estabilidad) del diagrama de fases. En este dominio, las partículas se formarían por el mecanismo de nucleación y crecimiento.⁴⁶ Dentro de la región metaestable se encuentra la región *Ouzo* (dominio *Ouzo*) que conduce a partículas homogéneas de reducido tamaño (ausencia de agregados) y con elevada estabilidad coloidal. Generalmente el dominio *Ouzo* se alcanza con pequeñas concentraciones de soluto y bajas razones entre los volúmenes de Solvente y Antisolvente (Razón S/A).⁷⁴ Es importante mencionar que el *efecto Ouzo* no es el mismo fenómeno que la emulsificación espontánea, este último se produce al mezclar dos volúmenes de fases inmiscibles.⁴⁶

Los autores Ganachaud y Katz⁷⁵ mencionaron la relevancia de la elección del solvente o mezcla de estos para aprovechar eficientemente el efecto *Ouzo*: (1) Debe ser un *theta* solvente para el polímero, donde hay un balance entre las interacciones polímero-solvente, ni tan grandes como para hinchar la cadena, ni tan pequeñas como para colapsarlas. (2) Debe ser totalmente miscible con agua. (3) Debe tener un parámetro de solubilidad cercano al del agua.

Las primeras aproximaciones a la importancia del solvente en nanoprecipitación, surgieron con respecto a su constante dieléctrica (ϵ).^{48,53} Al respecto, se ha descrito que solventes más polares conducen a partículas de menor tamaño. Bilati *et al.*⁸ postuló que una ϵ mayor aumentaría velocidad de difusión del solvente en agua, y conduciría a menores tamaños de partícula. También concluyó que la nanoprecipitación falla cuando las diferencias de ϵ entre el solvente y agua son elevadas. Mientras más polar el solvente mejor sería el rendimiento de en la generación de nanopartículas (menor agregación). Por otro lado, Galindo-Rodriguez *et al.*⁴⁹ estudian el efecto de los parámetros de solubilidad (δ) y parámetros de interacción (χ) en las nanopartículas de generadas. El parámetro de solubilidad se divide en varios componentes de interacciones intermoleculares (Ecuación A7.).

$$\delta = [\delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2]^{\frac{1}{2}}$$

Ecuación A7. Parámetro de solubilidad. Donde δ_d , δ_p y δ_h son las componentes de dispersión, polar y enlaces de hidrógeno del parámetro de solubilidad respectivamente.

El que los parámetros de solubilidad de dos sustancias sean similares predice que estos podrían ser solubles el uno con el otro al mezclarse.⁵⁰ Varios autores han observado que el parámetro de

solubilidad del solvente tiene relación con las partículas generadas al nanoprecipitar en términos de tamaño, polidispersidad (PDI), encapsulación y porosidad entre otras características^{2,8,44,49}. Mientras menor sea la diferencia entre los parámetros de solubilidad del solvente y del antisolvente ($\Delta\delta_{S-A}$) según la Ecuación A8., mayor es la afinidad entre las fases. Por lo tanto, el proceso de difusión sería más rápido debido a una mayor interacción y el solvente arrastraría consigo las cadenas poliméricas de una forma más eficiente, separando los procesos de nucleación y crecimiento.

$$\Delta\delta_{S-A} = \left[(\delta_{d,S} - \delta_{d,W})^2 + (\delta_{p,S} - \delta_{p,W})^2 + (\delta_{h,S} - \delta_{h,W})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

Ecuación A8. Variación del parámetro de solubilidad entre la fase solvente y antisolvente. Donde δ_d , δ_p y δ_h son las componentes de dispersión, polar y enlaces de hidrógeno del parámetro de solubilidad. Donde el subíndice S es del solvente y W del agua.

