



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD CUAJIMALPA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DESARROLLO DE NANOEMULSIONES COMO NANOSISTEMAS DE
TRANSPORTE DE ÁCIDO RETINOICO *ALL TRANS* PARA SU APLICACIÓN
EN CÁNCER PULMONAR

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

PRESENTA
MARÍA LUISA DE LOURDES PÉREZ GONZÁLEZ

COMITÉ TUTORAL
Dra. Claudia Haydée González de la Rosa (Codirectora)
Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde (Codirector)
Dr. Arturo Rojo Domínguez (Asesor)

Ciudad de México, 17 de enero de 2022

El presente trabajo fue realizado en los Laboratorios de “Biología Celular” y “Química y Farmacología”, ambos del Departamento de Ciencias Naturales de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería, bajo la dirección de la Dra. Claudia Haydée González de la Rosa y del Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde del Departamento de Ciencias Naturales de la División de Ciencias Naturales e Ingeniería. El asesoramiento del presente trabajo estuvo a cargo del Dr. Arturo Rojo Domínguez.

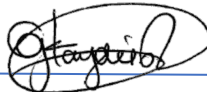
El autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para sus estudios de doctorado, con el número de registro 229662, que comprendió del periodo de octubre de 2009 a septiembre de 2012. El doctorado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además, cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio PFP-20-93.

El jurado designado por La Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la tesis que presentó:

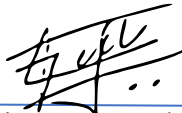
María Luisa de Lourdes Pérez González

Fecha de aprobación de la tesis

JURADO:



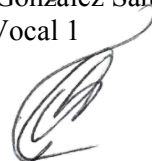
Dra. Claudia Haydée González de la Rosa
Presidente



Dr. Hiram Isaac Beltrán Conde
Secretario



Dr. Ignacio González Sánchez
Vocal 1



Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda
Vocal 2



Dr. Arturo Rojo Domínguez
Vocal 3

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer de manera general a todo el comité tutorial que aceptó la propuesta de acompañarme a descubrir el “Mundo nano”, en un momento que aún no era tan explorado, el cual está lleno de nuevas posibilidades científicas por descubrir.

Dra. Claudia Haydée González de la Rosa me gustaría expresarle mi más sincero agradecimiento por la orientación, paciencia y por mostrarme el cultivo celular como una herramienta para estudiar el cáncer y tener la oportunidad de probar vehículos de tamaño nano, que por pequeños que sean pueden ayudar a combatirlo.

Dr. Hiram Beltrán Conde quisiera ofrecer mi agradecimiento especial por el tiempo, por su guía, por mostrarme que la tecnología farmacéutica es química aplicada y por enseñarme que *“la ciencia no se responde con cualquier cosa, se responde con lo que se sabe, con lo que se entiende y con lo que se puede explicar de manera lógica”*.

Dr. Arturo Rojo Domínguez le estoy particularmente agradecida por su asesoría, apoyo y por enfatizar la importancia del detalle de los datos, para demostrar los resultados y el conocimiento adquirido del trabajo de investigación.

Estoy particularmente agradecida con el jurado del Pre-examen doctoral de manera especial al Dr. Carlos Tomás Quirino Barreda y al Dr. Ignacio González Sánchez por sus comentarios pertinentes y detallados que enriquecieron la tesis, así como las observaciones brindadas por la Dra. Elena Aréchaga Ocampo y el Dr. Cuauhtémoc Pérez González.

Deseo reconocer la ayuda proporcionada por el Dr. Jorge Castañeda Sánchez Coordinador del Doctorado de CBS de la UAM y especialmente a Vicente Cuauhtonal Gallegos Meza por su invaluable apoyo y pronta respuesta a los requerimientos para adquirir el grado doctoral.

De manera personal quiero enfatizar que, al tratarse mi tercera tesis profesional, tengo la oportunidad de agradecer nuevamente a las personas que han estado presentes acompañando, iluminando y motivando cada día de mi vida, como son todos mis seres queridos:

Miguel Pérez Rossell y María Luisa González Aranda por darme la vida, por mostrar el camino de la tenacidad, guiando, iluminando y acompañarme para cumplir todas las metas propuestas.

Ángel Prado Mandujano por ser mi compañero y estar presente alentando todos mis proyectos

Pablo Noriega Robles por enriquecer y complementar nuestras vidas

Laura Angélica Prado Pérez, por ser la razón de mi existencia, felicidad e incentivo para ser mejor en cada una de mis facetas

Amelia Catalina Noriega Prado por existir e iluminar toda mi vida con tan solo una sonrisa.

Finalmente, quisiera agradecer a la UAM, Facultad de Química de la UNAM y USP que influyeron en mi formación académica, así como a mis hermanos, sobrinos, compañeros y amigos por su apoyo, ánimo, cariño y amistad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	4
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
Nanosistemas de transporte (NST)	8
Nanoemulsiones (NE)	9
Preformulación de nanoemulsiones	11
Naturaleza química de la fase oleosa (F _O)	11
Naturaleza química de la fase tensoactivo	12
Propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones	13
Propiedades fisicoquímicas de la fase interna.....	14
Solubilidad.	14
Polaridad.	16
Concentración de saturación del tensoactivo.	16
Volumen molar del aceite	16
Fuerzas interparticulares	17
Tensión superficial.	17
Concentración micelar crítica (CMC).....	17
Viscosidad.....	18
Propiedades fisicoquímicas de la fase tensoactivo.....	19
Propiedades fisicoquímicas de la interfase (I _F).....	19
Propiedades fisicoquímicas de la fase externa	22
Termodinámica de las emulsiones	22
Clasificación de los sistemas dispersos heterogéneos.....	23
Desarrollo de nanosistemas de transporte (NST)	24
Métodos de fabricación de nanoemulsiones	26
Reducción de tamaño de partícula de FI.....	27
Caracterización de las nanoemulsiones	28
Estudios de estabilidad por método dispersión dinámica de luz.....	28
Estudios de estabilidad por método calorimétrico (DSC).....	29
Estudio de anaquel para determinar la estabilidad.....	30
Principios activos en estudio: Retinoides	30
Determinación de actividad biológica del ATRA	31
Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)	31
Tratamiento con ATRA contra el CPCNP	32
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	34

HIPÓTESIS	34
OBJETIVOS.....	34
Objetivo General.....	34
Objetivos Particulares	34
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Materiales: Reactivos y disolventes	35
Materiales: Equipos	35
Reductores de tamaño de partícula: homogeneizador ultrasónico	35
Determinación de tamaño de partícula.....	35
Determinación de estabilidad térmica a través de DSC.....	36
Determinación de morfología de los NST a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM)..	36
Métodos	37
Obtención de las nanoemulsiones	37
Etapas 1. Diseño y preformulación de nanoemulsiones (NE)	38
Factores intrínsecos de la formulación.....	38
Fase 1: Naturaleza química de las fases del sistema: F_O , F_S y F_w	39
Fase 2: Estructura química de las fases: F_O y F_S	39
Fase 4. FS no iónica adicionada externamente.	41
Fase 5. Variaciones de la concentración en la F_O	41
Etapas 2. Desarrollo de NE: Nanoemulsiones.....	42
Factores extrínsecos de la producción de NE	42
Fase 1. Tipo de agitación de baja y alta energía	42
Influencia del tipo de premezclado: con agitación mecánica.....	43
Método de premezclado mecánico-sonicación: PS_1	43
Método de premezclado mecánico y sonicación: PS_2	43
Fase 2. Orden de adición de los componentes en la formulación	43
Fase 3. Método premezclado-sonicación-reposo: PSR	43
Fase 4. Temperatura de emulsión y la velocidad de enfriamiento	44
Método temperatura de emulsificación a 20°C: PSR_3	44
Método temperatura de emulsificación a 70°C: PSR_4 y PSR_5	44
Fase 5. Efecto del tiempo de estabilidad del tamaño de partícula	44
Fase 6. Combinación de técnicas de homogenización: PSR_6	44
Etapas 3. Caracterización de las NE	45
Aspecto físico.....	45
Tamaño de partícula.....	46
Tratamiento de las muestras en estudio	46
Determinación morfológica mediante microfotografía.....	46
Etapas 4. Estudios de estabilidad de NE por calorimetría de barrido diferencial	46

Etapa 5. Estudio de citotoxicidad de las NE	47
Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> de la NE por cultivo celular	47
Líneas celulares NL20 y A549.....	47
Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> de la NE.....	48
Método de citotoxicidad de la NE _V por el método WST	48
Siembra de línea celular en placa con 96 pozos.....	48
Preparación de las soluciones de trabajo al 0.05% de la NE _V en medio DMEM-F12	48
Método de citotoxicidad de la NE _C con ATRA por el método WST	48
Siembra de las líneas celulares en placa con 96 pozos.	48
NE _C en % peso.	49
Solución Stock para obtener la NE _C con 20 μM de ATRA	49
Preparación de la NE _C con ATRA	49
Obtención de la solución de trabajo de	49
Ensayo WST de la NE _C	50
Determinación de valores de la IC ₅₀	50
Determinación de valores de la IC ₅₀ de ácido oleico	51
Determinación de valores de la IC ₅₀ de polisorbato 80.....	51
Determinación de valores de la IC ₅₀ de la NE _V	51
Análisis estadístico.....	51
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
Etapa 1. Diseño de las nanoemulsiones	52
Factores intrínsecos de la formulación.....	52
Desarrollo de NST con.....	52
Estudio de adición de F _S externo.....	53
El	53
Naturaleza química de la F _S :	56
Concentración de FO.....	57
Desarrollo de formulaciones con concentraciones variables de F _O y fijas de F _S	59
Etapa 2. Desarrollo y Caracterización de las nanoemulsiones	61
Factores extrínsecos del proceso (F _{EP}).....	61
Tiempo y tipo de agitación: mecánica y ultrasónica.....	62
Orden de adición de FS en las fases FO o FW.....	66
Método premezclado-sonicación-reposo: PSR.	67
Temperatura de emulsión y velocidad de enfriamiento.	68
Muestras finales PSR ₄ y PSR ₅ : temperatura de emulsión a 70°C	69
Muestras finales PSR ₆ : Estudio del orden de adición de la F _W	72
Muestras finales PSR _F	73
Etapa 3. Estudio de estabilidad	74
Estudio de estabilidad por apariencia física	75
Morfología microscópica	76
Estudio de estabilidad por calorimetría.....	76
Etapa 4. Estudio de citotoxicidad de NE	82
Cultivo celular de línea celular A549.....	82
Determinación de IC ₅₀ de ATRA en células A549	83
Determinación de IC ₅₀ de la NE en células A549.....	84

Determinación de IC ₅₀ de la NE en células NL20	86
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	89
CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
ANEXOS: 1.- ARTÍCULO.....	108
ANEXOS: 2.- PATENTE EN TRÁMITE.....	123

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las características diferenciales entre nanoemulsiones, microemulsiones y macroemulsiones.....	10
Tabla 2. La clasificación FS utilizados para la obtención de nanoemulsiones pueden ser aceites, triglicéridos y tensoactivos no iónicos.....	12
Tabla 3. Estructura química de las fases: FO y FS para la obtención de nanoemulsiones para evaluar la interacción de la estructura química de la FO con FS (5% PS ₈₀) a concentración constante sustituir la FO con AO y OA como muestras de estudio.....	40
Tabla 4. Obtención del tensoactivo aniónico <i>in situ</i> , oleato de potasio y tensoactivo catiónico <i>in situ</i> , cloruro de oleilamonio.....	40
Tabla 5. Descripción de las seis fases de la metodología para evaluar los factores extrínsecos de la producción (FEP).....	42
Tabla 6. Comparación de métodos de NE variando factores extrínsecos de producción.....	45
Tabla 7. Comparación de la concentración de las NE _V y NE _C con ATRA por el método WST en células A549. a) solución stock de ATRA 100%; b) Formulaciones al 100% de las NE _V y NE _C en %W y c) NE _V y NE _C en 1 ml de solución de trabajo.....	50
Tabla 8. Obtención de NST con oleato de potasio <i>in situ</i> a partir de una reacción estequiométrica 1:1 de ácido oleico y agua.....	53
Tabla 9. Obtención de NST con oleilamonio <i>in situ</i> a partir de una reacción estequiométricamente 1:2 de oleil amina, ácido clorhídrico y agua.....	53
Tabla 10. Determinaciones de efecto en el tamaño de partícula y estabilidad de las formulaciones DSS1; DSS2; DSS3 y DSS4 utilizando DSC: a), c), e), g), i) y DLS b), d), f), h).....	54
Tabla 11. Estudio de NST con relación F _O :F _S :F _W (AO/P ₈₀ /W) obtenidos con tensoactivo. a) no iónico a 20 ± 2°C y b) no iónico 70°C y observación con luz transmitida (LT) y refractada (LR).....	55
Tabla 12. Análisis comparativo de los tamaños de partícula de las muestras obtenidas por: A) el método 2 _A , PS ₈₀₋₁ y PS ₈₀₋₂ y B) el método 2 _O , PS ₈₀₋₂ y PS ₈₀₋₃ utilizando DLS y DSC.....	56
Tabla 13. Comparación de los resultados del tamaño de partícula utilizando DLS y comportamiento térmico por DSC en las muestras OA1 y OA2 en concentraciones 1.5 y 2.5 % de FO, respectivamente... 58	58
Tabla 14. Comparación de los resultados del tamaño de partícula utilizando DLS y comportamiento térmico por DSC en las muestras con ácido oleico al 2.5 % y alcohol oleico 2.5%.....	58
Tabla 15. Análisis comparativo de las condiciones de estudio para obtener NE _{O/W} y sus efectos sobre el tamaño de partícula D [nm] y polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD). Los sistemas M ₁ , PS ₂ y PSR ₃₋₅ tienen una distribución multimodal.....	61
Tabla 16. Caracterización de las muestras 1, 2 y 3 obtenidas por: a) método Tam-TAM y b) método TAM por determinación de tamaño de partícula en tiempo inicial y 30 días por DLS.....	63
Tabla 17. Comparación de las condiciones de estudio para obtener NE _{O/W} y sus efectos sobre el tamaño de partícula (D [nm]) y polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD). Los sistemas M ₁ , PS ₂ y PSR ₃₋₅ todos tienen una distribución multimodal.....	66
Tabla 18. Tabla comparativa de las muestras: a) 2, b) 2 _A y b) 2 _O diámetros/radios hidrodinámicos de partículas en nanómetros de los métodos 2, 2 _A y 2 _O utilizando DLS y los gráficos comparativos del 1°, 2° y 3er termogramas de los métodos 2 _A y 2 _O , utilizando DSC.....	67
Tabla 19. Comparación de las metodologías 2 _A y 2 _O a temperatura de emulsión (T°C) _{Emul} de 20 °C, determinando los diámetros de partículas en nanómetros y la polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD) de los métodos PS _{2a-c} y PSR ₃	68
Tabla 20. Comparación del efecto de la temperatura de emulsión de 70° C. 1) método de disolución del tensoactivo en la fase acuosa (Método 3 _A): 1a) efecto de la temperatura en el tamaño de partícula y 1b) comportamiento térmico, y 2) método de disolución del tensoactivo en la fase oleosa (Método 3 _O): 2a) efecto de la temperatura de emulsión en el tamaño de partícula y 2b) comportamiento térmico y el diámetro (nm)/ IPD.....	69

Tabla 21. Comparación de las condiciones para obtener una NE _{O/W} a temperatura de emulsión (T _{emul}) de 70°C y la velocidad de enfriamiento (V _{EF}), determinando el tamaño de partícula D(nm) y polidispersidad/índice de polidispersidad [%PD/IPD] en los métodos PSR ₄ y PSR ₅ que tienen una distribución monomodal.....	70
Tabla 22. Comparación en el tamaño de partícula y su comportamiento térmico de nanoemulsiones en periodos cortos de tiempo, determinadas desde inicio (T ₀), a las 24 (T ₂₄) y a las 48 horas (T ₄₈) obtenidas con el tensoactivo polisorbato 80 (PS ₈₀₋₂), utilizando DLS y DSC.....	71
Tabla 23. Las condiciones para obtener NE _{O/W} y sus efectos sobre el tamaño de partícula D(nm) y polidispersidad/índice de polidispersidad [% PD/IPD].....	72
Tabla 24. Verificación de la formulación final de la NE _{O/W} comparando el tamaño de partícula (D [nm]) y polidispersidad/índice de polidispersidad [% PD/IPD].....	73
Tabla 25. Deconvolución de picos DSC, T [°C], ΔH [kcal·mol ⁻¹], Capacidad calorífica Cp [kcal·(mol·°C) ⁻¹] y Ancho del pico a la mitad de la altura [APMA, °C].....	78
Tabla 26. Comparación de IC ₅₀ del ATRA: a) ATRA libre y b) NE con ATRA en estudios similares.....	83
Tabla 27. Estudios para determinar el IC ₅₀ de ATRA en células A549 variando concentraciones de ATRA, condiciones de incubación de líneas celular en la placa y tiempo de reacción colorida.....	84
Tabla 28. Determinación de porcentaje de inhibición celular: a) Comparación del AO libre: NL20 del estudio; Neuroblastoma de ratón, NB-R ¹ ; Tumor hepático HepG2 ² ; Efecto hemolítico ³ y AO libre comparado con cuatro líneas celulares; b) NE _C con ATRA del estudio comparado con AO en las nanocápsulas (NC) ⁴ y si incremento al nanoestructurarse; c) PS ₈₀ libre del estudio comparado con las líneas celulares: NL20; Fibroblastos (Fb) ⁵ ; Caco-2 ⁵ ; Vero ⁶ y MA 104 (MA) ⁶ y d) la NE _C . del estudio el PS ₈₀ redujo su toxicidad al igual que las otras células.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interfaz F_w - F_o . a) Ecuación para determinar la densidad de moléculas del tensoactivo y b) Formación de interfaz (I_f) entre la fase acuosa (F_w), la fase oleosa (F_o) y el espesor de la interfaz (h).....	20
Figura 2. Estructura química del ácido retinoico <i>all trans</i> (ATRA), con sus partes: hidrofóbica, hidrofílica y su cadena poliénica.	31
Figura 3. Diseño de flujo de la metodología de obtención de NE se dividió en cinco etapas que se clasificaron con base a los objetivos a demostrar.	37
Figura 4. Descripción de las cinco fases de la metodología para evaluar los factores intrínsecos de la formulación (FIF).	39
Figura 5. Caracterización por el comportamiento térmico de las muestras M1, M2 y M3 obtenidas por el método 1, a tiempo: a) inicial y b) después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente utilizando DSC.	64
Figura 6. Distribuciones de tamaño de diámetro [nm] por DLS de los sistemas obtenidos por los métodos PSR6 _{a-d} y PSR _{Final}	74
Figura 7. Comparación por apariencia: a) La muestra M4 presenta mayor transparencia y opacidad; b) Muestras M6 y M7 a contraluz; c) Muestra M6 y M7 con luz frontal; d) M2 a M6, se observa transparencia y opalescencia rojiza contra luz a diferencia de la M7 que presenta un color blanco y opacidad; e) M2 a M6, muestran transparencia y opalescencia rojiza contra luz a diferencia de la M7 que presenta un color blanco y opaco.	75
Figura 8. Microfotografías TEM 100kx de PSR6c/PSRF (2% ácido oleico, 5% de polisorbato 80 y 93% de agua) evidenciando tamaños de partícula entre 65-120 nm.	76
Figura 9. Termogramas estandarizados obtenidos por el método DSC 3x3 a partir de 3 ciclos de calentamiento de las muestras: a) PSR6b (1.5:5.0, FO:FS), b) PSR6c (2.0:5.0, FO:FS) y c) PSR6d (2.5:5.0, FO:FS).	78
Figura 10. Los termogramas fueron normalizados por deconvolución en 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6b y determinando su ΔH kcal·mol ⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3; la optimización de la deconvolución fue lograda con 7 curvas que describen el contenido estadísticamente.	81
Figura 11. Los termogramas se normalizaron mediante la desconexión de 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6c para determinar los ΔH kcal · mol ⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3. La optimización de la deconvolución se logró con 5 curvas para describir estadísticamente la envolvente.	81
Figura 12. Los termogramas se normalizaron mediante la desconexión de 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6d para determinar los ΔH kcal · mol ⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3; La optimización de la deconvolución se logró con 6 curvas para describir estadísticamente la envolvente.	81
Figura 13. Gráficos comparativos en porcentaje de inhibición de la proliferación de células A549 contra concentraciones de ATRA en μM y tiempo de tratamiento. En los incisos a) IC_{50} de 57 μM de ATRA en la prueba 1; IC_{50} de 59 μM de ATRA en la prueba 2 y b) prueba 2 con ATRA sin nanoestructurar utilizaron concentraciones de 25.0, 35.0, 45.0, 50.0, 65.0, 85.0 100.0 μM ; c) concentraciones de 0.005, 001, 005, 010, 0.05 % de la NE _v y d) NE _c 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 y 100.0 μM	85
Figura 14. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células NL20 por diferentes concentraciones de soluciones de a) Ácido oleico, μM b) PS80 en agua y c) NE en medio de cultivo con diferentes radios PS ₈₀ / AO (2 = 20/37; 3 = 40/74; 4 = 60/111; 5 = 80/148 y 6 = 100/185), correspondientes a valores de IC_{50} de 1123 μM de AO, 2.6 μM de PS ₈₀ y 21.8/37.9 de μM PS ₈₀ /AO en la NE. d) Análisis estadístico de la IC_{50} de AO y PS ₈₀ libre y en la NE (promedio \pm SEM, p <0.001; p <0.0001).	88

ABREVIATURAS

Abreviaturas Significado

ΔA	Área superficial
A549	Línea celular de carcinoma epidermoide pulmonar (tipo histológico de CPCNP).
AO	Ácido oleico
[APMA, °C]	Ancho del pico a la mitad de la altura
ATRA	Ácido retinoico <i>all trans</i>
CD	Coefficiente de difusión
CMC	Concentración micelar crítica
C _p	Capacidad calorífica en kcal · °C ⁻¹
CPCNP	Cáncer de pulmón de células no pequeñas
CPCP	Cáncer epitelial de pulmón excepto el cáncer de pulmón de células pequeñas
D	Diámetro de partícula en nanómetros
(D/Rh)nm	Relación Diámetro hidrodinámico en nm/ Radio hidrodinámico en nm
DLS	Dispersión dinámica de luz (siglas en inglés <i>Dynamic light scattering</i>)
DMEM	Medio modificado de MEM (siglas en inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfoxido (siglas en inglés, <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DS	Distribución que puede ser desde monomodal, bimodal hasta multimodal
DSC	Calorimetría de barrido diferencial (siglas en inglés <i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
DSC 3x3	Método en DSC ciclo de 3 calentamientos y enfriamientos
DSS	Dodecil sulfato de sodio
ρ	Densidad
ρ_i	Densidad total de moléculas
ρ_s	Densidad total de moléculas del tensoactivo
FE	Fase externa
F _{ext}	Factores extrínsecos
F _{EP}	Factores extrínsecos del proceso
FI	Fase interna
F _{int}	Factores intrínsecos
F _{IF}	Factores intrínsecos de la formulación
F _O	Fase oleosa
F _S	Fase surfactante o tensoactiva
F _W	Fase acuosa (w, water)
ΔG	Energía libre de <i>Gibbs</i>
γ	Tensión superficial
ΔH_s	Entalpía de la solución
HLB	Balance lipofílico hidrofílico (siglas en inglés de <i>Hydrophilic Lipophilic Balance</i>)
HLBr	HLB requerido del sistema
HLD	Desviación lipofílica hidrofílica (siglas en inglés, <i>Hydrophilic Lipophilic Deviation</i>)
HLDN	Desviación lipofílica hidrofílica normalizada (siglas en inglés, <i>Hydrophilic Lipophilic Deviation Normalized</i>)
I _{f O/W}	Interfase aceite en agua
IC ₅₀	Concentración inhibitoria al 50%
IPD	Índice de polidispersidad
log P	Logaritmo del coeficiente de partición
%M	Porcentaje mol
M1	Método M1 sin control de la temperatura

M2	Método M2 con control de la temperatura
M ₁ a M ₆	Muestra a temperatura de emulsión de 70 ± 2 °C
MD	Monodisperso (monomodal)
Método 1 _A	Método 1 de dispersión del F _S en la fase acuosa
Método 1 _O	Método 1 de dispersión del F _S en la fase oleosa
Método 2 _A	Método 2 de dispersión del F _S en la fase acuosa
Método 2 _O	Método 2 de dispersión del F _S en la fase oleosa
Método 3 _A	Método 3 de dispersión del F _S en la fase acuosa
Método 3 _O	Método 3 de dispersión del F _S en la fase oleosa
NE	Nanoemulsión
@NE	Nanoestructuración
NEc	Nanoemulsión completa
NE _{O/W}	Nanoemulsiones aceite en agua
NE _V	Nanoemulsión vacía
NE _{W/O}	Nanoemulsiones agua en aceite
NLC	Acarreadores lipídicos nanoestructurados (siglas en inglés, <i>Nanostructured lipid carriers</i>)
NL20	Línea celular de epitelio bronquial humano normal inmortalizada
nm	Nanómetros
NST	Nanosistema de transporte
OA	Alcohol oleico
O/W	Sistemas aceite en agua
PM _n	Peso molecular en número
PM _w	Peso molecular en peso
POE	Derivados de polioxietileno
%PD	Porcentaje de polidispersidad
% PD/IPD	Porcentaje de polidispersidad / índice de polidispersidad
PS	Método premezclado-sonicación
PS ₁	Método premezclado-sonicación con el método M1
PS ₂	Método premezclado-sonicación con el método M2
PS _{2A}	Método 2 _A con temperatura de emulsificación a 20°C:
PS _{2O}	Método 2 _O con temperatura de emulsificación a 20°C:
PS ₈₀	Polisorbato 80
PS _{80-1 a 3}	Polisorbato 80 tres marcas comerciales
PSR ₄	Método 3 _A con premezclado mecánico y ultrasónico a 70°C y variando la velocidad de enfriamiento de 70 a 25°C
PSR ₅	Método 3 _O con premezclado mecánico y ultrasónico a 70°C y variando la velocidad de enfriamiento de 70 a 25°C
PSR ₆	Método de grado de solubilidad de la F _S en la F _W .
PSR _{Final}	Método PSR final
PSR	Método premezclado-sonicación con 2.5 minutos de agitación por 2.5 minutos de reposo hasta completar 15 minutos de agitación total.
R ₁ a R ₆	Muestra a temperatura de emulsión de 20 ± 2 °C
Rh	Radio hidrodinámico en nanómetros
SFB	Suero fetal bovino
ΔS _s	Entropía de la solución
T ₀	Termograma a tiempo inicial
T ₁	Temperatura del primer ciclo de calentamiento de 0 a 120 °C
T ₂	Temperatura del segundo ciclo de calentamiento de 0 a 120 °C
T ₃	Temperatura del tercer ciclo de calentamiento de 0 a 120 °C

T ₃₀	Termograma después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente
T ₄₈	Termograma después de 48 días de almacenamiento a temperatura ambiente
TAm	Premezclado manual
TAM	Agitación mecánica durante 30 minutos
TAU	Tiempo de ultrasonificación
TAM:TAU	Agitación mecánica durante 30 minutos y 15 minutos de ultrasonido
[(T _B) _{WST}]	Tiempo de bioreducción del colorante WST
T _{emul}	Temperatura de emulsión
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (siglas en inglés, <i>Transmission electron microscopy</i>)
φ	Unidad de volumen
V _{Ef}	Velocidad de enfriamiento
WST	WST (siglas en inglés, <i>Water soluble tetrazolium</i>), WST 2-(4- yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H- tetrazolio
W/O	Sistemas agua en aceite
%w/v	Por ciento peso/volumen
%w/w	Por ciento peso/peso
X _o	Fracción molar

RESUMEN

Actualmente, las nanoemulsiones (NE) permiten transportar sustancias de una manera eficiente y estable, debido al tamaño de partícula nanométrico que le proporcionan propiedades y características con gran aplicación en el mundo micro y macro en el que vivimos. Las NE obtenidas en el presente trabajo contienen solo tres componentes: el ácido oleico (AO) como aceite (O) que es la fase oleosa (F_O), el polisorbato 80 (PS_{80}) como tensoactivo (S) encargado de generar la fase surfactante (F_S) y el agua (W) como fase continua, en este caso acuosa (F_W). La NE final fue seleccionada después de un proceso de diseño de experimentos con base al estudio de pre-formulación de los factores intrínsecos de cada componente de la formulación, seguido de una etapa de desarrollo que permitió estudiar las interacciones entre sí, de las F_O - F_S - F_W en la formulación y la influencia de los factores extrínsecos del proceso de fabricación. Obteniendo la mejor formulación [AO: PS_{80} :W] en concentraciones porcentuales [2.0:5.0:93.0] que presentó una relación $F_O:F_S$ [AO]/[PS_{80}]=0.0708/0.0382=1.85 [$\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], lo que implica que 1.85 partes del AO están cubiertas / estabilizadas por 1 parte de PS_{80} , dando lugar a partículas de 71.86 nm, con un índice de polidispersidad (IPD) de 0.42. Estas NE se almacenaron a temperatura ambiente/oscuridad en tiempo real hasta 12 meses evaluando los cambios de apariencia y descartando las NE no estabilizadas, además de determinar sus tamaños de partícula e IPD de las NE estables por dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). De manera complementaria la estabilidad de la NE fue determinada por calorimetría de barrido diferencial (DSC), evidenciando la reversibilidad entre 25 y 100°C mediante tres ciclos de calentamiento hasta 125°C, obteniendo perfiles de calentamiento más atenuados en el segundo y tercer ciclo, en comparación con el primero, lo que indica un estado parcial, pero suficiente, de estabilidad para los medios de almacenamiento. El comportamiento térmico de las NE se modeló empleando una técnica interactiva de deconvolución del termograma de DSC, encontrando que existen entre 5 y 7 funciones gaussianas en función del NST obtenido, que se pueden explicar como barreras para conseguir dicha estabilización y entender los tiempos de anaquel conseguidos experimentalmente. La NE estable sin (NE_V) y con ATRA (NE_C) y a cada uno de los componentes por separado se le realizaron pruebas de citotoxicidad con dos líneas celulares: i) células epiteliales pulmonares normales inmortalizadas (NL20) y ii) células de carcinoma epidermoide pulmonar (A549), como referencia. Para determinar el grado de inocuidad *in vitro* de los componentes del nanosistema de transporte (NST), se estudiaron las NL20 que muestran concentraciones inhibitorias al 50% (IC_{50}) de 1123 μM para el componente AO y de 2.6 μM para el componente PS_{80} . La IC_{50} fue 21.8 μM para PS_{80} nanoestructurado en $PS_{80}@NE$ y de 37.9 μM para AO también nanoestructurado en $AO@NE$, indicando claramente que los componentes cambiaron sus

toxicidades al encontrarse nanoestructurados en las NE. El AO exhibió un aumento de 30 veces (IC_{50} (AO) 1123 → 37.9) mientras que PS_{80} disminuyó 7.9 veces (IC_{50} (PS_{80}) 2.6 → 21.8). Vale la pena recalcar que el PS_{80} es el componente más tóxico de la formulación, pero cuando se incluye en $PS_{80}@NE$, se mitiga la toxicidad, de manera que finalmente se generaron NST menos tóxicos, indicando que estas NE se consideran vehículos NE_V ya que no contienen ATRA. El efecto citotóxico de la NE en las células A549 se determinó con una IC_{50} de 58 μM para ATRA sin nanoestructurar y una IC_{50} de 28.0 μM de $ATRA@NE$, lo que indica claramente que permitió aumentar la fotoestabilidad del ATRA al nanoestructurarse, debido a que está protegido en la NE. Por lo que se requiere utilizar la mitad de la concentración de ATRA (IC_{50} (ATRA) 58.0 → 28.0) o sea $[2.02 = 58.0 \mu M / 28.0 \mu M]$ para tener el mismo efecto citotóxico. Además, se obtuvo la IC_{50} de 0.028% (w/w) de NE_V al comparar con estudios similares encontraron una IC_{50} de 0.03% de PS_{80} libre en células A549.

PALABRAS CLAVE

Nanoemulsión O / W, Ácido oleico, Polisorbato 80, Dispersión dinámica de luz (DLS)
Calorimetría barrido diferencial (DSC), NL20, A549, IC_{50} y Citotoxicidad.

ABSTRACT

Nowadays, nanoemulsions (NE) allow substances to be transported in an efficient and stable way, as a result of the nanometric particle size that provide properties and characteristics with great application in the micro and macro world in which we live.

The NE obtained in the present work contain only three components: oleic acid (AO) as oil (O) which forms the oily phase (FO), polysorbate 80 (PS_{80}) as surfactant (S) in charge of generating the surfactant phase, and finally (FS) and water (W) as continuous phase, in this case of aqueous nature (FW). The final NE developed was selected after a process of experimental design based on the pre-formulation study of the intrinsic factors of each component of the formulation, followed up by a development stage that allowed studying the interactions between them, the $F_O-F_S-F_W$ in the formulation and the influence of extrinsic factors in the manufacturing process. The final formulation [AO: PS_{80} :W] was obtained in percentage concentrations [2.0:5.0:93.0] that presented a relationship $F_O:F_S$ $[AO]/[PS_{80}] = 0.0708 / 0.0382 = 1.85 [mol \cdot L^{-1}]$, which implies that 1.85 parts of the AO are coated / stabilized by 1 part of PS_{80} , giving

rise to particles of 71.86 nm, with a polydispersity index (IPD) of 0.42. After storing the NE at room temperature / darkness in real time for up to 12 months, evaluating the changes in appearance and discarding the non-stabilized NE, in addition to determining their particle sizes and IPD of the stable NE by means of dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM). In a complementary way, the stability of NE was determined by differential scanning calorimetry (DSC), showing the reversibility between 25 and 100°C through three heating cycles up to 125°C, obtaining more attenuated heating profiles in the second and third cycles, compared to the first, which indicates a state of partial but enough stability for the storage means. The thermal behavior of the NEs was modeled using an iterative deconvolution technique from DSC thermograms, finding that there are between 5 and 7 Gaussian functions depending on the NST obtained, which could be explained as barriers to achieve long periods stabilization and thus understanding the shelf times achieved experimentally. Stable NE without (NE_V) and with ATRA (NE_C) and each of the components were separately tested for cytotoxicity with two cell lines: i) immortalized normal lung epithelial cells (NL20) and ii) carcinoma cells pulmonary squamous cell (A549), for reference. The degree of innocuousness *in vitro* of the components of the transport nanosystem (NST) was determined in the NL20 that have shown inhibitory concentrations at 50% (IC₅₀, μM) of 1123 μM for the AO component and 2.6 μM for the PS₈₀ component. The IC₅₀ was 21.8 μM for PS₈₀ nanostructured in PS₈₀@ NE, and 37.9 μM for AO also nanostructured in AO@NE, clearly indicating that the components changed their toxicities when they were nanostructured in the NE. AO exhibited a 30-fold increase (IC₅₀ (AO) 1123.0 → 37.9) while PS₈₀ decreased 7.9 times (IC₅₀ (PS₈₀) 2.6 → 21.8).

It is worth emphasizing that PS₈₀ is the most toxic component of the formulation, but when it is included in PS₈₀@NE, the toxicity is attenuated, so that ultimately less toxic NSTs were generated, indicating that these NE could be considered NE_V vehicles since do not contain ATRA. The cytotoxic effect of NE in A549 cells was determined with an IC₅₀ of 58 μM for ATRA without nanostructuring and an IC₅₀ of 28.0 μM for ATRA@NE, which clearly indicates that it allowed to increase the photostability of ATRA when nanostructured. This latter due to the fact that it is protected in NE, so it is necessary to use half the ATRA concentration (IC₅₀ (ATRA) 58.0 → 28.0) that is $[2.02 = 58.0 \mu\text{M} / 28.0 \mu\text{M}]$ to have the same cytotoxic effect. In addition to the above, the IC₅₀ of 0.028% (w/w) of NE_V was obtained when comparing with similar studies, they found an IC₅₀ of 0.03% of PS₈₀ free in A549 cells.

KEYWORDS

Nanoemulsion O/W, Oleic Acid, Polysorbate 80, Dynamic Light Scattering (DLS)
Differential Scanning Calorimetry (DSC), NL20, A549, IC₅₀ and Cytotox

Capítulo I. INTRODUCCIÓN

La nanotecnología abarca la investigación científica y el desarrollo tecnológico a escala atómica y molecular, para la comprensión básica de los fenómenos y materiales a escala tan pequeña conocidos como nanómetros 1×10^{-9} m (UNESCO, 2007). La aplicación de la materia a nivel nanométrico tiene propiedades emergentes y debido a esto, parte de la nanotecnología se ha centrado en áreas de la salud, generando la nanomedicina como un campo de desarrollo. En esta línea, se utilizan terapias que emplean sustancias estructuradas en escala nanométrica, lo que optimiza la dosis requerida del compuesto activo, modificando sus propiedades fisicoquímicas y optimizando las propiedades farmacológicas deseadas (Jones 2004).

La nanotecnología aplicada a la tecnología farmacéutica desarrolla sistemas de transporte a nivel nanométrico, los cuales se denominan nanosistemas de transporte (NST), que se describen como vehículos o transportadores que protegen a un principio activo y lo llevan al sitio de acción de una manera estable (Vauthier *et al.*, 2007). Se ha evidenciado que los NST de tamaño menor a 100 nanómetros (nm) pueden atravesar los vasos sanguíneos de tumores que se encuentran incrementados en la permeabilidad endotelial debido a la angiogénesis. Algunos de los NST más importantes desarrollados hasta el momento las nanocápsulas (Ferrer-Viñals *et al.*, 2021) y nanoesferas (Pinto Reis *et al.*, 2006^b), las nanosuspensiones (Zhang *et al.*, 2006) y las nanoemulsiones (Pérez-González *et al.*, 2019).

Los NST se han empleado para obtener medicamentos de liberación controlada o para vectorizar fármacos, ya que el tamaño nanométrico le confiere características físicas que le permite transportar el fármaco de manera segura y protegida contra el sistema de defensa al interior del organismo y conseguir su liberación de forma sostenida. Si una empresa estuviera interesada en aplicar alguno de estos sistemas, debería realizarse previamente un estudio de pre-formulación para su aplicación posterior.

Las ventajas principales de los NST consisten en: a) proteger al fármaco que transporta de una degradación previa a llegar al sitio de acción; b) evitar ser secuestrado por el sistema retículo endotelial debido a su tamaño nanométrico y propiciar una mayor afinidad celular cuando tengan carga superficial positiva o negativa (Pinto Reis *et al.*, 2006^a); c) transportar fármacos liposolubles que son difíciles de desarrollar en sistemas convencionales (Tinoco *et al.*, 2018) y d) administrar dosis menores de fármaco, reduciendo efectos secundarios y toxicidad por acumulación en órganos y así optimizar la permanencia intracelular, entre otras.