El parámetro de interacción (χ) es un mejor indicador con respecto al tamaño de partícula según el trabajo de Galindo-Rodriguez *et al.*⁴⁹ al establecer la relación con tamaño de partícula obtenido usando varios solventes. Se calcula según Ecuación A9.

$$\chi = \frac{V_S}{RT} (\delta_S - \delta_W)^2$$

Ecuación A9. Parámetro de interacción. Dónde V_S es el volumen molar del solvente, T la temperatura, R la constante de los gases, δ_S y δ_W son los parámetros de solubilidad totales del solvente y agua respectivamente.

En los trabajos de Bilati *et al.* y Galindo-Rodriguez *et al.*^{8,49} concluyen una proporcionalidad directa entre el χ y el tamaño de partícula: a mayor valor de χ menor es la interacción entre las fase solvente y antisolvente. Esto aumenta la velocidad de difusión y reduce el tamaño de partícula.

Choi *et al.* y Kim *et al.*^{47,58} expanden el concepto a la interacción polímero-solvente, además de relacionarlo con los coeficientes de difusión mutua (D) entre las fases solvente y antisolvente. Choi *et al.*⁵⁸ determinó en el método de emulsificación-difusión, una disminución del parámetro de interacción entre polímero y solvente, aumenta el tamaño de partícula. Este trabajo explica que el solvente tendería a incorporarse al interior de la nanopartícula, por el aumento de la afinidad polímero-solvente capaz de inhibir parte de la difusión del solvente en agua. Kim *et al.*^{47,58} llegó a la misma conclusión y ambos trabajos demuestran que el coeficiente de difusión mutua (D) y la

razón de intercambio (R) (Ecuación A10.) son determinantes en el tamaño de partícula. Mientras mayor es la difusión del solvente dentro del antisolvente, menor será el tamaño de partícula.

$$R = \frac{D_{\text{solvente a agua}}}{D_{\text{agua a solvente}}}$$

Ecuación A10. Razón de intercambio.

Dónde los coeficientes de difusión mutua (D) y se calculan mediante la Ecuación A11.

$$D_{AB}^0 = 8,93 \times 10^{-8} \left(\frac{V_A}{V_B^2} \right)^{1/6} \left(\frac{P_B}{P_A} \right)^{0,6} \frac{T}{\eta_B}$$

Ecuación A11. Dónde D_{AB}^0 es el coeficiente de difusión mutua de A en B. V_A y V_B son los volúmenes de molares de A y B a la temperatura de ebullición normal. P_A y P_B son los parachors para A y B respetivamente. η_B es la viscosidad del solvente B y T es la temperatura. El concepto parachor es un concepto en función de la composición, se es calcula por contribución de grupos y es especialmente útil para estimar tensión superficial, sin necesidad realizar mediciones experimentales.

Mientras mayor sea el D_{AB}^0 de solvente a antisolvente (D_{s-w}) y menor el de antisolvente a solvente (D_{w-s}), mayor será la difusión de las cadenas polimérica. Esto aumenta la supersaturación del polímero con el consecuente aumento en la velocidad de nucleación, separándola de los procesos de crecimiento y agregación. Esto provoca nanopartículas de menor tamaño, con distribuciones de tamaño monodispersas y monomodales.⁹ Es necesario recalcar que la supersaturación varía localmente como función del proceso de mezclado, hasta que la solución esté totalmente mezclada.^{37,65}

Tanto variables de fabricación como de formulación son relevantes en el proceso de nanoprecipitación. Variables de fabricación van desde tipo de mezclado, velocidad lineal de las fases, turbulencia, velocidad de agitación, diámetro de inyección de la fase solvente, temperatura, y cualquier variable que no implique un cambio en la composición del sistema. Las variables de formulación serían la concentración del polímero, el tipo de solvente, concentración y tipo de agente estabilizante, razón S/A y cualquier variable que modifique la composición de la formulación. Varios trabajos han investigado algunas de estas variables con distintos enfoques,

pero sin necesariamente alcanzar partículas homogéneas en un paso y con altos rendimientos de fabricación.