Una manera importante y eficiente para formular nanoestructuras es mediante la preparación de emulsiones a nanoescala, también conocidas como nanoemulsiones (NE). Los componentes de las

formulaciones farmacéuticas y el ingrediente activo son variables manipuladas para obtener y caracterizar el sistema nanoestructurado y así descubrir su potencial como NST.

En el campo de la innovación se requiere utilizar algunas moléculas como el ácido retinoico *all trans* (ATRA), que ha demostrado tener un efecto potencial antitumoral y que además regula un gran número de procesos celulares: la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, mediante la activación de receptores nucleares. A la interacción del ATRA con el receptor de ácido retinoico beta se le ha adjudicado un papel antioncogénico en tumores sólidos de origen epitelial, como es el cáncer pulmonar (Muñiz-Hernández *et al.*, 2015; Xu 2007). A primera vista, se podría pensar que el ATRA es la molécula adecuada para llevar a cabo estudios antioncogénicos finales, pero se ha observado en ensayos clínicos que puede producir gran toxicidad en las concentraciones que se emplea para tener dicho efecto coadyuvante antitumoral, según el tipo celular de cáncer de pulmón (Arrieta *et al.*, 2010; Richard 2003). Lo anterior puede ser debido a la activación indiscriminada de todos sus receptores naturales a concentraciones altas.

El objetivo del presente proyecto de investigación es nanovehiculizar el ATRA, para lograr cuando menos el mismo efecto de inhibición del crecimiento en las células que causa el ATRA no vehiculizado en líneas celulares de cáncer pulmonar, pero tratando de minimizar los efectos colaterales por no vehiculizarlo y administrarlo en una forma de dosificación y vía de administración idónea para alcanzar directamente las células diana y liberar el ATRA a una menor dosis que los medicamentos existentes.

La presente tesis se enfoca al estudio y el desarrollo de NE, que permiten nanovehiculizar el ATRA de manera estable con aplicación en cáncer de pulmón. La amplia gama de usos se debe, a que la tecnología de preparación de NE requiere de un consumo energético menor, comparado con otros métodos convencionales, aunado a la obtención de partículas con tamaños homogéneos que proporcionan un aspecto interesante en función del fármaco o sustancia que se quiera vehiculizar.

De manera que las NE obtenidas en esta tesis fueron desarrolladas con solo tres componentes: el ácido oleico (AO) como aceite (O) conformando la fase oleosa (F_O), el polisorbato 80 (PS_{80}) como tensoactivo (S) integrando la fase surfactante (F_S) y el agua (W), la cual sería la fase continua, de tipo acuosa (F_W). La NE final fue seleccionada después de un proceso de diseño de experimentos con base al estudio de pre-formulación de los factores intrínsecos de cada componente de la formulación, seguido de una etapa de desarrollo que permitió estudiar las interacciones entre sí, de las fases seleccionadas, F_O - F_S - F_W , en la formulación y la influencia de los factores extrínsecos del proceso de fabricación. Posteriormente las NE obtenidas se caracterizaron mediante observación visual de estabilidad en tiempo real y por calorimetría diferencial de barrido (DSC), además se determinó el tamaño de partícula por dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), obteniendo la mejor formulación [AO: PS_{80} :W] en concentraciones porcentuales [2.0:5:0:93.0]. Esta NE presentó una relación O:S [AO] / [PS_{80}] = $0.0708 / 0.0382 = 1.85$ [$\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$], lo que implica 1.85 partes del AO está cubierta / estabilizada por 1 parte de PS_{80} ,

estructurando partículas de 71.86 nm, con un índice de polidispersidad (IPD) de 0.42. Las NE estables sin (NE_V) y con ATRA (NE_C) y a cada uno de los componentes por separado se les realizaron pruebas de citotoxicidad con dos líneas celulares, en este caso NL20 (epitelio bronquial humano normal inmortalizada) y A549 (carcinoma epidermoide pulmonar, tipo histológico de CPCNP). El estudio con las NL20 permitió determinar que los componentes PS₈₀ y AO modulan su toxicidad al estar nanoestructurados en las NE. De igual manera se determinó que se requiere mayor cantidad de ATRA libre, en comparación cuando el ATRA esta vehiculizado en la NE para tener la misma citotoxicidad en células A549. Por lo que las NE desarrolladas pueden aplicarse para dispersar y proteger sustancias con diferente hidrosolubilidad e inclusive de alta liposolubilidad aumentando la aplicabilidad en fármacos, alimentos y cosméticos.

Capítulo II. MARCO TEÓRICO

La Nanotecnología, se define como “*la habilidad de comprender y manipular la materia a nivel de átomos y moléculas individuales, así como en el nivel supramolecular, incorporando grupos de moléculas entre el intervalo 1-100 nm a fin de crear materiales, dispositivos y sistemas con propiedades y funciones nuevas y emergentes, debido a su pequeña estructura*” (INN 2009). “*El mundo nano se puede ver a simple vista, solo se requiere contemplar el horizonte y ver el color rojizo del atardecer y el azul del amanecer todos los días*”. Maria Luisa de Lourdes Pérez González

El tamaño de un nanómetro corresponde a una milmillonésima parte de un metro, por lo que las características, propiedades y principios sobre la materia, que están relacionados estrechamente entre sí a escala nanométrica, los cuales son diferentes a las propiedades de los materiales a escala micrométrica (Bawarski *et al.*, 2008). Con base a esta analogía el tamaño nanométrico permite diseñar, caracterizar, producir estructuras, dispositivos y sistemas que por sí solos son innovadores.

Actualmente la nanotecnología aplicada a la salud ofrece ventajas respecto a la quimioterapia convencional, así como en el diagnóstico, debido a que el tamaño nanométrico requiere de dosis menores del fármaco, aumentando la biodisponibilidad, la selectividad en el organismo y reduciendo los efectos secundarios por acumulación en órganos (Allen *et al.*, 2004 y Ozpolat *et al.*, 2003).

La nanomedicina oncológica permite que los NST puedan difundirse a través de los tumores con vasos sanguíneos anormales que raramente exceden de 300 nm de diámetro (Bawarski *et al.*, 2008), permitiendo que los NST puedan atravesar las paredes de los vasos sanguíneos y no acumularse en la mayoría de los tejidos sanos (Fenske *et al.*, 2008). Por ejemplo, la doxorubicina nanoliposomal que reduce los síntomas adversos de toxicidad cardíaca en los pacientes por estar rodeado de una capa lipídica, sin perder su efecto citotóxico en el tumor comparativamente con la doxorubicina no nanovehiculizada (Patil *et al.*, 2008). Adicionalmente a lo anterior, las modificaciones anatómicas que sufren los vasos sanguíneos en los tumores resultado de la angiogénesis (Fenske *et al.*, 2008), favorecen: i) la permeabilidad epitelial formando poros de entre 200 nm y 1.2 micras (Pinto Reis *et al.*, 2006^a; Samitier *et al.*, 2018), ii) la sobreexpresión de algunos receptores celulares, y iii) la adherencia de los NST con el principio activo a las moléculas que permiten su transporte al interior de las células tumorales.

Algunos estudios describen que es importante el tamaño y la naturaleza hidrófoba como principales características de los NST para no ser secuestrados en el organismo. El tamaño menor de los 100 nm (INN, 2009; Graves *et al.*, 2008) permite permear a través de complejos poros en la membrana nuclear que forman un anillo externo de 105 nm y uno interno de 70 nm de diámetro (Beck *et al.*, 2007) partículas

menores de 150 nm no son fagocitadas por las células *Kupffer* en el hígado y los NST con alta hidrofobicidad (NST_{W/O}) pueden ser fagocitados por el Sistema Fagocítico Mononuclear y activar el sistema del Complemento, desencadenando reacciones alérgicas (Bawarski *et al.*, 2008; Varenne *et al.*, 2016), debido a esto, en la presente tesis se desarrollaron NST_{O/W} que reducen o anulan la acción fagocítica en el organismo.

Nanosistemas de transporte (NST)

Los NST en dispersión se clasifican por el estado físico, sólido y líquido de las fases, formando una fase interna (FI) dispersada en una fase externa (FE) dispersante por efecto de una fase surfactante o tensoactiva (F_S). Los NST son sistemas dispersos que pueden clasificarse como: 1) NE que son dispersiones líquido-líquido de dos líquidos inmiscibles entre sí (Harmon y Huang 2014; Leong *et al.*, 2009; Shakeel *et al.*, 2008^a; Sonnevile-Aubrum *et al.*, 2004); 2) nanopartículas están formadas por un sólido compacto o poroso que tiene una acción o nanocápsulas que contiene una sustancia que se dispersan en una FE líquida (Briger *et al.*, 2002 y Yurgel *et al.*, 2013); 3) partículas nanométricas sólidas suspendidas en la fase líquida llamadas nanosuspensiones (Zhang *et al.*, 2006) y 4) lípidos en su estructura que son conocidos como portadores de lípidos nanoestructurados (NLC, *Nanostructured lipid carriers*) que son formulaciones a base de lípidos que tienen una matriz sólida a temperatura ambiente (Haider *et al.*, 2020).

Las ventajas que presentan las NE se basan principalmente en el tamaño nanométrico, el estado líquido y las características fisicoquímicas que permiten ser dosificados en diferentes formas farmacéuticas y administrados mediante distintas vías. Toda NE tendrá que ser formulada y administrado mediante una forma de dosificación. Son escasos los que se diseñan y administran directamente, como son los que se utilizan como marcadores en el diagnóstico (Rojas-Aguirre *et al.*, 2016). Comparativamente con los sistemas convencionales (cápsulas, tabletas, inyectables, etc.), se diferencian por: 1) el aumento en la solubilidad del fármaco en ambientes hidrófobos o hidrófilos formando por liposomas o sistemas de liberación de fármacos liposomales (Sercombe *et al.*, 2015); 2) la reducción del daño a tejidos producido por extravasación accidental; 3) la modificación de las propiedades farmacocinéticas debido a la protección del fármaco para evitar la degradación prematura (Ozpolat *et al.*, 2003); 4) la disminución en el volumen de distribución reduciendo los efectos secundarios en órganos sensibles por la selectividad asociada a los sistemas de liberación y 5) la mayor afinidad aparente por incremento de la concentración del fármaco en el tejido diana (Allen *et al.*, 2004). De esta manera es posible aumentar la biodisponibilidad, la selectividad en el organismo, además de disminuir los efectos secundarios y la dosis del activo.

Nanoemulsiones (NE)

Las NE son sistemas dispersos bifásicos de líquidos insolubles entre sí, compuestos por una fase discontinua o fase interna (FI) y una fase continua o fase externa (FE), las cuales están dispersas por acción de una F_S (Elzayat *et al.*, 2021). Cuando la FI está compuesta por agua (fase acuosa o F_W , *water*, agua) y todas las sustancias hidrofílicas que son dispersadas por un tensoactivo (F_S) y estabilizadas en una FE de naturaleza oleosa (fase oleosa o F_O) se obtienen las $NE_{W/O}$. De manera inversa cuando la FI está constituida por sustancias lipofílicas apolares o con polaridad baja (Celis *et al.*, 2008^b; Mason *et al.*, 2006) y son dispersadas por la F_S en una FE acuosa se obtienen las $NE_{O/W}$.

La F_S está formada por tensoactivos y/o emulsificantes, los cuales estabilizan a la FI con la FE mediante una acción de superficie, los primeros, reduciendo la tensión interfacial y los segundos, que incluyen por definición a los primeros, su acción se efectúa ya sea: por cargas aniónicas o catiónicas (potencial zeta) o por impedimento estérico, y los cosurfactantes, que potencian las características del tensoactivo y coadyuvan su acción (Xi *et al.*, 2009; Baboota *et al.*, 2007).




Actualmente, se enfatiza que la principal diferencia entre las microemulsiones y nanoemulsiones es el tipo de estabilidad termodinámica y metaestable o cinética del sistema, respectivamente (Elzayat *et al.*, 2021) y no solamente el tamaño de partícula como era considerada (Talegaonkar *et al.* 2020). Las microemulsiones se forman espontáneamente estabilizándose termodinámicamente, debido a la reducción de la energía libre de formación superficial que toma valores de cero o negativos, dicha situación no ocurre ni con las emulsiones ni con las nanoemulsiones que además, requieren de energía externa para su formación, así como de agentes que las estabilizan cinéticamente, siendo este concepto tratado posteriormente a mayor detalle en la sección de termodinámica y estabilidad de las emulsiones.

La FI determina el tamaño de partícula de las emulsiones, por la cual se clasifican en: macroemulsiones o emulsiones (tamaño de partícula mayor de 1000 nm); microemulsiones 10-400 nm en límites nanométricos (Talegaonkar *et al.*, 2008) (Talegaonkar *et al.*, 2020) o 10-50 nm (Prévost *et al.*, 2017) y nanoemulsiones (1 a 100 nm) (Elzayat *et al.*, 2021; Talegaonkar *et al.*, 2020; Harmon y Huang 2014; Shah *et al.*, 2010; Leong *et al.*, 2009) las miniemulsiones (menores de 500 nm) (Elzayat *et al.*, 2021; Grigoriev y Miller 2009), emulsiones ultrafinas y emulsiones submicrónicas (Shah *et al.*, 2010; Solans *et al.*, 2005; Graves *et al.*, 2005), respectivamente.

La apariencia física de las microemulsiones, nanoemulsiones y emulsiones está relacionada con el tamaño de partícula, concentración total F_S (Relación: $F_O:CMC_{F_S}$) efecto de la fuerza de gravedad y el proceso de obtención. Por lo que la primera tiene una apariencia transparente translúcida característica que le confiere el tamaño de partículas menores a 30 nm (McClement 2012). La segunda sigue la dispersión de *Rayleigh* (rojizo con la luz transmitida y azulado con luz refractada (Shafiq *et al.*, 2007^a), efecto conocido en la

naturaleza como el color rojizo del cielo al atardecer y azulado al amanecer. Esto se explica cuando el tamaño de las partículas dispersadas en el sistema es menor que la longitud de onda de los fotones dispersados en fluidos transparentes dicho efecto es explicado por la teoría de Mie. Este efecto indica que el tamaño de partículas nanométricas tiene una interacción diferencial de las longitudes de onda de la luz, cuando su campo electromagnético entra en resonancia con los átomos de las partículas, dicho efecto se conoce actualmente como resonancia de plasmón superficial y de ella dependen la posición de los máximos de absorción en el espectro dependiendo del tamaño y forma de la partícula (Wriedt 2012) y con viscosidad baja (Mason *et al.*, 2006). Mientras que la tercera tiene una apariencia que va desde blanco hasta ligeramente blanco lechoso (ver Tabla 1), que también tiene que ver con el tamaño de las partículas obtenidas, dicha característica se observa en la naturaleza con el color blanco de las nubes que tienen gotas de agua de 2×10^5 nm que precipitan en gotas de lluvia de tamaño de 2×10^6 nm. Actualmente se ha diferenciado dicha clasificación entre estos conceptos, especialmente con las estructuras de las fases isotropas de la microemulsión, debido a que las micelas esféricas que son termodinámicamente estables y tienen un tamaño nanométrico similar a las gotas esféricas de las nanoemulsiones (McClement, 2012). Sin embargo, la diferenciación reconocida en la actualidad, entre microemulsiones y nanoemulsiones es a partir de que las primeras se forman espontáneamente cuando se adicionan cantidades mayores al CMC de tensoactivos en relación a la concentración de la fase oleosa favoreciendo la estabilidad termodinámica por la reducción de la energía libre de formación superficial a cero o a un valor negativo, a diferencias de las macroemulsiones y nanoemulsiones, que requieren de adición de energía y menor concentración de agentes para estabilizan cinéticamente el sistema, ver Tabla 1.

Tabla 1. Comparación de las características diferenciales entre nanoemulsiones, microemulsiones y macroemulsiones.

Características	Nanoemulsión	Microemulsión	Macroemulsión
Estabilidad	Cinética	Termodinámica	Cinética
Apariencia	Translúcida 	Transparente 	Opaca 
Tamaño de partícula	1-100 nm	10-400 nm	>1000 nm
% Emulsificante y/o tensoactivo	<5%	>20%	5-10%
Cambio morfológico por la fracción del volumen del aceite	Sin cambio	Con cambio (esférica a hexagonal o lamelar)	Sin cambio
Efecto de las fuerzas de gravedad	No afecta (< 90 nm) Monodispersa	No afecta	Acción directa

Concentración total de F_s Relación de $[F_o]:CMC_{F_s}$	$[F_o] > CMC_{F_s}$	$[F_o] < CMC_{F_s}$	$[F_o] > CMC_{F_s}$
Formulación inestable	Fase discontinua con mayor: viscosidad, polaridad y solubilidad acuosa	Concentración baja o alta de la CMC del tensoactivo	Variación de densidades entre las fases
Determinación de tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz y microscopía electrónica de transmisión	Microscopía de luz polarizada	Microscopía óptica

Abreviaturas: Concentración micelar crítica (CMC), Concentración total del tensoactivo ($[F_s]_{Total}$), concentración de la fase oleosa ($[F_o]$). (Alvarado *et al.*, 2019; Mason 2019, Prévost *et al.*, 2017; McClement 2012; Para *et al.*, 2008)

Preformulación de nanoemulsiones

La PF permite conocer las características físicas y fisicoquímicas de todos los componentes de una formulación, es decir, las propiedades intrínsecas de cada excipiente para seleccionar los más compatibles con el principio activo en estudio y reducir las posibles interacciones entre ellos con base a su función, concentración y naturaleza química para comprender el impacto de dichas propiedades como variables del proceso.

Naturaleza química de la fase oleosa (F_o)

La F_o está formada principalmente por aceites y otros aditivos liposolubles que proporcionan una determinada acción a la emulsión y que pueden formar la fase interna o externa de un sistema heterogéneo.

Los aceites se clasifican por su origen en la naturaleza en animal y vegetal, los primeros al ser menos estables y de fácil oxidación, son menos utilizados que los segundos. Los aceites vegetales se obtienen a partir de ácidos grasos con glicerina teniendo una estructura química final de glicérido y se clasifican de acuerdo al ácido graso precursor, a los enlaces químicos y al número de carbonos mayores de 12C son sólidos a temperatura ambiente e insolubles en agua: a) los ácidos grasos saturados, tales como: butírico, capríco, caprílico, láurico, palmítico y esteárico, en donde la proporción de glicerina determina la consistencia del aceite y b) los ácidos grasos no saturados, como: oleico, linoleico, linolénico y ricinoleico de 18C que son líquidos a temperatura ambiente en su estado puro o formando parte aceites naturales, por ejemplo, el aceite de oliva que es glicérido del ácido oleico puede variar en porcentaje de 55 a 83% (Shakeel *et al.*, 2008^a).

Existe una gran variedad de NST que se pueden obtener con diferentes F_o , entre los componentes de estas últimas se encuentran:

a) aceites naturales ultrapurificados como: aceite de olivo (Wulff *et al.*, 2009), aceite de soya (Kentish *et al.*, 2008; Fukumori e Ichikawa 2006; Bullon *et al.*, 2007; Wulff *et al.*, 2009), aceite de jojoba (Baboota *et al.*, 2007), aceite de lino (Kentish *et al.*, 2008), aceite de canola (Moreira *et al.*, 2006); ácido oleico (Chu *et*

al., 2009; Shakeel *et al.*, 2007; Solè *et al.*, 2006), ácido oleanólico (Zheng *et al.*, 2009), aceite de ricino (Shafiq *et al.*, 2007^b) y oleilamina (Maestro *et al.*, 2008).

b) aceites comerciales de marcas comerciales CapriolTM 90 (propilenglicol monocaprilato) (Azeem *et al.*, 2009).

c) mezclas comerciales de aceites como: Miristato de isopropilo (éster isopropílico del ácido mirístico) (Baboota *et al.*, 2007), Sefsol 218[®] (éster monopropilenglicol del ácido caprílico) (Xi *et al.*, 2009) y Triacetin[®] (Shakeel *et al.*, 2008^a), Labrafac[®] (complejo caprílico 4-polietilenglicol triglicérido cárrico), Labrafil[®] (aceite de jojoba y macroglicérido de oleilo), Miglyol[®] 840 (triglicérido de cadena media) (Badawi *et al.* 2008) y Triacetin[®] (triacetato de glicerol) (Shakeel *et al.* 2007).