Realizar un estudio sistemático donde se modifiquen ambos tipos de variables podría encontrar las condiciones necesarias para producir nanopartículas con distribuciones de tamaño monomodal y monodispersa, en un solo paso y sin la necesidad de utilizar filtros. Sin embargo, para comprender el proceso de nanoprecitación en un primer momento y desde un punto de vista molecular es necesario recurrir a la química computacional, por la carencia de equipos que permitan acceder a esa escala de tiempo y detalle.

ANEXO II

LÍNEA DE COMANDO PARA LA GENERACIÓN DE MODELO ATOMÍSTICO.

Generar molécula en formato .pdb

Se utilizó el software Avogadro para dibujar una molécula de PCL compuesta por 20 monómeros (PCL-20) con extremos metilados. Se guardó el archivo en formato *.pdb*, que es aceptado como punto de partida en Gromacs. El formato *.pdb* solo contiene las coordenadas del sistema. Lamentablemente Gromacs no es capaz de reconocer los fragmentos o residuos del archivo *.pdb* de PCL, por no tratarse de una biomolécula (función principal del software).

Generar archivo .rtp

Gromacs es muy utilizado en biofísica, por eso la mayoría de las proteínas que se encuentran en el *Protein Data Bank*⁷⁶ son fácilmente reconocidas por las librerías y convertidas desde el formato *.pdb* al formato *.gro*, que es el formato propio de Gromacs. En esa conversión se genera la topología (*.top*) que describe entre otros datos, la carga, átomos, interacciones enlazantes y no enlazantes del sistema. Para generar los archivos *.gro* y *.top* se requiere que el campo de fuerza (force field, *.ff*) reconozca los residuos de la molécula.

Para que Gromacs pueda reconocer un polímero fue necesario modificar el archivo *.rtp* del campo de fuerza, este archivo es el responsable que Gromacs reconozco biomoléculas como aminoácidos y bases nitrogenadas. Los valores asignados se encuentran en la Tabla A1., Tabla A2. y Tabla A3.

Tabla A1. Cargas asignadas a los átomos del residuo LII.

Residuo LII		
Átomo	Tipo	Carga (C)
C1	opls_135	-0,18
H1	opls_140	0,06
H2	opls_140	0,06
H3	opls_140	0,06
C2	opls_136	-0,12
H4	opls_140	0,06
H5	opls_140	0,06
C3	opls_136	-0,12
H6	opls_140	0,06
H7	opls_140	0,06
C4	opls_136	-0,12
H8	opls_140	0,06
H9	opls_140	0,06
C5	opls_136	-0,12
H10	opls_140	0,06
H11	opls_140	0,06
C6	opls_465	0,51
O1	opls_466	-0,43
O2	opls_467	-0,33

Tabla A2. Cargas asignadas a los átomos del residuo LIG.

Residuo LIG		
Átomo	Tipo	Carga (C)
C1	opls_490	0,19
H1	opls_469	0,03
H2	opls_469	0,03
C2	opls_136	-0,12
H3	opls_140	0,06
H4	opls_140	0,06
C3	opls_136	-0,12
H5	opls_140	0,06
H6	opls_140	0,06
C4	opls_136	-0,12
H7	opls_140	0,06
H8	opls_140	0,06
C5	opls_136	-0,12
H9	opls_140	0,06
H10	opls_140	0,06
C6	opls_465	0,51
O1	opls_466	-0,43
O2	opls_467	-0,33

Tabla A3. Cargas asignadas a los átomos del residuo LIF.

Residuo LIF		
Átomo	Tipo	Carga (C)
C1	opls_490	0,19
H1	opls_469	0,03
H2	opls_469	0,03
C2	opls_136	-0,12
H3	opls_140	0,06
H4	opls_140	0,06
C3	opls_136	-0,12
H5	opls_140	0,06
H6	opls_140	0,06
C4	opls_136	-0,12
H7	opls_140	0,06
H8	opls_140	0,06
C5	opls_136	-0,12
H9	opls_140	0,06
H10	opls_140	0,06
C6	opls_465	0,51
O1	opls_466	-0,43
O2	opls_467	-0,33
C7	opls_468	0,16
H11	opls_469	0,03
H12	opls_469	0,03
H13	opls_469	0,03

Una vez modificado el *.rtp* los residuos de PCL-20 fueron reconocidos por Gromacs, y se pudo generar la topología y el *.gro* que son los formatos de partida para cualquier modelamiento en Gromacs.

Generar formatos iniciales para Gromacs (*.gro* y *.top*)

Para generar la topología y el *.gro* se utilizó el comando:

```
$gmx pdb2gmx -f PCL-20.pdb -o PCL-20.gro -p PCL-20.top
```

El comando solicita el campo de fuerza para asignar las cargas de los átomos, se eligió el OPLS-AA. En la Figura A5. se muestra un diagrama de este paso.

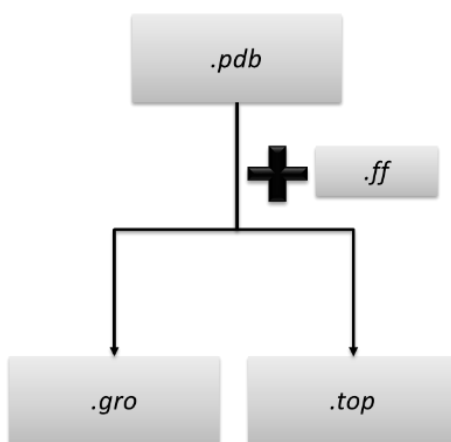


Figura A5. Diagrama de *gmx pdb2gmx*.

Minimización de Energía en el Vacío

Generados los archivos y el *.top*, fue necesario minimizar la energía (energy minimization, EM), de PCL-20 en vacío, lo cual es un procedimiento estándar de cualquier dinámica molecular. La EM debe eliminar toda la energía cinética del sistema y reducir el ruido térmico, posibilitando que varias dinámicas sean comparables (Casado and Javier, 2011). En el paso de EM evita que la

dinámica molecular fallé por la generación de artefactos producto de fuerzas moleculares excesivas, por una desfavorable posición inicial de los átomos. En necesario mencionar que los átomos dibujados con el software Avogadro no necesariamente tiene una significancia física y dos grupos pueden quedar muy juntos o con conformaciones erróneas.

Para minimizar la energía del sistema se requiere de la topología (.top), de la estructura (.gro) y los parámetros de control de la simulación (.mdp) (Figura A6.) , donde se especifican el termostato, baróstato, tipo de interacciones a utilizar, etc.

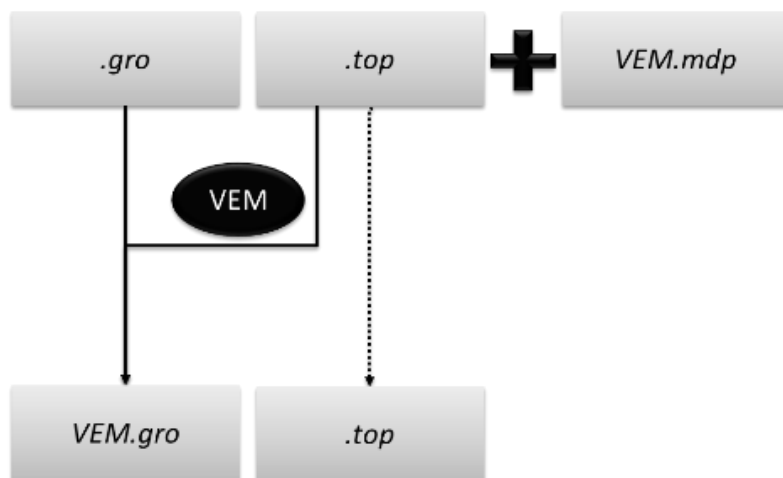


Figura A6. Diagrama de Minimización de Energía.