Naturaleza química de la fase tensoactivo

La F_S que se utiliza para estabilizar las emulsiones puede consistir tanto en uno o una mezcla de tensoactivos, como de tensoactivos más cotensoactivos; ajustándose la concentración de cada uno acorde a los componentes y proporción de aceites en la F_o, así como al tipo de emulsión (w/o; o/w; o/o/o;...), así como al tamaño de glóbulo y la estabilidad termodinámica o cinética esperada. Las F_S más utilizadas en las nanoemulsiones se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. La clasificación FS utilizados para la obtención de nanoemulsiones pueden ser aceites, triglicéridos y tensoactivos no iónicos.

Aceites y triglicéridos
<ul style="list-style-type: none"> • triglicérido de ácido caprílico y ácido cáprico (Captex 355[®]) (Xi <i>et al.</i>, 2009) • aceite de ricino polietoxilado (Cremophor EL[®]) (Xi <i>et al.</i>, 2009)
No iónicos
<ul style="list-style-type: none"> • monooleato de sorbitano poli-oxietilénico (Tween[®] 80) o PS₈₀ (Liang <i>et al.</i>, 2012; <i>et al.</i>, 2009; Shakeel <i>et al.</i>, 2009; Shakeel <i>et al.</i>, 2007 y Baboota <i>et al.</i>, 2007) • monopalmitato de sorbitano polioxietilénico (Tween[®] 40) (Kentish <i>et al.</i>, 2008) • monolaurato de sorbitano polioxietilénico (Tween[®] 20) (Azeem <i>et al.</i>, 2009) • monolaurato de sorbitano (Span[®] 20) (Mao <i>et al.</i>, 2009) • monooleato de sorbitano (Span[®] 80) (Forgiarini <i>et al.</i>, 2009) • alcohol polietoxilado ó dodecil éter tetraetoxilado (Brij 30[®]) (Chávez <i>et al.</i>, 2013) • ácido hexadecanoico (Labrafil[®]) y éter monoetil de dietilenglicol (TranscutolP[®]) (Baboota <i>et al.</i>, 2007) • fenoxietanol [4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il Triton X 405[®])] (Zhou <i>et al.</i>, 2004) • 2(2-etoxietoxi) etanol (Transcutol[®]) (Shakeel <i>et al.</i>, 2008b) • éter monoetilico de dietilenglicol (TranscutolP[®]) (Baboota <i>et al.</i>, 2007) • copolímero de polioxietileno-polioxipropileno (Pluronic F68[®]) (Badawi <i>et al.</i>, 2008) • monolaurato de decaglicerol (ML 750[®]) (Mao <i>et al.</i>, 2009)

-
- macrogol -8- glicéridos de caprilcaproilo
-
- éter monoetil-dietilenglicol (Carbitol®) (Azeem *et al.*, 2009)
-
- oleato de hexaglicérido (*Plurol Oleique*®) (Shakeel *et al.*, 2007)
-

El tensoactivo seleccionado para el estudio fue el monooleato de sorbitano poli-oxietilénico o polisorbato 80 (PS₈₀) o Tween® 80, es un surfactante no iónico, que contiene ácido oleico de $\geq 58.0\%$ (balance principalmente ácidos linoleico, palmítico y esteárico) debido a esta característica fue elegido por similitud con el ácido oleico (F_O).

La principal aplicación farmacéutica del PS₈₀ es como el agente solubilizante y estabilizador de medicamentos contra el cáncer (Liang *et al.*, 2005) y ciertas vacunas. El PS₈₀ no se incluyó en la vacuna PCV7, pero se estudió para la formulación final de PCV13 con el fin de crear un proceso de fabricación más sólido. Nielsen y colaboradores determinaron que cuando se adiciona 0.1% de PS₈₀ a los medios de cultivo de laboratorio de cepas de *Staphylococcus aureus*, aumentó la tasa de crecimiento y en *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas fluorescens* disminuyó dicha biomasa. Además, el PS₈₀ redujo la eficacia antibacteriana de dos antimicrobianos hidrófobos: la rifampicina y el aceite esencial isoeugenol (Nielsen *et al.*, 2016).

Propiedades fisicoquímicas de las nanoemulsiones

Las NE tienen propiedades que están determinadas por la naturaleza fisicoquímica de las sustancias que los constituyen y la relación entre la estructura molecular de las interacciones de superficie como son: las fuerzas dipolos de las moléculas polares; las fuerzas de *Van der Waals* (fuerzas de atracción intermolecular entre dipolos permanentes o inducidos de tipo electrostático) que unen débilmente a las moléculas tanto polares como no polares; las fuerzas de *London* que afectan a todas las moléculas y los puentes de hidrógeno que atraen moléculas con grupos OH y NH de naturaleza donador/aceptor. Dichas fuerzas intermoleculares finalmente influyen en las propiedades físicas de los compuestos orgánicos, tales como: la solubilidad, la viscosidad, el pH, el punto de fusión, el punto de ebullición, *etc.*, en donde las partículas nanométricas siguen leyes de la mecánica cuántica y no de la clásica que dependen del tamaño micrométrico, manteniendo un comportamiento molecular con propiedades fisicoquímicas exclusivas y novedosas.

Las características fisicoquímicas macroscópicas de las NE como: la apariencia, la viscosidad, la densidad y el pH son el resultado de las interacciones de los átomos de las moléculas entre sí, disueltas o en agregados dispersos en el sistema con movimiento Browniano. Las propiedades fisicoquímicas de los componentes favorecen la reducción de la FI e interacciones en la interfase y su relación con la FE,

conjugándose para obtener nanoemulsiones estables, las cuales se deben estudiar en las etapas tempranas de la preformulación.

Propiedades fisicoquímicas de la fase interna

Las nanoemulsiones estables deben mantener una FI de tamaño nanométrico homogéneo para estar en equilibrio con la FE y con el resto de los componentes de la formulación, para ello se debe conocer y controlar las propiedades de los componentes que forman la nanoemulsión, tales como: la solubilidad, la polaridad, el volumen molar, las fuerzas interparticulares, la viscosidad y la densidad de energía, entre los mas importantes se describen a continuación.

Solubilidad. La solubilidad nula entre las FI y FE favorece la estabilidad de las dispersiones heterogéneas cuando existe: a) la insolubilidad entre la FI y FE evita el rápido engrosamiento de la distribución del tamaño de las gotas por el transporte difusivo de las moléculas a través de las películas delgadas de las gotas evitando la maduración de Ostwald; b) la diferencia de liposolubilidad elevada entre las fases, como en el caso de una $NE_{O/W}$, donde la FI está formada por aceites lipofílicos (Sonneville-Aubrum *et al.*, 2004) o una mezcla de aceites comparada con la FE que contiene compuestos hidrofílicos solubles en la F_w , se sabe que los alcanos de cadena corta y alcoholes favorecen las microemulsiones (Mason 2006) por lo que se recomienda los que tienen una cadena de longitud mayor (Thompson *et al.*, 2018; Celis *et al* 2008^a y Taylor 2003) y favorezcan el potencial químico que se opone al efecto *Ostwald* (Wooster *et al.*, 2008; Graves *et al.*, 2008); c) potencial químico elevado obtenido por la diferencia de presión entre moléculas de las gotas internas (P_{int}) de la FI y de la presión del medio (P_{ext}) de la FE que favorezcan el proceso de equilibrio por la reducción del contacto y disminución de fuerzas la cohesión entre las partículas evitando que las gotas intercambien moléculas de aceite a través del solvente de manera espontánea, evitando el fenómeno que se conoce como la Maduración de Ostwald (Urbina-Villalba 2014); d) aumento en la presión en el interior (P_{int}) de la superficie de la gota esférica comparada con la presión exterior (P_{ext}) del medio en una magnitud directamente proporcional a la tensión superficial (γ) de dicha gota e inversamente proporcional a su radio (R_i) que se muestra en la ecuación siguiente:

$$\Delta P = P_{int} - P_{ext} = \frac{2\gamma}{R_i} \quad (1)$$

Debido a la diferencia de la presión de *Kelvin-Laplace*, las gotas grandes con presión menores integran a las pequeñas ya que el fluido se mueve de mayor a menor presión, así como por disminución de la fusión de las gotas pequeñas de la FI por difusión molecular hacia la FE (Solans 2005) y donde los valores típicos de presión para nanoemulsiones en estas condiciones se encuentran entre 10 y 100 atm (Graves *et al.*, 2005) y e) la adsorción del emulsificante que está en función de la cobertura de las gotas recién

formadas por el proceso en equilibrio entre la ruptura y su velocidad de adsorción para evitar la coalescencia (Jafari *et al.*, 2008). La coalescencia es un fenómeno irreversible, donde las gotas se unen debido a que se reduce el área interfacial y con ella la energía libre del sistema, para ello, se deben de vencer las barreras energéticas asociadas con el grosor de la capa de tensoactivo adsorbido para formar gotas mas grandes. Además, cuando existen fuerzas capilares considerables, la presión de Kevin-Laplace ($\Delta P = \gamma H$, donde H es la curvatura de la gota) es muy elevada en el interior de la gota con relación a la presión de la película entre las gotas se puede favorecer la coalescencia.

La solubilidad de los tensoactivos no-iónicos proporcionan un valor numérico del HLB (*HLB* de las siglas en inglés de *Hydrophilic Lypophilic Balance*) que se utiliza como una herramienta de desarrollo y estabilidad. Se estudia el tipo y la concentración del tensoactivo necesario para obtener y mantener el sentido de la emulsión del sistema requerido, para ello se calcula previamente el HLB requerido (HLBr). Así que, el HLBr entre 8-18 indica que se pueden favorecer las emulsiones o/w y con un HLBr entre 1-8 se obtienen emulsiones w/o (Bullon *et al.*, 2007 y Mao *et al.*, 2009).

Las variaciones de solubilidad de la F_s pueden modificar la formación de sistemas o/w y cambiar el sentido de la emulsión a sistemas w/o , lo que depende de la afinidad del tensoactivo por la FE que puede ser modificada según la regla de *Bancroft*, donde el emulsificante con mayor hidroafinidad favorecerá sistemas o/w y con mayor lipoafinidad sistemas w/o , reduciendo la posibilidad de un cambio en el sentido de la emulsión (SAJJADI *et al.*, 2006^b y DI SCIPIO *et al.*, 2008). Sin embargo, actualmente se utiliza el concepto de balance energético denominado Desviación Hidrófila Lipófila (HLD, las siglas en inglés de *Hydrophilic Lipophilic Deviation*) que permite obtener la formulación óptima mediante la ecuación semiempírica que integra en una relación lineal simple de los efectos entre seis a ocho variables que incluyen: la cabeza y la cola del tensoactivo, a veces un cotensoactivo, la naturaleza de la fase oleosa, la salinidad de la fase acuosa, la temperatura y la presión, para obtener el $HLD=0$ como el criterio determinante para encontrar la estabilidad mínima de la emulsión y más eficiente que el valor crítico del HLB (Salager *et al.*, 2020), además que se eliminan los efectos de drenaje de la película del tensoactivo y se reduce la coalescencia de las gotas grandes. La ecuación que permite determinar el HLD se describe a continuación:

$$HLD = A_{co} - A_{cw} \quad (2)$$

Donde: A_{co} , son las fuerzas de atracción moleculares y A_{cw} se encuentran entre la molécula de tensoactivo adsorbida (indicada en la zona interfacial (c) y el aceite cercano (o) y moléculas de agua (w). Los valores de HLD pueden explicar el efecto de la F_s no iónica, F_o y la temperatura en el presente trabajo, cuando el HLD es elevado indica que la solubilidad del F_s ha disminuido en la F_w , por efecto del aumento de la temperatura, provocando por una disminución en el valor A_{cw} cuyo efecto es inverso para

los tensoactivos iónicos. También, cuando el tamaño molecular del aceite se incrementa sin modificación de la F_s habrá un aumento directamente proporcional en el valor A_{co} y en el HLD.

Estudios de Salager y colaboradores (2020), obtuvieron emulsiones de alta estabilidad utilizando el valor HLD normalizado con un parámetro de contribución de tensoactivo obteniendo el HLDN (HLDN, *Hydrophilic Lipophilic Deviation Normalized*) que debe ajustarse en el rango de 10-20 unidades con un valor negativo para una emulsión O/W o valor positivo, del tipo W/O respectivamente.

Polaridad. El grado de polaridad entre la FI y la FE determina la estabilidad de una nanoemulsión, por ejemplo, una $NE_{O/W}$ con una FI poco polar tendrá menor grado de solubilización en la FE, comparada con aceites más polares, obteniendo gotas más pequeñas que no se fusionen en gotas mayores por difusión molecular y que sean estables por reducción de la maduración de Ostwald (MASON *et al.*, 2006). Por lo que, la fase discontinua poco polar o mas aún apolar favorece la reducción del tamaño de la gota.

Concentración de saturación del tensoactivo. La concentración de saturación del tensoactivo (C_s) es la máxima cantidad de aceite que se puede añadir a una determinada masa del tensoactivo, expresada en gramos de aceite solubilizado en gramo de tensoactivo, bajo condiciones externas específicas, la cual esta está relacionada con la cantidad total de aceite y la del tensoactivo para obtener una NE en donde estas requieren de concentraciones bajas de tensoactivo (Alvarado *et al.*, 2019). Así como, un exceso de tensoactivo en la FE permitirá que las micelas tensoactivas se disocien en monómeros y se adsorben rápidamente en las superficies de las gotas recién creadas durante la emulsificación, inhibiendo la coalescencia inducida por cizallamiento (Mason 2007).

Volumen molar del aceite. El volumen molar de una sustancia (V_m) es el volumen de un mol de la sustancia, obtenida por la densidad (ρ) y de su peso molecular ($V_m = \rho/PM$) en unidades de $m^3 \cdot mol^{-1}$. Así que, aceites liposolubles con elevados pesos moleculares favorecen la formación de gotas pequeñas que no se unen para formar gotas de tamaño mayor, dicho fenómeno es conocido como la inhibición de la Maduración de *Ostwald* o engrosamiento de las gotas (Sonneville-Aubrum *et al.*, 2004). Por consiguiente, la inestabilidad de las NE se debe a la redistribución de las partículas por diferencias en sus solubilidades, creciendo por la fusión de las gotas pequeñas que pasan a través de la fase continua por difusión molecular del aceite, dicho fenómeno es conocido como la maduración de Ostwald (Wooster *et al.*, 2008) (Urbina-Villalba 2014). La maduración de Ostwald surge de la diferencia de solubilidad entre gotas grandes y pequeñas debido a las diferencias de presiones de Laplace. la cual es explicada por la teoría de Lifshitz-Slezov-Wagner (LSW) que preside la linealidad del cubo del radio promedio en el tiempo. Y cuyo gradiente de esta función lineal es la velocidad de la maduración de Ostwald (ω), la cual se describe en la ecuación siguiente:

$$\omega = dr^3/dt = 8/9 \left[\frac{(S_\infty \gamma V_m D)}{\rho RT} \right] \quad (3)$$

Donde: r es el radio medio de todas las partículas; t es el tiempo; V_m es el volumen molar del aceite, relacionado con S_∞ la solubilidad del aceite como fase interna; γ es la tensión superficial; ρ es la densidad; D es la difusión de la fase continua con R la constante de los gases a T que es la temperatura absoluta (Alvarado *et al.*, 2019).

Fuerzas interparticulares. Las partículas nanométricas en las NE siguen trayectorias desordenadas las cuales no dependen de las fuerzas de gravedad. Cuando la concentración de la FI es menor, se favorece el movimiento browniano (Graves *et al.*, 2005) en partículas menores de 90 nm, favoreciendo la estabilidad de las NE (McClement 2012).

Tensión superficial. Las NE requieren que las FI y FE estén estabilizadas por la F_S mediante la reducción de la tensión superficial en la interfaz (I_f) y su naturaleza química permite la integración del sistema reduciendo la energía libre entre ellas (Wulff *et al.*, 2009). Como la tensión interfacial es una energía libre por unidad de área, las moléculas de la gota tienen en promedio una energía libre veces superior a las moléculas del aceite puro, representándose en la ecuación siguiente:

$$4\pi r_i^2 \gamma / N_{m,i} \quad (4)$$

Donde: r_i , radio de la gota i , γ , tensión superficial y $N_{m,i}$ es número de moléculas de la gota i .

Partiendo que, el número de moléculas de una gota esférica se representa en la ecuación siguiente:

$$(4/3) \pi r_i^3 \rho_i / PM \quad (5)$$

Donde ρ_i es la densidad de la fase interna de la gota y PM es el peso molecular del componente se estima que dicha diferencia de potencial químico es inversamente proporcional al radio de la gota, reduciendo la difusión de las moléculas de aceite de manera espontánea evitando el fenómeno que se conoce como la Maduración de Ostwald.

Así mismo, la reducción de tensión superficial debida a la F_S que rodea a las gotas evita que al unirse entre ella se forme una capa delgada que al romperse forme una de mayor tamaño que con el tiempo provoca la separación de fases, que es conocido como coalescencia (Alvarado *et al.*, 2019) que obedece a la ecuación.

$$\frac{1}{r^2} = \frac{1}{r_0^2} - \frac{8\pi}{3} \nu t \quad (6)$$

Donde: el radio promedio de las gotas (r) después del tiempo (t), es el radio promedio (r) en tiempo cero (t_0) y la frecuencia de la ruptura por unidad de superficie (ν).

Concentración micelar crítica (CMC). La concentración mínima del tensoactivo para iniciar la formación de micelas en la FE y que sirve para garantizar un reservorio de la F_S es conocida como

concentración micelar crítica (CMC). La CMC permite determinar la densidad total de moléculas del tensoactivo (ρ_s) para calcular la concentración molar del tensoactivo requerida para depositarse sobre las gotas de la FI y formar la I_f (líquida-líquida) de la FE con las gotas FI. Para realizar esta estimación sobre la concentración molar del tensoactivo que permitirá obtener una capa monomolecular en la I_f se tiene que hacer los siguientes considerandos: 1) la concentración global de monómeros en la fase continua es independiente de la concentración del tensoactivo; 2) la ρ_s se considera fijo; 3) la concentración en equilibrio es $\rho_s \approx 1$ molécula (20 \AA^2) y 4) las partículas son esféricas con una densidad total de moléculas (ρ_i) por unidad de volumen de interface de la gota (ϕ). De esta manera se puede obtener el número de moléculas y la concentración molar de un tensoactivo que se requiere para cubrir las partículas de una NE. Por ejemplo, para determinar la concentración molar de dodecil sulfato de sodio con una CMC de 8 mM, que se requiere para obtener la densidad total de moléculas de tensoactivo para cubrir partículas de 50 nm, con un $\phi=0.1$ obteniendo $\rho_i \approx 10^{22}$ moléculas cm^3 que equivale a 20 mM de dodecil sulfato de sodio. Aunque hay un exceso de 18 mM de tensoactivo para rellenar la interfaz de todas las partículas, se considera esta cantidad como un depósito o reservorio de tensoactivo que existirá en la FE para que pueda recubrir todas las partículas que se formaron, aunque se considera que pueden permanecer a densidades superficiales menores que las correspondientes al equilibrio (Mason *et al.*, 2007).