Se utilizó el comando:

```
$gmx grompp -f minim.mdp -c PCL-20.gro -p PCL-20.top -o PCL-20_EM.tpr
```

El comando *gmx grompp* es un preprocesador que combina la estructura, topología y parámetros de control en un formato .tpr para la posterior simulación. En este paso *gmx grompp* busca errores potenciales e incoherencias que puedan hacer fallar la dinámica.

Pasado ese control, se realizó la EM (paso de dinámica molecular) con el comando:

```
$gmx mdrun -deffnm PCL-20_EM -c PCL-20_EM.gro
```

Con el comando se modificó el *.gro* al mover los átomos en busca de posiciones favorables, sin embargo el archivo *.top* se mantiene inalterado.

Se obtuvieron archivos que contienen la trayectoria (*.trr* y *.xtc*) de los átomos y la energía (*.edr*) del sistema. Del *.edr* se extraen por ejemplo los datos de energía potencial versus tiempo del sistema en formato *.xvg*. Estos datos se grafican utilizando software como *Gnuplot* o *Grace*. Estos gráficos deben llegar a una energía potencial estable como muestra la Figura A7.

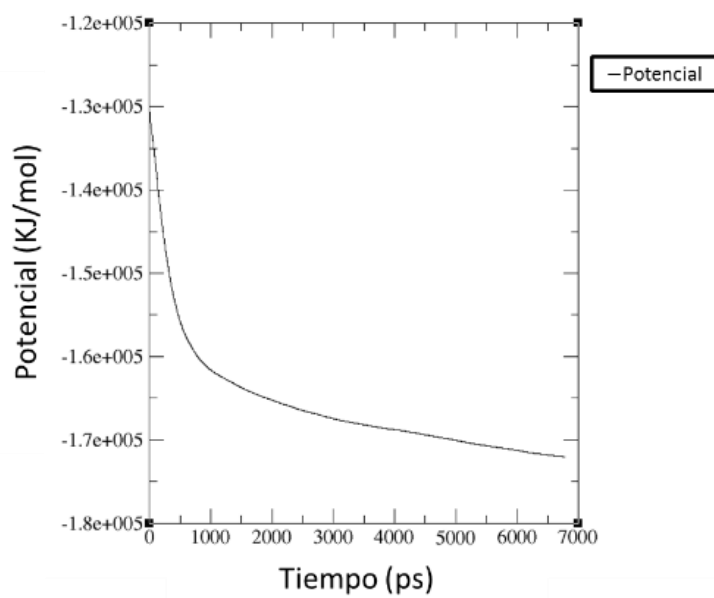


Figura A7. Ejemplo de estabilización de la energía potencial de un sistema.

Generación de la caja y solvatación de la PCL-20

Luego de la EM en vacío, se procedió a generar una caja con agua a su alrededor (Figura A8.).

Se utilizó el siguiente comando para generar la caja:

```
$gmx editconf -f PCL-20_EM.gro -o PCL-20_pbc.gro --c -d 1.0 -bt cubic
```

Para agregar el agua *SPC* se usó el comando:

```
$gmx solvate -cs -cp PCL-20_pbc.gro -o PCL-20_solvatado.gro -p PCL-20_solvatado.top
```

El agua *SPC* (*simple point charge*) se utilizó por ofrecer una buena razón precisión/tiempo de computación.²⁸

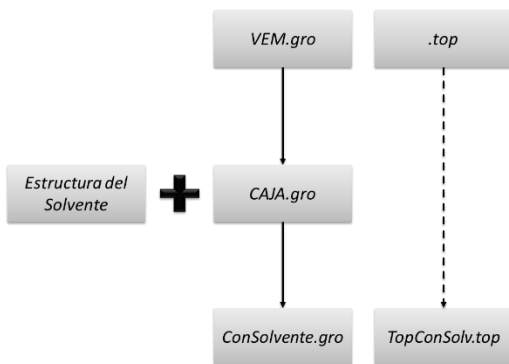


Figura A8. Diagrama de *gmx editconf* y *gmx solvate*.