Viscosidad. Las propiedades de las emulsiones de aceite en agua están influenciadas por la reología de la fase acuosa (fase continua) y la reología de las interfaces aceite-agua (Kamkar *et al.*, 2020). La importancia de la disminución de la viscosidad de la FI consiste en favorecer la ruptura del fluido, aumentando el número de partículas de menor tamaño y con ello el área de superficie (Arregui de la Cruz *et al.*, 2017; Behrend *et al.*, 2000). Sin embargo, cuando la viscosidad de la FI aumenta se favorece la formación de partículas grandes que provocan inestabilidades en el sistema. La adición de modificadores de viscosidad a la FE o continua contribuye a la reducción de tamaño de la fase discontinua o FI, sin embargo, la relación de FI/FE entre viscosidad dispersa/viscosidad continua (η_d/η_c) se puede alterar para maximizar la ruptura de las gotas, para producir nanoemulsiones más pequeñas es necesario aumentar η_c y mantiene fija la η_d . También altas concentraciones de F_s en la FE se reduce la tensión superficial favoreciendo la estabilidad de la FI (Fryd a Mason 2012). De manera similar se puede disminuir el tamaño de la FI mediante la aplicación de un esfuerzo cortante cercano o mayor a la presión de Laplace para estirar y romper la FI a gotas pequeñas, esto se describe en la relación fundamental de Taylor: $\tau = \eta_c \dot{\gamma}$ que relaciona el esfuerzo cortante con tensiones viscosas (τ) mayores e incrementando la velocidad de cizallamiento ($\dot{\gamma}$) y η_c es la viscosidad de la fase líquida continua (Mason *et al.*, 2007).

Propiedades fisicoquímicas de la fase tensoactivo

La función principal de la F_S es facilitar la ruptura de la FI y recubrir las gotas recién formadas para evitar la fusión entre ellas y estabilizar el sistema, ya sea por reducción de la tensión superficial o por impedimento estérico, mediante la incorporación de un polímero con un alto peso molecular en peso/número (PM_w/PM_n) cuya proporción es conocida como índice de polidispersidad (IPD) del surfactante, que aumenta la viscosidad debido al incremento del peso molecular en viscosidad (PM_v) a diferencia de los polímeros más pequeños que permite conocer la orientación espacial del número teórico de moléculas del tensoactivo necesario para cubrir eficientemente las partículas de la FI y poder reducir la tensión superficial a concentraciones menores del límite de CMC en la fase continua además se debe considerar la energía aplicada mediante la velocidad de rotación del agitador (Di Scipio *et al.*, 2008).

Los tensoactivos actúan sobre las sustancias insolubles confiriéndole cierto grado de solubilidad, cuando se encuentran en una fase determinada con alguno de los tensoactivos iónicos (catiónicos y aniónicos) con carga eléctrica neta o con tensoactivos no iónicos, sin carga eléctrica, a determinadas concentraciones y condiciones de temperatura de fabricación. De estos últimos, por ejemplo, los derivados de polioxitileno (POE) como el PS_{80} presentan una solubilidad inversa con el aumento de la temperatura, por lo que cuentan con un punto de enturbiamiento o de “nube” por precipitación (*cloud point*) a 65°C. Esto se debe a las interacciones entre los enlaces de hidrógeno con el agua y las unidades de POE, que al aumentar su longitud de la cadena hidrofóbica se reduce la tensión superficial y la efectividad del tensoactivo con una nula contribución electrostática, pero con efecto estérico provocando el decremento de la energía libre de *Gibbs* del sistema con la formación de micelas. Manteniendo una relación directa entre la CMC y la concentración dependiente de la pureza del tensoactivo (Miers 2020). Con base a esta propiedad se debe considerar como un factor extrínseco importante a controlar en la temperatura de emulsión para obtener $NE_{O/W}$ y evitar una inversión de fase $NE_{W/O}$ por un cambio de solubilidad del tensoactivo en el desarrollo de la metodología de la tesis.

Propiedades fisicoquímicas de la interfase (I_f)

La I_f es una región heterogénea difusa que actúa como una frontera que separa las fases de un sistema, cuyas características son proporcionadas por la estructura química, la orientación espacial y la concentración del sistema tensoactivo.

La I_f permite disminuir la tensión interfacial, propiciando la modificación en la curvatura y la fluidez de la película interfacial (Rao y Shao 2008). Además, las moléculas de los tensoactivos experimentan menos interacciones entre ellas, por lo que se requiere de energía para llevar una molécula de la disolución a la I_f . Donde la termodinámica de la I_f está relacionada con la energía libre, ΔG , la cual es necesaria para crear

una unidad de superficie que se denomina energía libre superficial y se define en términos de energía libre de Gibbs:

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (7)$$

Donde la energía libre superficial (ΔG) es igual a la tensión superficial de un líquido (γ) y que se puede expresar como energía por unidad de área (A) en unidades de J/m^2 o por fuerza por unidad de distancia. N/m.

La estructura química del tensoactivo y cotensoactivo le confieren la propiedad de reducir la tensión interfacial, disminuyendo la resistencia del aceite a la ruptura, sin permitir que las gotas formadas se restablezcan nuevamente, evitando así la coalescencia, vía el efecto Gibbs-Marangoni.

Las propiedades de interfase son el resultado de la interacción del emulsificante con la FI y FE del sistema, que depende de las características intrínsecas de la F_s , tales como: la densidad molecular, la orientación, la densidad de carga, la tensión de presión y la densidad electrónica; que son determinadas por las características extrínsecas de la química de los tensoactivos, las variaciones de solubilidad y coeficientes de partición de los componentes del sistema (Wulff *et al.*, 2009), ver en la figura 1. Todas las moléculas comprendidas por debajo del plano h_1 tienen el mismo entorno formando parte de α , así mismo, arriba de h_2 forman parte de β , sin embargo, las moléculas de la interfase h_1/h_2 tienen un entorno molecular distinto, por ejemplo, gotas de tamaño 100 \AA (10 nm) tendrán, una fricción de materia superficial de 0.271 que equivale a 27.1 %

a)
$$\frac{\text{mat sup}}{\text{mar total}} = \frac{\text{vol sup}}{\text{vol total}} \approx \frac{\text{área} \times \text{espesor}}{\text{vol total}} = \frac{\frac{4}{3}\pi r^3 - \frac{4}{3}\pi(r-\Delta r)^3}{\frac{4}{3}\pi r^3} = 1 - \left(\frac{r-\Delta r}{r}\right)^3 = 1 - \left(\frac{100-10}{100}\right)^3 = 0.271 = 27.1\%$$

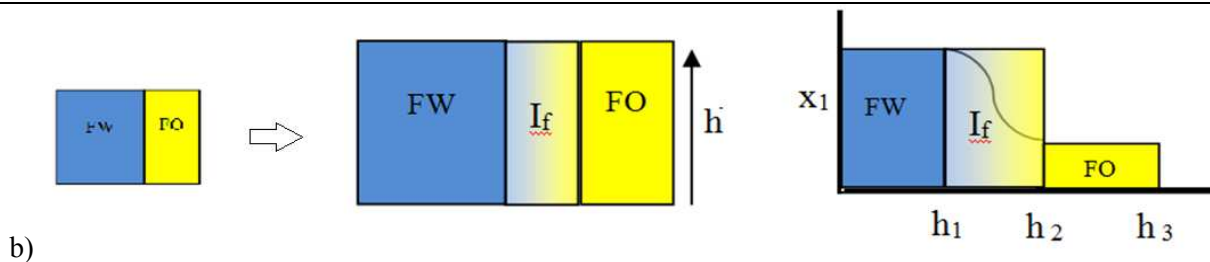


Figura 1. Interfaz Fw-Fo. a) Ecuación para determinar la densidad de moléculas del tensoactivo y b) Formación de interfaz (If) entre la fase acuosa (Fw), la fase oleosa (Fo) y el espesor de la interfaz (h).

El mecanismo de acción de los emulsificantes, está basado en su estructura química, por lo que se clasifican como: i) los emulsificantes tipo tensoactivos reducen la tensión superficial, facilitando la ruptura de una de las fases que se transforma en la fase discontinua, ii) los emulsificantes por impedimento estérico que forman una barrera entre partículas, de los cuales se subdividen en: emulsificantes no poliméricos que proporcionan información del peso molecular en peso y los del tipo

polimérico que están más relacionados con el peso molecular en número. Estos últimos proporcionan conocimiento del número de cadenas poliméricas que se distribuyen en una serie de intervalos por tamaños, proporcionando la información que facilitará el conocimiento del número de moléculas de tensoactivo que cubrirá cada glóbulo de la fase interna de una emulsión, evitando estar en el límite de CMC (Davis *et al.*, 2011) y al reducir la tensión superficial en concentraciones menores a la CMC, el sentido de la emulsión requerida de W/O se invierte a O/W, debido a modificaciones de su solubilidad en la fase continua (Di Scipio *et al.*, 2008).

Las variaciones de la solubilidad de los componentes pueden modificar el sentido de la emulsión, según la regla de *Bancroft*, la cual indica que el tipo de emulsión se da en función de la solubilidad del emulsificante en la FE. Así que, cuando el emulsificante tiene mayor hidroafinidad a una FE acuosa se favorecerá la obtención de NE_{O/W} y con mayor lipoafinidad a una FE oleosa se obtendrán NE_{W/O} (Sajjadi *et al.*, 2006^b).

El coeficiente de partición del emulsificante entre las fases proporciona información de la afinidad entre las fases de la emulsión, el cual depende de su naturaleza química, cantidad y solubilidad en el sistema, determinando finalmente el sentido de la emulsión.

La concentración de los componentes es factor importante para la formación de la I_{f W/O} de una emulsión, en especial la concentración del tensoactivo es determinante para estabilizar la fase oleosa y la fase acuosa de una formulación determinada. Cuando se utilizan sistemas pobres en tensoactivos, la emulsificación dependerá de la concentración inicial del tensoactivo. No así al utilizar sistemas ricos en tensoactivos, la emulsión no dependerá de su concentración, si no de la tensión interfacial y de la densidad de su potencia. Por tal motivo, en la obtención de nanoemulsiones se requiere de concentraciones bajas de tensoactivos, siendo el ejemplo de sistemas no dependientes de la concentración de tensoactivo.

La adsorción del emulsificante en la I_{f W/O} es un fenómeno de superficie exotérmico permitiendo que un ion o molécula quede retenido en la superficie de un material o sistema. El mecanismo de adsorción del emulsificante explica cómo el emulsificante cubre eficientemente, de manera rápida y completa, la mayor área de superficie interfacial de las gotas recién formadas y de las que se seguirán formando en el proceso continuo de emulsificación. Permaneciendo el mayor tiempo posible en dicha zona, evitando la fusión entre ellas y favoreciendo la estabilización del sistema monodisperso. La velocidad de adsorción del tensoactivo en las gotas de la fase interna se forma durante el proceso de emulsificación y depende de la eficacia de cobertura de las gotas en un menor tiempo.

El sistema emulsificante debe contar con alguna de las siguientes características: alta velocidad de adsorción interfacial, para cubrir las nuevas gotas, selección adecuada del tensoactivo dependiendo del tiempo de permanencia en la zona de dispersión, antes que la emulsión salga de la zona de dispersión (Arancibia *et al.*, 2016).

La naturaleza iónica de los tensoactivos puede disminuir la estabilidad de una emulsión, cuando a una formulación se le adiciona un aditivo de baja protección electrostática, que aumenta las fuerzas de atracción, debido a que la carga eléctrica es dependiente de la concentración de la valencia iónica de electrolitos adicionados a la solución. También se aumenta la estabilidad al adicionar un tensoactivo que incremente la carga electrostática y las fuerzas de repulsión (Guerra-Rosas *et al.*, 2016).

En resumen, se puede decir que el sistema emulsificante debe cumplir con las siguientes características para poder seleccionarlo en el desarrollo de nanoemulsiones: i) una velocidad de adsorción interfacial alta para cubrir las nuevas gotas; ii) un mayor tiempo de permanencia en la zona de dispersión; iii) una ocupación rápida de las interfases recientemente formadas, antes de que la emulsión salga de la zona de dispersión, y iv) un aumento en la energía termodinámica mínima necesaria para la reducción de partículas, controlando la temperatura crítica del emulsificante y evitando así el aumento en la temperatura que puede reducir la viscosidad de la emulsión, la tensión interfacial y la presión de *Laplace*. Por lo cual, se recomienda enfriar la muestra cuando se utilizan equipos (como un ultrasonificador) que proporcionan calor al sistema (Grigoriev *et al.*, 2009; Sonnevile-Aubrum *et al.*, 2004).

Propiedades fisicoquímicas de la fase externa

La selección de la FE depende de las características fisicoquímicas del sistema emulsificante, del grado de solubilidad del tensoactivo, del sentido de la emulsión y del tipo de emulsión O/W o W/O que se requiera obtener. De manera complementaria, la solubilidad del fármaco o activo en la FI así como el resto de los componentes que se disolverán de acuerdo con la afinidad con el agua o el aceite (Sajjadi, 2006^a).

La FE es la que va en mayor proporción que la FI que proporciona una apariencia translúcida característica a las nanoemulsiones. La FE tiene una viscosidad baja para las NE fluidas (Mason *et al.*, 2006) y una estabilidad cinética alta (Leong *et al.*, 2009; Shakeel *et al.*, 2008^b y Shafiq *et al.*, 2007^b), lo que permite que la NE puedan ser diluidas con la FE y que esto no afecte la FI o sea el tamaño nanométrico de partículas, que nos son afectadas por la fuerza de gravedad. Estudio realizado a nanofluidos acuosos se le adicionaron nanopartículas y polímeros para incrementar la viscoelasticidad en la FE sin afectar la interfacial disminuyendo la estabilidad de la emulsión (Kamkar *et al.*, 2020).

Termodinámica de las emulsiones

Desde el punto de vista termodinámico las nanoemulsiones se consideran no estables, debido que es un sistema polifásico formado de gotas nanométricas dispersadas en una FE, que tienen una energía libre de Gibbs de formación (ΔG_f) mayor que cero a diferencia de cada uno de sus componentes, por lo que sigue una tendencia a la separación espontánea. Dicha inestabilidad termodinámica es el resultado de la energía asociada a que tiene una gran área interfacial (A) de las gotas de la FI, la cual esta dada por, (γA) que es la

superficie total de las gotas y (γ) es la tensión interfacial entre las FI y FE. La energía libre contiene otro término conocido como la entropía de formación (ΔSf) asociada con la de las gotas formadas a partir de los constituyentes de dichas fases, como se describe en la ecuación 8.

$$\Delta Gf = \gamma A - T\Delta Sf \quad (8)$$

A diferencia de la nanoemulsiones, la estabilidad termodinámica de las microemulsiones permite entender la entalpía de una solución, la cual está dada por la variación de la solubilidad (en fracción molar o X_o) de la fase oleosa, como una función del recíproco de la temperatura ($1/T$). Posteriormente de graficar el $\ln X_o$ contra el $1/T$ se obtendrá la entalpía de la solución (ΔH_s) y finalmente la entropía de la solución (ΔS_s), la cual relaciona la energía libre de disolución del estado acuoso (ΔG_s) aumenta cuando los alcanos tienen 12 carbonos, pero disminuye con un número mayor (Taylor 2003).

La termodinámica explica la adsorción del tensoactivo en la interfaz y permite conocer el comportamiento de sus moléculas disueltas que presentan menor interacción entre ellas, para dirigir las a la interfaz donde se requiere energía. Dicho fenómeno de superficie exotérmico permite que un ion o molécula quede retenido en la superficie de un material.

Cuando el coeficiente de difusión (CD) es mayor que cero: $CD > 0$ el aceite formará una película delgada en la superficie del agua y se difundirá creando partículas en la fase acuosa, pero cuando CD es menor que cero: $CD < 0$ no se forma una película y se producirá una gota en la superficie del agua que no se puede difundir:

$$CD' = \gamma'_{w} - \gamma'_{ow} - \gamma'_{o}. \quad (9)$$

Clasificación de los sistemas dispersos heterogéneos. Los sistemas dispersos son sistemas heterogéneos, en general, por su composición, son sistemas físicos inestables termodinámicamente; pudiendo lograr su estabilización termodinámica y/o cinética. Se pueden clasificar en sistemas del tipo I que son termodinámicamente estables y del tipo II que son cinéticamente estables, que se diferencian en la composición y concentración de la F_s , así como del tipo de energía de activación que se requiere aplicar para obtener un sistema homogéneo entre la F_o - F_s - F_w .

La formación de sistemas dispersos convencionales y NE van de la fase I (gotas mayores) a la fase II (gotas pequeñas) estabilizadas por la F_s creando una barrera energética entre las gotitas de la F_1 recién formadas evitando la transformación del tipo II al tipo I en presencia de las barreras de energía anteriores, el sistema se vuelve cinéticamente estable o termodinámicamente inestable, siendo este fenómeno conocido para las NE como desagregación o reducción de tamaño de partículas mayores a menores o sea de afuera hacia adentro y para la microemulsiones de agregación o crecimiento de las mismas de adentro hacia afuera. No obstante que algunos autores enfatizan que la diferencia fisicoquímica fundamental entre las microemulsiones y las nanoemulsiones es exclusivamente por estabilidad termodinámica y cinética (Tadros *et al.*, 2006), las microemulsiones son espontáneas con una cantidad mayor de tensoactivo que

requieren de mínima energía externa de formación y las nanoemulsiones que se obtiene con cantidades mínimas de tensoactivos y por métodos de energía alta, ya sea: mecánicos (por cizallamiento) o cavitación (Meleson *et al.*, 2004), para romper la fase interna en partículas pequeñas (Solè *et al* 2006 y Shakeel *et al.*, 2008^b).

La estabilidad de las nanoemulsiones puede determinarse mediante estudios del análisis físico del tamaño de partícula, así como el potencial electrocinético (Potencial Zeta), posterior al periodo de almacenamiento con la variaciones de temperatura ambiente y tiempo (Alvarado *et al.*, 2019) y por calorimetría diferencial de barrido (DSC) para estudiar el comportamiento térmico asociados a cambios de energía interna de las NE por cambios estructurales o de asociación o migración molecular de los componentes en las fases en dispersión (Kishore *et al.*, 2011).

Desarrollo de nanosistemas de transporte (NST)

La etapa de preformulación proporciona una valiosa información para desarrollar NE estables como NST, a partir del conocimiento de las propiedades fisicoquímicas individuales de los potenciales componentes de la formulación y su influencia en sus procesos de dispersión o de mezcla, para observar su efecto en parámetros como la viscosidad, la solubilidad, fuerza iónica, tensión interfacial y el pH de dispersión.