Con la topología conteniendo la información del solvente y el archivo *.gro* con la información de una molécula de PCL-20 rodeada de agua SPC., se procedió a un nuevo paso de EM. El agregar solvente puede generar interacciones indeseadas y solapamiento de átomos, por esta razón fue necesario volver a realizar un EM del nuevo sistema.

Se utilizó el mismo par de comandos de EM:

```
$gmx grompp -f minim.mdp -c PCL-20_solvatado.gro -p PCL-20_solvatado.top -o  
PCL-20__solvatado.tpr
```

```
$gmx mdrun -deffnm PCL-20_solvatado -c PCL-20_solvatado.gro
```

Equilibración del sistema

Después de la segunda minimización de energía, se procedió a realizar la equilibración del sistema. En este paso se ajusta la temperatura (*constant Number of particles, Volume, and Temperature, NVT*) y luego la presión del sistema (*NPT*). Los pasos son idénticos a una EM, excepto que se utilizan distintos archivos .mdp (Figura A9.).

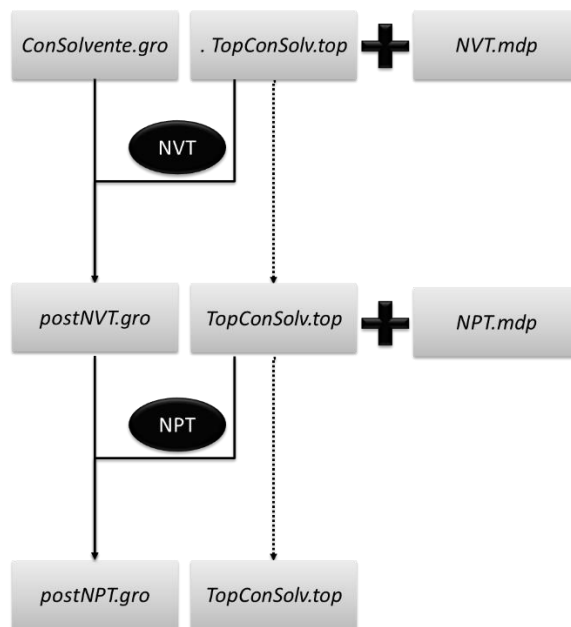


Figura A9. Diagrama de equilibración del sistema.

El control principal después de realizar NVT es la temperatura constante como se ejemplifica en la Figura A 10.

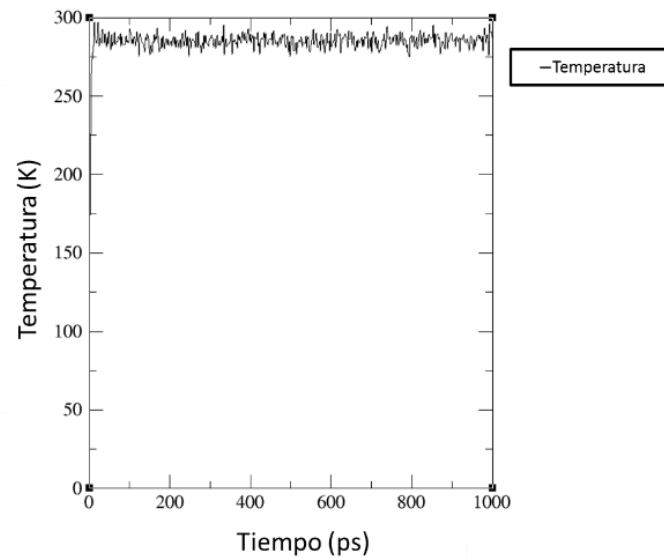


Figura A 10. Ejemplo de estabilización de la temperatura del sistema.

Luego de que el sistema se encontró a temperatura constante, se realizó la equilibración NPT. Los principales controles de NPT son la densidad (Figura A11.) y presión del sistema constantes (Figura A12.).

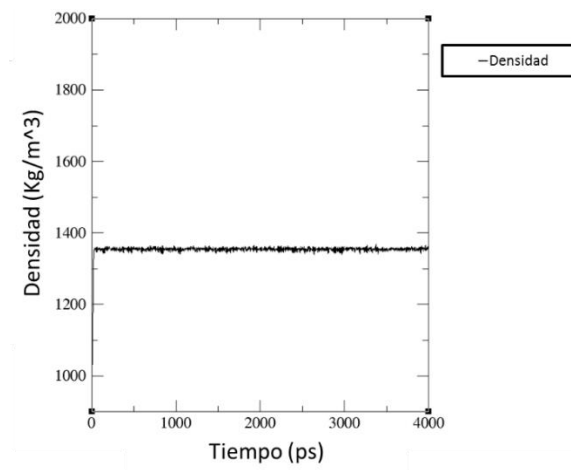


Figura A11. Ejemplo de estabilización de la densidad del sistema.

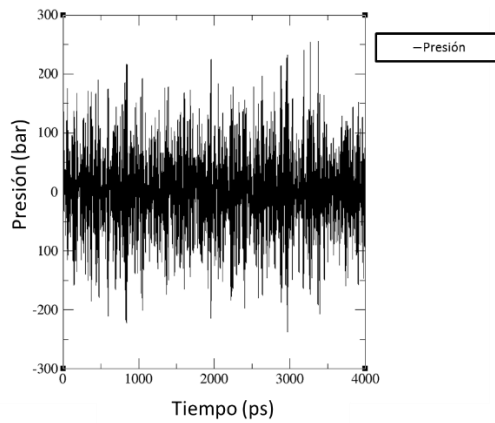


Figura A12. Ejemplo de estabilización de la presión del sistema.

Dinámica Molecular

Equilibrado el sistema por NPT es posible realizar una dinámica molecular. Los comandos son los mismos de EM, NVT y NPT, la única diferencia es que en el archivo *.mdp* se eliminan las restricciones de posición, se aumenta el tiempo de dinámica y opcionalmente, se modifica el intervalo de tiempo para la colección de datos (para no generar archivos muy grandes) (Figura A13.).

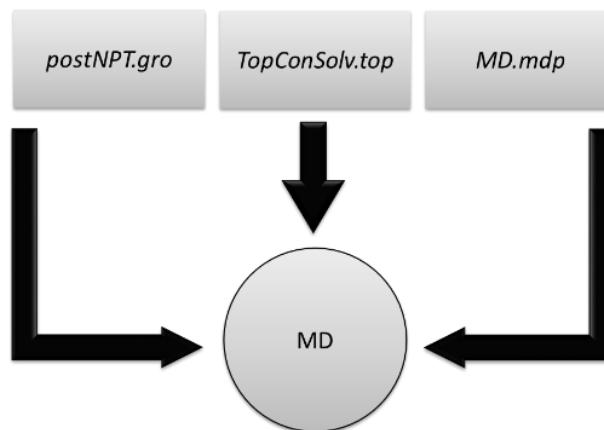


Figura A13. Diagrama de la dinámica molecular.

ANEXO III

DETALLES DEL MÉTODO PARA MD USANDO GROMACS PARA MODELO *COARSE GRAIN*

Mapping

El concepto *Mapping* se refiere a la conversión de una estructura atómica en una CG. La conversión se realizó con el *script backward.py*, se modificó para que reconociera los fragmentos del polímero y se utilizó en forma inversa (*Atom* → *CG*) al uso habitual (*CG* → *Atom*). El *Mapping* se realizó de acuerdo a la Tabla 1.

Se debieron crear archivos con las instrucciones (Figura A14.) para convertir el *.gro* atómico en un *.gro CG* (Figura A15.).

```
[ molecule ]
LIG

[ martini ]
S A B

[ mapping ]
gromos

[ atoms ]
 1 C2 S
 2 H3 S
 3 H4 S
 4 C3 S
 5 H5 S
 6 H6 S
 7 C4 S
 8 H7 S
 9 H8 S
10 C5 A
11 H9 A
12 H10 A
13 C6 A
14 O1 A
15 O2 B
16 C1 B
17 H1 B
18 H2 B
```

Figura A14.: Instrucciones para conversión de modelo atómico a Coarse Grain por script backward.py.