Las condiciones para obtener nanoemulsiones son el resultado del equilibrio entre la ruptura de las gotas y la coalescencia. El mecanismo de emulsificación es el equilibrio de dos etapas: i) la disgregación, que consiste en la deformación de la FI, dando como consecuencia un incremento del área de superficie y ii) la formación de la I_f (FI-FE), así como la estabilización de la nueva interfase por la F_s, que previene la coalescencia de las gotas recién formadas de FI (Jafari *et al.*, 2008). El proceso de emulsificación se puede resumir en la siguiente fórmula:

$$\text{Disgregación (FI)} \Leftrightarrow \text{Estabilización (I}_f\text{)} \Rightarrow \text{Emulsificación (FE)} \quad (10)$$

Las NE son dispersiones líquidas insolubles entre sí que al ser estabilizadas por la F_s proporcionan una apariencia macroscópica de color rojo-azul característico que está en función de los tamaños de partículas nanométricos en el sistema, tal como, fue explicado anteriormente. El diseño de las NE permite seleccionar los componentes, con base a sus factores intrínsecos, para obtener la barrera de energía necesaria para estabilizar el sistema a las concentraciones y las características fisicoquímicas deseadas durante períodos prolongados de almacenamiento antes de su eventual uso. Esto también evita la maduración de Ostwald (Wooster *et al.*, 2008) reduciendo la solubilidad de la fase oleosa (F_o), en la fase acuosa (F_w) o viceversa para promover la estabilidad del sistema (Jasmina *et al.*, 2017). Tanto la F_s como la FI, deben tener una adecuada viscosidad y densidad (Mao *et al.*, 2009) para disminuir la tensión superficial y favorecer la ruptura evitando la fusión de nuevas gotitas de FI formadas durante la agitación. En este punto, las fuerzas de repulsión se vuelven más elevadas, conjuntamente se reducen los tamaños de

partícula, lo que permite la inclusión de más restos F_S libre que se encuentra en la FE. Además, los factores extrínsecos (F_{ext}) son todos los mecanismos externos que afectan la fabricación de las NE, tales como: el proceso de reducción de tamaño en la mezcla de FI (Yuan *et al.*, 2008), la agitación (Alvarado *et al.*, 2019), el orden de adición de componentes (Spinelli *et al.*, 2010 y Sajjadi 2006^a), permanencia de la gota de la FI en la dispersión (Jafari *et al.*, 2008), relación tipo de agitación/energía de corte (Kentish *et al.*, 2008) y la velocidad de enfriamiento, que reduce la posibilidad de fusión de partículas (Schalbart *et al.*, 2010).

Para este trabajo, la F_O seleccionada para el desarrollo de las NE es el ácido oleico (AO), que tiene un doble enlace central en la configuración *cis* y una cadena con 18 carbonos. Además, debido a sus propiedades estructurales a temperatura ambiente que le proporcionan una fluidez muy alta, generando durante la ruptura gotas líquidas que funcionarían como núcleos en nanosistemas.

El PS_{80} es la F_S seleccionada para el desarrollo de la NE en el presente trabajo por la similitud estructural al AO ya que es un derivado de la etoxilación del sorbitano y de una posterior monoesterificación del AO, debido a dicha estructura permite que el AO sea el principal componente del éster del ácido graso del PS_{80} , favoreciendo la formación de una monocapa más extendida que cubre más eficiente la F_O y estabiliza la I_f para lograr la estabilización de la NE (Fainerman y Miller 2001). Además, el PS_{80} se utiliza en las terapias de cáncer como agente de transferencia de fase para permitir que sustancias antitumorales activas atraviesen las membranas celulares sanas con poros menores de 4 nm (LIM *et al.*, 2012) y sistemas neoplásicos altamente vascularizados con poros entre 200 nm y 1.2 μ m (Romero-Morelos *et al.*, 2011 y Tsujino *et al.*, 1999). Otros estudios termodinámicos sustentan que el uso del PS_{80} como agente estabilizante no afecta el enlace con las inmunoglobulinas en las terapias de proteínas, evitando su adsorción y formación de agregados de proteínas que son potencialmente inmunógenos (Garidel *et al.*, 2008).

La importancia de la selección de F_O , F_S y F_W para el desarrollo de NE comparando con otros sistemas de transporte convencionales permite optimizar las ventajas que ofrecen estos NST *in vivo* debido a que con estas nanoestructuras el fármaco supera las barreras y defensas biológicas en el organismo por su tamaño y “solubilidad” o dispersión coloidal en fluidos biológicos (Sonneville-Aubrum *et al.*, 2004). Además, evita de esta manera: la fagocitosis en el hígado (Graves y Mason 2008); reacciones alérgicas cuando se obtienen NE altamente hidrofóbicos (Bawarski *et al.*, 2008) y una alta carga superficial; todo esto, favorece la permeabilidad de los vasos sanguíneos y facilita el transporte a través de las membranas celulares. Por lo que, la investigación de la NE como sistemas activos de transporte de fármacos en el cáncer y los principios subyacentes se ha incrementado, a causa de la optimización de los efectos farmacológicos, tales como: selectividad para los tejidos diana; aumento en la biodisponibilidad; disminución de los efectos secundarios de los componentes activos; dosis reducidas; los efectos

farmacológicos incrementados; y la posibilidad de reducir la toxicidad de los componentes mediante nanoestructuración (Opzpolat *et al.*, 2003). Todo esto permite que las NE puedan formularse de manera que sus componentes estén en porcentaje peso/peso (%w/w), porcentaje peso/volumen, (%w/v) y porcentaje mol (%M), sin embargo, las primeras son las que comúnmente se utilizan, con diferentes proporciones de F_O , aceites y excipientes liposolubles. Donde la F_S está compuesta por emulsificantes, tensoactivos y finalmente la F_W , se encuentra constituida por excipientes hidrofílicos y agua que se ajusta para conseguir el 100 por ciento en peso de la formulación.

Métodos de fabricación de nanoemulsiones

Para obtener NE reproducibles se deben determinar los factores intrínsecos de la formulación (F_{IF}) o variables de composición, así como, los factores extrínsecos del proceso (F_{EP}) que son las variables externas por controlar durante la fabricación (Solè *et al.*, 2008) y que interactúan entre sí de manera complementaria (Sajjadi 2006^a). Los F_{IF} se refieren a las concentraciones (Azeem *et al.*, 2009) y a la naturaleza química de cada uno de los componentes que deben ser estudiadas de manera individual y en conjunto para obtener una formulación estable (Bullon *et al.*, 2007), encontrándose entre ellos: el pH, la polaridad que proporciona la hidrosolubilidad, la apolaridad relacionada con el grado de liposolubilidad, la afinidad eléctrica, la influencia de los electrolitos (Moreira *et al.*, 2006) y la velocidad de adsorción que dan como resultado las posibles interacciones químicas entre sí (Bullon *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2009).

El desarrollo de una nanoemulsión estable requiere de criterios de selección de los componentes con base a los F_{IF} siguientes: i) alta solubilidad del fármaco en la FI; ii) insolubilidad entre la FI y FE, la cual está relacionada por el grado de lipofiliidad dada por el peso molecular, la estructura química y su longitud de cadena; y iii) una relación tensoactivo-cotensoactivo del sistema (Azeem *et al.*, 2009), donde el tensoactivo no forma fases en la emulsión y exista un balance del tensoactivo para formar reservorios de agregados micelares en la FE (Mason *et al.*, 2006).

En cuanto a los factores extrínsecos del proceso (F_{EP}) que pueden ser por modificaciones en la fabricación para obtener NE éstos deben controlar: i) las fuerzas de ruptura de las partículas utilizando los mecanismos de reducción de gota de la FI por sí solos o en conjunto ya sea con agitadores magnéticos (Mason *et al.*, 2006), homogeneizadores tipo rotor estator, ultrasonificadores o sistemas de alta presión (Spinelli *et al.*, 2010 y Yuan *et al.*, 2008); ii) el orden de la adición de los componentes en el desarrollo de la formulación (Jafari *et al.*, 2008; Sajjadi *et al.*, 2006^a); iii) el tiempo de permanencia de la gota en la zona de dispersión (Jafari *et al.*, 2008); iv) el tiempo de agitación, el tipo y la geometría del agitador empleado (Salager *et al.*, 2001 y Sajjadi *et al.*, 2006^a); y v) la temperatura durante el proceso de fabricación.

Reducción de tamaño de partícula de FI. La teoría de la reducción de partículas de la FI se basa en las variaciones de la formulación y metodológicas de fabricación que permiten su ruptura, debida al bajo o alto esfuerzo cortante en la agitación, utilizando baja energía (Shakeel *et al.*, 2008^a y Solè *et al.*, 2006) y/o alta energía, respectivamente (Yuan *et al.*, 2008; Leong *et al.*, 2009; Solans *et al.*, 2005).

Los métodos de baja energía se clasifican según los factores intrínsecos de sus componentes, tales como: el tipo de tensoactivo (iónico, no iónico) obtenidos *in situ* o adicionados externamente; la solubilidad de los componentes en las fases y la temperatura de emulsificación dependiente del estado físico (sólido, líquido) para estabilizar el sistema.

1.-Tipo de tensoactivo. La fase de tensoactivo sintetizada *in situ* (Maestro *et al.*, 2008 y Solè *et al.*, 2006) o adicionada externamente sufren cambios en su curvatura de manera natural durante el proceso de emulsificación para formar NE con alta estabilidad cinética (Bullon *et al.*, 2007 y Villareal *et al.*, 2004). Debido que la tensión interfacial tiende a reducir el área superficial y, por lo tanto, el volumen de la gota (Alymov *et al.*, 1999), dicha diferencia de presión permite que el equilibrio se alcance cuando se compensan ambas tendencias descritas en la ecuación 1 (Wooster *et al.*, 2008), formando partículas entre 10 y 100 atm que tienen una presión interna mayor que en el exterior, y favorecen una superficie esférica (Graves *et al.*, 2005 y Solans *et al.*, 2005).

2.- Solubilidad de los componentes. El HLB del sistema es dado por valor numérico del HLB que indica la afinidad de la F_S no iónica por las otras fases para favorecer la estabilidad (Forgiarini *et al.*, 2009; Bullon *et al.*, 2007 y Villareal *et al.*, 2004) con valores de HLDN, que deben ajustarse en el rango de 10-20 unidades con un valor negativo o valor positivo para obtener emulsiones de alta estabilidad (Salager *et al.*, 2020).

3.- Temperatura de emulsificación. Los excipientes sólidos deben estar en estado líquido para estabilizar NE, por lo que, modificaciones en la temperatura favorecen la inversión de fase por cambios de estado físico, por consiguiente, se debe establecer y mantener constante la temperatura de emulsificación del sistema (López y Lezama 2019; Gutiérrez *et al.*, 2008 y Maestro *et al.*, 2008), de igual manera, puede ocurrir inversión de fase por cambios composición variando en orden de adición de la F_S en las fases (Forgiarini *et al.*, 2001).

Los métodos de alta energía que forman partículas esféricas nanométricas introducen energía de cizalla elevada al sistema, permitiendo la ruptura de gotas grandes debido a que éstas bajo determinada condición o variables de proceso, puede ser alcanzada de acuerdo con el principio de operación del equipo utilizado (ultrahomogeneizador, sonicador u otro), por lo que, al no poder absorber más energía se rompen en gotas mas pequeñas. La emulsificación inicia cuando dichas partículas de la FI son recubiertas por el emulsificante y/o la F_S a su determinada CMC, dependiendo de la afinidad química de la fase se podrá favorecer o modificar el sentido de la emulsión y la estabilidad del sistema.

Caracterización de las nanoemulsiones

Las técnicas de caracterización de las nanoemulsiones se basan en la evaluación de las estructuras moleculares específicas de componentes, de manera directa e indirecta de sus propiedades fisicoquímicas que permitirán determinar la estabilidad del sistema, el primero determinando el crecimiento de las gotas de la FI y el segundo evaluando los cambios de termodinámicos de la NE.

Las NE se caracterizan por su estabilidad cuando mantiene el tamaño de partícula nanométrico y homogéneo por un periodo de tiempo prolongado, por tal motivo, las variaciones de luz a ciertas longitudes de onda y temperatura son las técnicas para determinar los cambios en el tamaño de partícula que se reflejan en la estabilidad. Los métodos ópticos cuantifican de manera indirecta la absorción, transmisión, dispersión y refracción de la luz sobre las partículas nanométricas, las cuales dan la apariencia translúcida característica que se puede observar a simple vista (Mason *et al.*, 2006). Las NE también se caracterizan con métodos espectroscópicos (Celis *et al.*, 2008a y Graves, *et al.* 2008), tales como: el dispersor dinámico de luz (DLS, siglas en inglés de *Dynamic light scattering*) (Ashizawa 2019; Anton *et al.*, 2007; Borgstahl 2007; Sriveatrava *et al.*, 2006 y You *et al.*, 2006); dispersión de luz cuasielástica (Borgstahl 2007; You *et al.*, 2006 y Shakeel *et al.*, 2008^b); y espectroscopía acústica que se basa en la determinación del volumen de distribución de las partículas. Finalmente, la microscopía electrónica de transmisión de luz que es una herramienta adecuada para caracterizar las nanoemulsiones (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017; Klang *et al.*, 2012; Kawada *et al.*, 2009; Ganta y Amiji 2009), mientras que el comportamiento térmico de las nanoemulsiones se determina empleando métodos calorimétricos (Azeem 2009).

Estudios de estabilidad por método dispersión dinámica de luz

La técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS) es conocida como espectroscopía de correlación de fotones o de dispersión de luz cuasi elástica que mediante una correlación digital mide las fluctuaciones de la intensidad de la luz y su correlación con respecto al tiempo, dichas fluctuaciones son debidas al movimiento browniano de partículas. El DLS permite determinar el diámetro medio de las partículas y la distribución del diámetro de las partículas dispersas en el líquido (Ashizawa 2019). Dicha intensidad está correlacionada en varios puntos de tiempo, al principio las intensidades para las partículas pequeñas dispersas son similares y se difunden más rápido que las partículas mayores y la correlación de fotones se pierde más rápidamente y a medida que las partículas grandes se difunden más lentamente, la similitud de intensidades persiste por mayor tiempo y la correlación de fotones tarda más tiempo en decaer (Carvahlo *et al.*, 2018).

Estudios de estabilidad por método calorimétrico (DSC)

Los análisis térmicos comprenden varias técnicas analíticas instrumentales utilizadas para medir o determinar propiedades de una sustancia o de mezclas, asociadas a cambios físicos o químicos en función de la temperatura o del tiempo. Permiten también el estudio de la evolución de las propiedades de un compuesto, una muestra o sistema cuando es sometida a un calentamiento a diferentes temperaturas.

La calorimetría es la medida cuantitativa del calor, que mide la transferencia de energía de un sistema a otro causada por diferencias de temperatura. Aplicaciones de calorimetría incluyen mediciones de los calores específicos de sólidos y líquidos, los calores de vaporización y combustión, y la tasa de generación de calor (potencia).

La calorimetría de barrido diferencial (DSC, siglas en inglés *Differential Scanning Calorimetry*) es una técnica que permite predecir la estabilidad de los nanosistemas a través de su comportamiento térmico de las nanoemulsiones (Azeem 2009), dichos cambios térmicos dependen de las propiedades físicas y químicas de los componentes, del tipo de tensoactivo, cantidad y proporciones de componentes en la formulación, solubilidad en las fases y metodología de preparación, tal como: el orden de adición, la temperatura de emulsificación y de enfriamiento (Schalbart *et al.*, 2010), así como los efectos de las condiciones de almacenamiento (Kishore *et al.*, 2011).

En el presente trabajo se utiliza DSC para determinar la estabilidad del sistema, por lo que es importante poder caracterizar las NE para poder diferenciarlas entre las microemulsiones, debido que estas últimas tienen una estabilidad diferente, con agregaciones esféricas termodinámicamente favorecidas, $\Delta G(-)$ y $\Delta H(-)$, es decir, son espontáneas y exotérmicas en su preparación. Las NE son dispersiones heterogéneas de dos o más fases, obteniendo dispersiones termodinámicamente desfavorecidas, $\Delta G(+)$ y $\Delta H(+)$, es decir, no espontáneas y endotérmicas en su preparación, por tal motivo, se pueden utilizar modelos termodinámicos basados en la ecuación de Gibbs-Thomson para poder caracterizarlas. Estudios han demostrado que la vehiculización de las partículas nanométricas en materiales nanoporosos forman películas poliméricas delgadas, que muestran cambios en la transición de primer orden de la temperatura de fusión o transición y temperatura vítrea durante el tiempo de almacenamiento (Alcoutlabi y Mc Kena, 2005). Aunque solo existe similitud de tamaño nanométrico entre estos nanosistemas con las NE del trabajo, cabe resaltar que durante el almacenamiento existen cambios de estado, los cuales pueden ser evaluados mediante análisis térmico quedando demostrado que las técnicas calorimétricas sirven para determinar indirectamente la estabilidad de cualquier NST. La DSC proporciona información de la historia calorimétrica de NE, tal como se reportan en estudios comparativos entre NE y NLC, evaluando los parámetros de punto inicial, punto de fusión (equilibrio) y entalpía; además del índice de cristalinidad basado en las entalpías de fusión de la dispersión en NLC y estabilidad de la NE fue demostrada mediante DSC como una herramienta para estudiar el comportamiento de fusión y recristalización de material

cristalino como en la NE (Junyaprasert *et al.*, 2009). La DSC es una herramienta importante para determinar la cristalización de nanopartículas mediante la determinación de su temperatura de fusión o en el caso de las NE por una insolubilidad de los componentes del sistema que se relaciona con la temperatura de enturbiamiento y el flujo del calor asociado con la transición del material como una función del tiempo y la temperatura (How *et al.*, 2011).

La caracterización de NE_{O/W} por DSC (Sonoda *et al.*, 2006) y las NE_{W/O} se realizan mediante conductividad térmica (Chiesa *et al.*, 2008), debido que las propiedades de los materiales como el agua, el aceite y el aire que en su estado libre tienen una baja capacidad de transferencia de calor, limitados por su muy baja conductividad térmica, se modifican cuando se realizan dispersiones entre dichos materiales. Estudios sustentan que la disminución de la concentración de F_W en la FI de las NE_{W/O} determina directamente el tamaño de la gota. Por ejemplo, con un 12% en volumen de agua se obtienen partículas menores de 40 nm, con mayor conductividad, viscosidad y estabilidad, sin embargo, a medida que aumenta F_W en la FI a más de 50% e incluso de 62%, se incrementa el riesgo de inversión de la emulsión (Chiesa *et al.*, 2008).

Estudio de anaquel para determinar la estabilidad

El conocimiento de los mecanismos fisicoquímicos implicados en la desestabilización de los NST es fundamental para mantener la estabilidad en el desarrollo, fabricación, almacenamiento y hasta el uso del producto. Los estudios de estabilidad térmica relacionan los cambios fisicoquímicos que presenta el sistema con respecto al tiempo en un ambiente controlado de temperatura. Los equipos como DSC, DLS, ultracentrifugación entre los más usados para caracterizar las NE, permiten simular condiciones externas físicas modificando la temperatura y fuerzas físicas para evaluar los cambios del sistema a nivel micro que se evidencian en la apariencia a nivel macro durante el tiempo de estabilidad en anaquel. Dichos estudios de estabilidad se basan en los efectos por: a) cambios físicos de separación de fases, debido a la fuerza de gravedad mediante la ultracentrifugación (Mason *et al.*, 2006 y Bali *et al.*, 2010); b) temperatura a tiempo real mediante pruebas de anaquel a diferentes temperaturas (4, 25, 30, 40, 50 y 60°C) (Shakeel *et al.*, 2008^b y NOM 073); c) conductividad térmica (Chiesa *et al.*, 2008); d) el potencial zeta, como una medida de la carga de la partícula para determinar el índice de la estabilidad física de dichas partículas (Quaglia *et al.*, 2006) y e) el sentido y tipo de emulsión O/W o W/O (Pérez-González *et al.*, 2019).

Principios activos en estudio: Retinoides

Los retinoides naturales son derivados y análogos estructurales funcionales del retinol, los cuales actúan como metabolitos endógenos, que se obtienen a partir de la vitamina A. Los retinoides naturales como el

ácido retinoico *all trans* (ATRA) y sus isómeros: el ácido 9-cis retinoico y ácido 13-cis retinoico, se encuentran como metabolitos en el organismo. Por otro lado, existen retinoides sintéticos, como la hidroxifenil retinamida (4-HPR), que tiene una conformación restringida no modificable. Ambos tipos de retinoides (naturales y sintéticos) se pueden utilizar como un coadyuvante en la terapia oncogénica (Choi *et al.*, 2008).