1LIG	C2	23	6.854	4.831	0.588	-1.0709	0.5634	-0.2553
1LIG	H3	24	6.765	4.778	0.614	0.1170	0.4270	-0.1090
1LIG	H4	25	6.916	4.832	0.677	-0.9362	-0.4323	-0.8534
1LIG	C3	26	6.943	4.770	0.479	-0.6215	-0.2805	0.5873
1LIG	H5	27	6.872	4.735	0.402	-2.4237	0.5611	0.4540
1LIG	H6	28	6.999	4.850	0.422	1.9395	2.0923	0.0704
1LIG	C4	29	7.031	4.655	0.528	0.6098	0.6502	-0.3561
1LIG	H7	30	6.962	4.596	0.585	1.0308	0.7882	-0.0596
1LIG	H8	31	7.099	4.693	0.602	-0.6257	-0.7192	1.5435
1LIG	C5	32	7.113	4.593	0.414	-0.8622	0.9918	0.5527
1LIG	H9	33	7.220	4.578	0.449	2.2096	-2.0332	-3.0467
1LIG	H10	34	7.100	4.655	0.326	-1.7233	-4.8560	-0.5546
1LIG	C6	35	7.063	4.456	0.362	-0.2057	-0.3481	-0.9764
1LIG	O1	36	6.957	4.412	0.408	0.4882	-0.3249	-0.9296
1LIG	O2	37	7.156	4.379	0.296	0.2852	-0.3596	0.2696
1LIG	C1	38	7.110	4.250	0.248	0.2868	-0.0888	-0.0412
1LIG	H1	39	7.023	4.218	0.309	2.0311	3.1991	-0.2774
1LIG	H2	40	7.193	4.181	0.271	1.4206	0.4028	-0.5809



1LIG	S	4	6.938	4.749	0.544			
1LIG	A	5	7.091	4.539	0.392			
1LIG	B	6	7.120	4.257	0.281			

Figura A15. Extractos de la conversión del modelo atómico a Coarse Grain (mapping) con el script *backward.py*. Se observa como ocurre la reducción de partículas de un modelo a otro.

El modelo atómico de la PCL-20 se convirtió en el modelo CG (PCL-CG)

Con el *.gro* en CG, fue necesario generar un archivo *.itp* de forma manual para especificar desde los enlaces y ángulos entre las *beads*, hasta sus interacciones no-enlazantes. Los valores utilizados se encuentran en la Tabla 2., Tabla A4. y Tabla A5.

Tabla A4. Parámetros de stretching de las Beads.

Enlace	k_{θ} (kJ/mol/nm ²)	nm
S-A	3932,960	0,29
A-B	6778,080	0,27
B-S	11054,128	0,28

Tabla A5. Parámetros de bending de las Beads.

Ángulo	k_{θ} (kJ/mol/rad ²)	θ_0 (°)
S A B	13,8072	131,780293
A B S	13,3888	130,061419
B S A	5,0208	166,157761

Realizadas estas modificaciones, se hizo una EM de la PCL-CG al igual que los modelos atomísticos. Luego PCL-CG se incorporó dentro de una caja de agua CG pre-equilibrada a 300 K y 1 bar⁷⁷ utilizando el comando:

```
$gmx solvate -cp PCL-CG.gro -cs CajaDeAgua.gro -vdwd 0.21 -o PCL-CGsolvado.gro
```

La opción `-vdwd` impide que se coloquen dos moléculas a una distancia menor a 0,21 nm; evitando la generación de artefactos.

Los pasos siguientes son los mismos que se realizaron para un modelo atomístico de EM, NVT, NPT y la DM, la gran diferencia es que se debió generar un archivo *index* (.ndx) para informar a Gromacs que el sistema era un polímero compuesto por 60 *beads* (S, A y B) en una caja rodeada por 4425 *beads* de agua (W).