La estructura química del ATRA puede dividirse en tres regiones como se observa en la Figura 2. La parte hidrofóbica, una parte polar (usualmente un ácido carboxílico, encargado de establecer un puente iónico con el sitio de unión a ligando del receptor) y una cadena poliénica central enlazante.

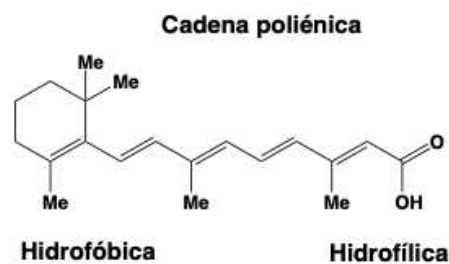


Figura 2. Estructura química del ácido retinoico *all trans* (ATRA), con sus partes: hidrofóbica, hidrofílica y su cadena poliénica.

Determinación de actividad biológica del ATRA

El ATRA ha demostrado tener una actividad citotóxica en células malignas de diferentes tipos de cáncer, por lo que se han estudiado *in vitro* con diferentes líneas celulares como: cáncer de mama MDA-MB-231 y MCF-7; células que sobre expresan CD44, mediante la obtención de una NE con ATRA que fue cubierta con ácido hialurónico (AH) formando nanocápsulas de NE-ATRA-AH que presentó un IC_{50} $12.5\mu M$ de ATRA comparativamente con un $IC_{50} > 50\mu M$ del ATRA libre en ambas líneas celulares (Tinoco *et al.*, 2018) y nanopartículas de poli beta-amino éster (PBAE) incorporado con ATRA mediante método de desplazamiento de disolvente (Karimi *et al.*, 2020). Así como en la clínica para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer de riñón con liposomas encapsulados con ATRA iniciando con dosis de $140\text{ mg/m}^2/\text{día}$, continuando con $90\text{ mg/m}^2/\text{día}$ hasta disminuir a $15\text{ mg/m}^2/\text{día}$ (Goldberg *et al.*, 2002).

Cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP)

Estadísticas mundiales muestran que el cáncer de pulmón continúa siendo la primera causa de muerte por cáncer. En el 2018 se reportó que 2.1 millones de personas en el mundo padecieron este tipo de cáncer, representando el 14.5% y 8.4% de nuevos casos en hombres y mujeres, respectivamente (Ferlay *et al.*, 2018). El cáncer de pulmón presenta mayor frecuencia en hombres que en mujeres con 1.1 millones de casos (16.5% del total) y 516,000 casos (8.5% de todos los cánceres), respectivamente. En el inicio de la

década pasada se estimó que para 2022 serían 2.2 millones de personas con cáncer de pulmón (Granger *et al.*, 2011) y se pronostica que se incrementará de 14 millones de casos nuevos en 2012 a 22 millones en el año 2030 (Sánchez-Ríos *et al.*, 2020).

El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) incluye todos los tipos de cáncer epitelial de pulmón excepto el cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP). El tipo más común de CPCNP son el adenocarcinoma de células escamosas, el carcinoma de células grandes y el adenocarcinoma, dicho cáncer suele ser menos sensible a la quimioterapia y radioterapia en comparación al CPCP (Pérez *et al.*, 2017).

Tratamiento con ATRA contra el CPCNP

Los retinoides naturales y sintéticos (Choi *et al.*, 2008) son potentes reguladores de la expresión génica y el juegan un papel esencial en la modulación de la proliferación y diferenciación celular (Pino-Lagos *et al.*, 2010), habiendo de ellos agentes anticancerígenos potenciales para inducir a las células tumorales a la diferenciación, inhibición de la proliferación o hasta la muerte celular por apoptosis, por lo cual se utilizan como una herramienta prometedora para la terapia en cáncer (Muñiz-Hernández *et al.*, 2015).

El uso del ácido retinoico *all trans* ha demostrado tener un efecto coadyuvante en tratamientos combinados con otros citotóxicos contra el CPCNP (Arrieta *et al.*, 2010) y en leucemia promielocítica aguda (Richard 2003). Algunos estudios piloto y clínicos utilizan los retinoides naturales en diferentes fases y en diversas enfermedades neoplásicas, tales como, cáncer de próstata, mama, colon, cabeza y cuello, tiroides, riñón, piel, cérvix o pulmón (Jiménez-Lara *et al.*, 2010).

Entre los elementos de estudio más importantes a notar es que el presente trabajo de tesis se enfoca en la importancia de los retinoides naturales con aplicación en cáncer pulmonar, demostrado en tratamientos aplicados en tres ensayos clínicos con pacientes en etapas avanzadas que reportaron aumento en las tasas de respuesta a la quimioterapia y en sobrevida libre de enfermedad a un año (Sánchez-Ríos *et al.*, 2020; Nandan 2006; Edelman *et al.*, 2005). Sin embargo, una limitación importante para el uso del ATRA en el tratamiento antitumoral como otros anticancerígenos, se debe a que pueden ser poderosos teratógenos a dosis elevadas, por lo que pueden presentar importantes efectos secundarios por acumulación en tejido adiposo y en los sistemas: cutáneo, reproductor, visual, neurológico, músculo esquelético y hepático; motivo por el cual el tratamiento se debe restringir con dosis 150 mg/m²/día de ATRA combinado con interferón α (Arrieta *et al.*, 2010).

La toxicidad del ATRA se debe a la gran diversidad de receptores capaces de unir a esta molécula en diferentes tejidos, de hecho, el síndrome de ácido retinoico es el principal efecto colateral del tratamiento con ATRA en la leucemia promielocítica aguda, cuya incidencia es del 10 al 15% de los pacientes, con una mortalidad del 10% de los casos (Richard *et al.*, 2003).

Las características fisicoquímicas del ATRA le proporcionan limitaciones de biodisponibilidad importante en la terapia con ATRA, tanto farmacocinéticas por su inestabilidad química que aumenta el tiempo al aclaramiento, así como farmacodinámicas (Goldberg *et al.*, 2002), debido su afinidad al hígado y a tejido adiposo favorece la toxicidad por acumulación. Debido a la toxicidad asociada al ATRA se han buscado diferentes alternativas de síntesis de análogos que presentan especificidad de unión sólo a algunos receptores para inhibir la proliferación de células tumorales (Douguet *et al.*, 2019). Sin embargo, actualmente, se han desarrollado una gran variedad de nanovehículos con ATRA, por lo que representa una alternativa de tratamiento para disminuir los efectos tóxicos de la terapia convencional (Marill *et al.*, 2003), por ejemplo: los nanosistemas liposomales inyectables con ATRA, que evitan que se acumule en el hígado, puede tener ventajas sobre la administración oral (Shimizu *et al.*, 2003; Ozpolat *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2002). Otros nanovehículos que se han desarrollado son: a) las nanopartículas del tipo nanocápsulas (Karimi *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020), nanopartículas poliméricas biodegradables (Mendoza-Muñoz *et al.*, 2007); b) los liposomas (Kawakami *et al.*, 2006; Kawakami *et al.*, 2005 y Shimizu *et al.*, 2003), nanoacarreadores a base lípidos (Lim *et al.*, 2004); c) micelas poliméricas (Shiraishi y Yokoyama 2013 y Kawakami *et al.*, 2005); d) dendrímeros (Tekade *et al.*, 2008); e) nanoencapsulados (Erdoğan y Bilensoy., 2018); f) nanoesferas (Jeong *et al.*, 2004); g) nanosuspensiones (Zhang *et al.*, 2006); h) nanogel (Lee *et al.*, 2013); i) nanodiscos (Ryan *et al.* 2008) y j) microemulsiones de fosfolípidos (Hwang *et al.*, 2004).

Por su parte las NE que contienen PS₈₀ han demostrado aumentar la permeabilidad celular y potencializar el efecto del fármaco utilizado en un estudio con células resistentes a dicha sustancia (Schwartzberg *et al.*, 2018), como sucede con el PS₈₀ al estar con la doxorubicina-PS₈₀ que puede aumentar la citotoxicidad celular e inhibir la función de la P-glicoproteína. De manera semejante, las nanoesferas de polimetilmetacrilato-PS₈₀ que redujeron el 51% de la viabilidad celular en células A549 de cáncer pulmonar sin presentar citotoxicidad cuando se adiciona 1% de PS₈₀ libre (Yordanov *et al.*, 2012).

El presente estudio tuvo como objetivo nanovehiculizar el ATRA de una manera estable en una NE y para ello se debió seleccionar apropiadamente la proporción F_O:F_S:F_W para desarrollar y caracterizar el NST que favorezca la compatibilidad, estabilidad durante el almacenamiento y su posible uso en la clínica. La NE desarrollada serviría como potencial vehículo de transporte biológico para otros agentes activos haciéndolos más seguros, estables, efectivos y reduciendo la toxicidad de los componentes de manera individual optimizando las terapias mediante la nanoestructuración de sistemas de transporte.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Puede ser la nanoemulsión un NST que permita proteger la integridad de una especie química como el ATRA, para vehicularlo, manteniendo o inclusive incrementando su efecto biológico en líneas celulares de cáncer pulmonar, reduciendo así mismo su toxicidad?

HIPÓTESIS

La mezcla con alta energía, de ácido retinoico *all trans* (ATRA) y proporciones adecuadas de sólo tres aditivos: aceite/agua y un surfactante no iónico como el PS₈₀, producirá una NE capaz de actuar como NST que protege la integridad química del activo, manteniendo su efecto biológico en líneas celulares de cáncer pulmonar.

OBJETIVOS

Objetivo General

Desarrollar NE como nanosistemas de transporte para el tratamiento de cáncer pulmonar con ATRA, empleando componentes simples que permitan cuando menos igualar el efecto del ATRA no nanoestructurado.

Objetivos Particulares

- Realizar estudios de preformulación del ATRA con diferentes aceites, surfactantes y agua para determinar su afinidad química.
- Desarrollar formulaciones de nanosistemas con aceites, surfactantes y agua a diferentes concentraciones y condiciones para obtener la formulación más estable.
- Caracterizar los nanosistemas de transporte empleando dispersión dinámica de luz para determinar su tamaño.
- Evaluar la estabilidad de las formulaciones empleando calorimetría de barrido diferencial y dispersión dinámica de luz a diferentes tiempos de almacenamiento.
- Determinar el efecto biológico del ATRA y de cada uno de los excipientes de NE por separado en líneas celulares.
- Comparar la inhibición del crecimiento al 50% de NE con y sin ATRA en líneas celulares de pulmón normal y de cáncer de pulmón.

Capítulo III. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales: Reactivos y disolventes

Para la fase oleosa (FO) de las formulaciones NE se utilizó ácido oleico (AO) con 90% de pureza (Sigma-Aldrich®) y alcohol oleico (OA) con 85% de pureza (Sigma-Aldrich®) se usó como la fase oleosa (FO) en las formulaciones. Como agente tensoactivo (FS) se utilizó: Polisorbato 80® (PS₈₀, monooleato de sorbitán PEG (80) o nombre comercial Tween 80® de Croda), probando tres lotes comerciales de PS₈₀: lote 1 de PS₈₀-1 *Croda* del lote 000355181 de uso farmacéutico y dos lotes de *Sigma Aldrich* el PS₈₀-2 del lote 038K0090, y el PS₈₀-3 lote BCBFPOOTV; dodecilsulfato de sodio (DSS) marca Biorad y cloruro de oleilamonio y oleato de potasio sintetizados *in situ*. Como disolvente del AO se usó alcohol etílico (Merck) para determinar la citotoxicidad y como fármaco liposoluble el ácido retinoico *all trans* al 98% HPLC R2625-50MG 066K1044 Sigma.

Materiales: Equipos

Reductores de tamaño de partícula: homogeneizador ultrasónico

En el presente trabajo se utilizó el método de ultrasonificación que permitió la formación de partículas de la FI mediante la cavitación como fuente de energía, favoreciendo la reducción de las gotas recién formadas debido a la explosión en gotas más pequeñas, cuando su presión interna era mayor comparada con la presión externa, debido a que no podían absorber más energía del sistema (Salvia-Trujillo *et al.*, 2013).

Para la obtención de NE se utilizaron dos tipos de sonicadores: en la primera etapa, el *Omni Ruptor 250*® Homogeneizador ultrasónico de 20kHz, de *Omni International Inc.*, operando a 250 W fijos y con una punta de titanio sólida de 9.5 mm y en la segunda etapa el *Vibracel*® de 20 kHz, 750 W *Sonics*, con una punta de 13mm de diámetro.

Determinación de tamaño de partícula

Para determinar el tamaño de partícula en el presente trabajo se utilizaron los métodos de dispersión de luz dinámica (DLS) que permitieron evaluar las partículas de la FI que se encuentran suspendidas en la FE y que por difracción y refracción de la luz se consiguió determinar el radio hidrodinámico para conocer el índice de polidispersidad, cuyos valores de monodispersidad o polidispersidad de las NE desarrolladas permitieron seleccionar la formulación monodispersa con un IPD menor que son indicativos de una mayor estabilidad en periodos de tiempo de estudio más prolongados.

Los dos equipos empleados para determinar el tamaño de partícula fueron dispersores de luz dinámica, el primer equipo de marca *ProteinSolutions*, modelo *DynaPro 99*[®], utilizó el software *Dynamics Versión 5.24.02*, determinando diámetros, radios hidrodinámicos e IPD, sin embargo, ya en la segunda etapa se dejó de usar durante el transcurso de la investigación, debido a falta de aditamentos y consumibles, sustituyéndose por el DLS de marca *Malvern*[®], modelo *Zetasizer NanoDS*, con rango de 0.6 nm-6 μm en modo de retrodispersión, con el software *DTS-Nano*[®] versión 1.41.

Determinación de estabilidad térmica a través de DSC

Se utilizó un microcalorímetro de barrido diferencial (DSC) marca *MicroCal*TM, modelo *VP-DSC*[®], con un volumen de muestra de 0.5μL. Los termogramas normalizados por los componentes molares del sistema se corrigieron al inicio para minimizar la complejidad de la solución utilizando el ajuste por deconvolución. La deconvolución es una técnica matemática que se realizó para cada una de las muestras analizadas, la cual comprende de: i) ajustar las funciones gaussianas individuales, ii) realizando corrección de los parámetros de funciones gaussianas separadas, y iii) todas las últimas en conjunto para lograr el mejor ajuste entre las envolventes calorimétricas calculadas y experimentales a través de un procedimiento iterativo en el software *Origin*[®] (Schäffer *et al.*, 2005).

Determinación de morfología de los NST a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La morfología de las NE del presente trabajo se investigó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Klang *et al.*, 2012) con contraste de fase utilizando un microscopio electrónico marca *JEOL*, modelo 1010 a 60kV. Y las imágenes de las muestras se obtuvieron utilizando una cámara Perfección *Epson*, Foto V700 con sistemas de doble lente. Se empleó la técnica de tinción negativa, debido al tipo de muestras obtenidas experimentalmente, ya que en esta modalidad de tinción los nanoobjetos, y en el caso particular la NE normalmente aparecen como gotas de luz sobre un fondo más oscuro (Araujo *et al.*, 2011).

Las técnicas de tinción negativa empleada requirieron de una preparación previa de la muestra la cual consistió en colocar una gota de la NE sobre una rejilla recubierta de carbono, donde se absorbió aplicándole la sal de acetato de uranilo para teñir. Posteriormente a su secado, se consiguió observar por TEM a temperatura ambiente, identificando las estructuras deshidratadas de las gotitas de NE que fueron estabilizadas por el tensoactivo. En donde los iones metálicos que se dispersaron formaron un escudo amorfo que envolvió la Fo, mientras que otros iones metálicos que se dispersaron más débilmente, lo cual permite una mejora del contraste de las microfotografías observándose las NE como gotas de luz sobre un fondo más oscuro (Klang *et al.*, 2012). Sin embargo, esto puede variar según la afinidad fisicoquímica del

agente colorante con los componentes interfaciales (Arredondo-Ochoa *et al.*, 2017). La determinación por TEM puede variar según el estudio de nanoestructuras en el caso nanopartículas al ser cuerpos tridimensionales, las medidas se basan en mediciones sobre una imagen bidimensional y en caso de medidas por DLS la aproximación de este cuerpo a esferas perfectas (simulaciones basadas en la teoría de Mie). Debido que en la microscopía TEM el tamaño corresponde a la medida de la “sombra” o la proyección de la imagen definida por el núcleo metálico y en el diámetro medido por DLS será, en cambio, el diámetro hidrodinámico, definido no solamente por el tamaño del núcleo metálico sino también por la doble capa eléctrica que se genera entre la superficie de la partícula y el seno de la solución (Botasini, 2020).

Métodos

Obtención de las nanoemulsiones

La metodología de obtención de las NE se dividió en cinco etapas que se clasificaron con base a los objetivos a demostrar, los cuales se describen en general en la etapa 1, inició con el diseño de experimentos y preformulación en donde se estudiaron los F_{IF} para seleccionar los excipientes para obtener las NE de mayor estabilidad y sus interacciones de acuerdo a la afinidad química; etapa 2, del desarrollo de NE se determinaron los factores extrínsecos de la producción (F_{EP}) obteniendo la metodología que estuvo acorde con las variaciones a) en el tipo y tiempo de agitación, se clasifican por el tipo de mezclador: i) premezclado manual (TAm) identificado como método 1; ii) mecánico (TAM) o método 2 y iii) ultrasonificación (TAU) o método 3; b) la temperatura de emulsificación (T_{emul}) y la velocidad de enfriamiento y c) el orden de incorporación de los componentes; la etapa 3, permitió la caracterización de las NE; la etapa 4. se estudió la estabilidad mediante DSC de manera complementaria con DLS y la etapa 5, se determinó el efecto biológico de los componentes de las NE sin y con ATRA, ver figura 3.

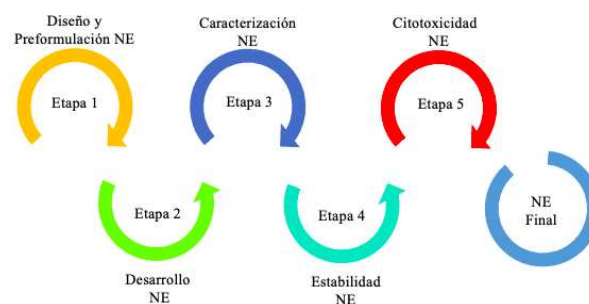


Figura 3. Diseño de flujo de la metodología de obtención de NE se dividió en cinco etapas que se clasificaron con base a los objetivos a demostrar.

Etapa 1. Diseño y preformulación de nanoemulsiones (NE)

El diseño y preformulación de las NE en estudio permitieron seleccionar los excipientes para obtener NE estables sin y con ATRA, reduciendo y controlando las interacciones entre el aceite de la F_O , del tensoactivo de la F_S y del agua como F_W debidas a la afinidad química entre ellas, por lo que, el diseño de experimentos permitió estudiar las variables de los F_{IF} .

Las NE obtenidas en este trabajo son del tipo O/W , que permitió nanovehicular un activo liposoluble en la F_O , en una relación: $F_O:F_S:F_W$ obteniendo partículas de diámetro menor de 100 nm y con un comportamiento térmico estable.

El diseño experimental se basó en el método factorial de Box y Hunter (Méndez *et al.*, 1990) con tres variables independientes iniciales, $F_O:F_S:F_W$. La proporción de F_S se mantuvo en 5% para simplificar los grados de libertad del sistema debido a la alta estabilidad cinética con fases de aceite insoluble (Li *et al.*, 2013), también por razones de seguridad, debido que un estudio realizado por Sun y colaboradores determinaron que dosis superiores al 10% de F_S aumenta de la citotoxicidad de osteoblastos (Sun *et al.*, 2014). El sistema en estudio se simplificó utilizando sólo tres variaciones porcentuales de 1.5, 2.0 y 2.5% de F_O con 5.0% de F_S fija en una proporción de $F_O:F_S$ [0.3=1.0:3.3], [0.4=1.0:2.5] y [0.5=1.0:2.0] que representa una baja, media y alta relación de F_O con F_S , respectivamente.

Factores intrínsecos de la formulación

El desarrollo de este estudio permitió evaluar cómo influyeron F_{IF} de la formulación en la estabilidad de las NE. Entre los cuales, se enfatizó la importancia del tipo de tensoactivo, por lo que se utilizaron tensoactivos sintetizados *in situ* y surfactantes comerciales adicionados externamente. Los F_{IF} para obtener NE se dividen en cinco fases: 1) Naturaleza química de las F_S y F_W en el sistema; 2) Estructura química de las F_O y F_S del sistema; 3) F_S aniónico y catiónico sintetizado “*in situ*” y adición externa de tensoactivo iónico; 4) F_S no iónico comercial adicionado externamente y 5) Variaciones de la concentración en la F_O , ver figura 4.

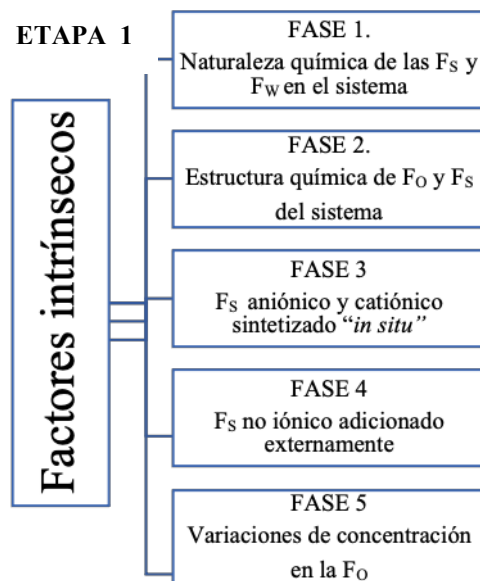


Figura 4. Descripción de las cinco fases de la metodología para evaluar los factores intrínsecos de la formulación (FIF).

Fase 1: Naturaleza química de las fases del sistema: F_O , F_S y F_W . La selección de los componentes para obtener las NE se basó principalmente en la naturaleza química de las fases, su relación porcentual $F_O:F_S:F_W$ y el coeficiente de partición.

La naturaleza química de las fases determina: el orden de adición de los excipientes en la formulación, según: a) la afinidad lipofílica da la pauta para incorporar los excipientes en la F_O o por su alta afinidad hidrofílica se distribuyeron en la F_W , debido que está última está conformada por agua y por todos los componentes hidrosolubles y cuya función principal es de diluyente que permite dispersar la F_O con la ayuda de la F_S ; b) el estado físico de los componentes sólidos para alcanzar la temperatura de fusión, permitiendo que las dos fases se encuentren líquidas y facilitar su ruptura; c) estabilización de la gota durante la emulsificación para evitar que las gotas recién formadas se fusionen al chocar (maduración de Ostwald) formando gotas mayores (Meleson *et al.*, 2004; Tadros *et al.*, 2004), por lo que, el aumentar la velocidad de enfriamiento utilizando un baño con hielo es un recurso para la estabilización del sistema y d) la selección del tipo de tensoactivo iónico *in situ* o el dodecil sulfato de sodio (DSS) o el surfactante no iónico como el PS_{80} .

Fase 2: Estructura química de las fases: F_O y F_S . La prueba para evaluar la interacción de la estructura química de la F_O con la F_S (tensoactivo no iónico, PS_{80}) a concentración constante se obtuvo al estudiar el AO y el OA como F_O en las muestras de estudio. El procedimiento consistió en desarrollar las NE siguientes: a) variando el alcohol oleico a dos concentraciones; OA_1 (1.5%) y OA_2 (2.5%) en una relación porcentual de $F_O:F_S:F_W$ [1.5:5.0:93.5] y [2.5:5.0:92.5] respectivamente y b) NE obtenidas para

comparar el OA₂ con el AO en relación [2.5:5.0:92.5] con el método 2_A, que consiste en adicionar la F_S en la F_W, ver tabla 3.

Tabla 3. Estructura química de las fases: FO y FS para la obtención de nanoemulsiones para evaluar la interacción de la estructura química de la FO con FS (5% PS₈₀) a concentración constante sustituir la FO con AO y OA como muestras de estudio.

A) Muestra	F _O	%[F _S]	%[F _O :F _S :F _W]
OA ₁	Alcohol oleico	[1.5]	[1.5:5.0:93.5]
OA ₂	Alcohol oleico	[2.5]	[2.5:5.0:92.5]
B) Muestra			
OA ₂	Alcohol oleico	[2.5]	[2.5:5.0:92.5]
AO	Ácido oleico	[2.5]	[2.5:5.0:92.5]

Fase 3. F_s iónica sintetizada in situ y externa. Al principio se obtuvieron NE a partir de tensoactivos *catiónicos* y *aniónicos in situ*. Las NE se obtuvieron con concentraciones de reactivos diferentes, con un ultrasonificador marca *Sonics*, modelo *Vibra Cell* de 750 watts con 40% de potencia, a concentraciones variables de reactivos.

Los tensoactivos *aniónicos* y *catiónicos in situ* se sintetizaron a través de reacciones químicas simples, reaccionando las F_O: ácido oleico y oleilamina en una relación 1:(2/3) con una base (hidróxido de potasio) o con un ácido (ácido clorhídrico) respectivamente, para obtener *in situ* el tensoactivo *aniónico*, oleato de potasio y el *catiónico*, cloruro de oleilamonio, dispersándose en agua y utilizando la fase oleosa restante para la formación de los NST.

El tensoactivo *aniónico in situ*, oleato de potasio se obtuvo estequiométricamente al aumentar las concentraciones porcentuales de 5, 10, 25, 39, 50, 75 y 100 (0.24, 0.478, 1.19, 1.92, 2.39, 3.58, 4.78 g) que corresponden a 0.0008, 0.0016, 0.0042, 0.0067, 0.0084, 0.0126 y 0.0169 moles de ácido oleico respectivamente, que actuó como reactivo precursor reaccionando con 0.6136 g con una concentración molar fija de 0.0109 moles de hidróxido de potasio y 25.5 g de agua (Solè *et al.*, 2006). El tensoactivo *catiónico in situ*, cloruro de oleilamonio, se sintetizó variando concentraciones entre 10, 20, 40, 60, 80 y 100% (0.45, 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 y 4.5g) que corresponden a 0.0016, 0.0033, 0.0067, 0.0100, 0.0134, 0.0168 moles de oleilamina que reacciona con 0.7745g de ácido clorhídrico a concentración molar fija y 25.5 g de agua (Maestro *et al.*, 2008). Tabla 4.

Tabla 4. Obtención del tensoactivo *aniónico in situ*, oleato de potasio y tensoactivo *catiónico in situ*, cloruro de oleilamonio.

Obtención de oleato de potasio: ácido oleico + hidróxido de potasio + agua		
%[Ácido oleico]	[Ácido oleico] g	[Ácido oleico] moles
5, 10, 25, 39, 50, 75 y 100	0.24, 0.478, 1.19, 1.92, 2.39, 3.58, 4.78	0.0008, 0.0016, 0.0042, 0.0067, 0.0084, 0.0126 y 0.0169 (0.8, 1.6, 4.2, 6.7, 8.4, 12.6 y 16.9 x 10 ⁻³)
Obtención de cloruro de oleilamonio: oleilamina + ácido clorhídrico + agua		
%[Oleilamina]	[Oleilamina] g	[Oleilamina] moles
10, 20, 40, 60, 80 y 100	0.45, 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 y 4.5 g	0.0016, 0.0033, 0.0067, 0.0100, 0.0134, 0.0168 (1.6, 3.3, 6.7, 10.0, 13.4, 16.8 x 10 ⁻³)

Las características para evaluar las muestras fueron: la apariencia física, transparencia-turbidez, líquida-viscosa, color y tamaño de partícula (nm).

Posteriormente, se obtuvieron NE a partir del tensoactivo iónico dodecil sulfato de sodio (DSS) que se adicionó externamente a una concentración fija de 5% quedando la fórmula para las propuestas experimentales de NE, en proporciones de $F_O:F_S:F_W$: [1.5:5.0:93.5]; [2.5:5.0:92.5]; [3.5:5.0:91.5] y [4.5:5.0:90.5] utilizando el método 2_A. El DSS es un tensoactivo iónico del tipo aniónico que se disocia en anión anfífilo y un catión, por lo que puede actuar como cotensoactivo al combinarse con un tensoactivo, por lo que se estudió el efecto de la naturaleza como F_S (F_{DSS}) en el tamaño de partícula de las NE.

Fase 4. FS no iónica adicionada externamente. El estudio permitió determinar la influencia del PS₈₀, comparando tres diferentes lotes comerciales; PS₈₀₋₁ y PS₈₀₋₂ se evaluaron como F_S mediante la obtención de NE con AO como F_O mediante el método 2_A (F_S adicionada en la F_W). Posteriormente, un tercer tensoactivo comercial, PS₈₀₋₃ se comparó con el método 2_O (F_S adicionada en la F_O). Las NE obtenidas con PS₈₀₋₁, PS₈₀₋₂ y PS₈₀₋₃ se compararon con respecto a los tamaños de partícula, mediante el radio hidrodinámico en nanómetros [Rh (nm)] y el porcentaje en masa de la distribución (%M) de cada uno de ellos.

Para determinar la concentración del PS₈₀₋₃ se obtuvieron NST con 1.0, 2.5, 3.5, 4.5 hasta 5.0 %, manteniendo constante 1.0% de ácido oleico como F_O en una relación porcentual de $F_S:F_O:F_W$: [5.0:1.0:94.0]; [4.5:1.0:94.5]; [3.5:1.0:95.5]; [2.5:1.0:96.5] y [1.0:1.0:98.0] utilizando el método 2_A.

También se evaluó el efecto de la temperatura de emulsión de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 2^\circ\text{C}$ en las NE másicas, empleando tensoactivo comercial, que presentaron la transparencia y el tamaño nanométrico característicos. Las NE se desarrollaron en una relación de $F_O:F_S:F_W$ ($AO:PS_{80}:W$) en concentraciones fijas de 1% de F_O ; de 5.0, 4.5, 3.5, 2.5, 1.0 y 0% de F_S y 94.0, 94.5, 95.5, 96.5, 98.0 y 99.0% de F_W para determinar el porcentaje de F_S y se varió la temperatura de emulsión de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ (muestra R₁ a R₆) y $70 \pm 2^\circ\text{C}$ (muestras M₁ a M₆).

Fase 5. Variaciones de la concentración en la Fo. Las NE obtenidas con ácido oleico como F_O se formularon a concentraciones baja (1.5%), media (2.0%) y alta (2.5%). La proporción de la F_S (PS₈₀) se mantuvo en 5% para simplificar los grados de libertad del sistema, debido a la alta estabilidad cinética con F_O insoluble (Li *et al.*, 2013) también por razones de seguridad, ya que como se estipuló anteriormente se ha observado un aumento de la toxicidad a dosis superiores al 10% del tensoactivo (Sun *et al.*, 2014).

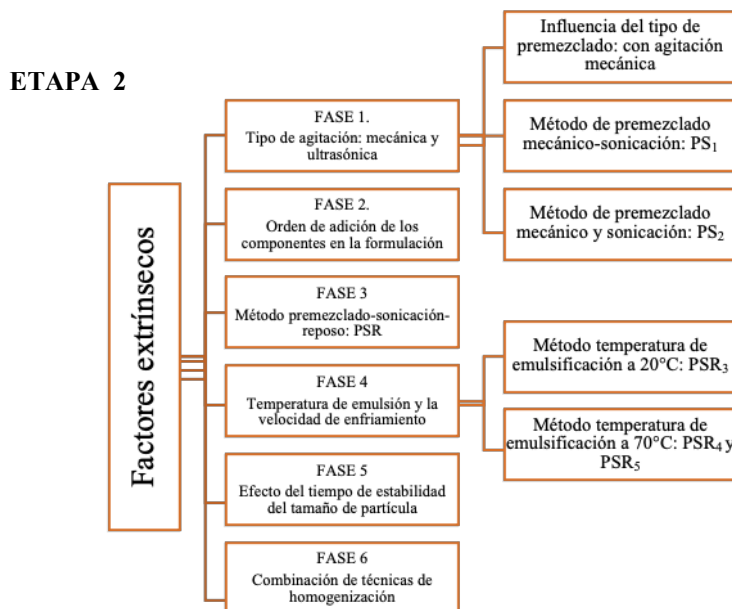
En los métodos descritos a continuación se mantuvo la concentración de F_S al 5% de PS₈₀ y variándola con respecto al ácido oleico en relaciones $F_O:F_S:F_W$ [1.5:5.0:93.5]; [2.0:5.0:93.0] y [2.5:5.0:92.5] respectivamente, ajustando con F_W para conseguir el 100%.

Etapa 2. Desarrollo de NE: Nanoemulsiones

Factores extrínsecos de la producción de NE

Los F_{EP} son todos los factores externos que afectan a la obtención del sistema homogéneo, tales como el estudio en fases: 1) el tipo de agitación mecánica y ultrasónica; el primero permite la permanencia de la gota en la dispersión (Jafari *et al.*, 2008) y el segundo es el periodo de agitación del proceso de reducción de tamaño de la fase interna en el mezclado (Yuan *et al.*, 2008), debido a la geometría de la hélice; 2) el orden de adición de los componentes en la formulación (Sajjadi 2006^b); 3) los periodos de agitación con ultrasonido y reposo; 4) la temperatura de emulsión y la velocidad de enfriamiento para reducir la posibilidad de fusión de las partículas (Schalbart *et al.*, 2010); 5) el tiempo de estabilidad del tamaño de partícula y 6) el grado de solubilidad de la F_S en la F_W , ver tabla 5.

Tabla 5. Descripción de las seis fases de la metodología para evaluar los factores extrínsecos de la producción (FEP).



Fase 1. Tipo de agitación de baja y alta energía. El estudio del tiempo y tipo de agitación mecánica y/o ultrasónica, donde el primero adiciona baja energía de agitación al sistema, permitiendo mayor permanencia de la gota en la dispersión (Jafari *et al.*, 2008) y si continúa el periodo de agitación adicionando alta energía se favorece al reducción de tamaño de la fase interna (Yuan *et al.*, 2008). Los equipos de alta energía que se utilizan para obtener NE pueden utilizar combinación de propelas de hélice y rotor estator de alta cizalla (Leong *et al.*, 2009; Solans *et al.*, 2005) así como, puntas para ultrasonido variando la amplitud de la energía de cavitación (Kentish *et al.*, 2008). Finalmente, el proceso de reducción de tamaño de la fase interna en el trabajo se realizó con ultrasonicador para obtener un incremento en la homogeneidad y estabilidad del sistema.

Influencia del tipo de premezclado: con agitación mecánica. El método m1 consistió en incorporar los componentes de la F_S a la F_W con agitación manual y mecánica durante 30 min (TAM) obteniendo el método {TAM:TAM} y aplicando ultrasonido a temperatura ambiente, evaluando tres concentraciones de F_O con base a la relación [$F_O:F_S$]: a) m1a de [1.5:5.0]; b) m1b con [2.0:5.0] y c) m1c con [2.5:5.0] completando el 100% con F_W .

Método de premezclado mecánico-sonicación: PS₁. El método PS₁ consistió en incorporar la F_S a la F_W con TAM hasta una completa disolución y aplicando {TAM:TAU}, variando la concentración de la F_O con base a la concentración de 1.5, 2.0 y 2.5% de F_O en una relación [$F_O:F_S$]: a) M1a con [1.5:5.0]; b) M1b con [2.0:5.0] y c) M1c con [2.5:5.0] completando el 100% con F_W . Posteriormente, estos sistemas se caracterizaron para obtener el diámetro de las partículas por DLS y el comportamiento térmico a través de termogramas a tiempo inicial (T_0) y después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente (T_{30}) utilizando DSC, tabla 6a.

Método de premezclado mecánico y sonicación: PS₂. Las muestras obtenidas con el método PS₂ se diferencian por la variación porcentual de la F_O en una relación [$F_O:F_S$]: a) PS_{2a} con [1.5:5.0]; b) PS_{2b} con [2.0:5.0] y c) PS_{2c} con [2.5:5.0] completando con F_W al 100%. La técnica de PS consistió en premezclar con TAM ($F_O:F_S:F_W$) y homogenizando con ultrasonido o {TAM:TAU} añadiendo la F_S a la F_W a T_{emul} $20 \pm 5^\circ\text{C}$. Posteriormente, la mezcla se agitó durante 15 min adicionales con el ultrasonicador Omni, operando a 250 W fijos con una punta de titanio sólida de 9.5 mm, tabla 6b.

Fase 2. Orden de adición de los componentes en la formulación

El estudio del orden de adición para disolución de F_S en la F_W por el método A y la disolución de F_S en la F_O por el método O. En la primera, se probaron muestras con diferentes concentraciones de la F_O [1.0, 2.0 y 2.5%] en proporciones $F_O:F_S:F_W$, variando el orden de adición de la F_S : en la FE acuosa, mediante el método PS₂, ver tabla 6b y en la segunda se utilizó el método O con la misma formulación de $F_O:F_S:F_W$ [2.5:5.0:92.5] obtenida por {TAM:TAU}_{PSR2}, ambos métodos a la T_{emul} de $20 \pm 5^\circ\text{C}$ para su nanoestructuración, ver tabla 6c.

Fase 3. Método premezclado-sonicación-reposo: PSR

El método PSR se desarrolló en el presente estudio para preparar $NE_{O/W}$ utilizando un procesador de cavitación ultrasónica que funciona a frecuencias más altas y parámetros ajustables en comparación con los indicados en la técnica {TAM:TAU}. El PSR o técnica 2.5'x2.5' fue el resultado de la modificación del método PS₂ ajustando la amplitud acústica (ζ) del 40% y variando los periodos de 2.5 minutos de agitación por 2.5 minutos de reposo hasta completar 15 minutos, manteniendo la temperatura a $15 \pm 2^\circ\text{C}$ con un baño con hielo y utilizando en este caso el procesador ultrasónico *Vibracel 750 de Sonics*, con una punta de titanio sólida de 13mm de diámetro, ver tabla 6c, d y e.

Fase 4. Temperatura de emulsión y la velocidad de enfriamiento

La fase 4 permitió evaluar la temperatura de emulsión a 20°C y 70°C y la velocidad de enfriamiento que reduce la posibilidad de fusión de las partículas (Schalbart *et al.*, 2010). El método PSR fue utilizado como metodología base, variando las condiciones de temperatura de emulsión y velocidad de enfriamiento rápido con un baño de hielo o lento hasta llegar a temperatura ambiente, ver tabla 6c y d.

Método temperatura de emulsificación a 20°C: PSR₃. El método PSR₃ se obtuvo por premezclado mecánico con homogenización ultrasónica añadiendo la F_S a F_O (método O) con formulación a concentración de [2.5:5.0] completando con F_W al 100% y a una T_{emul} 20 ± 5°C, ver tabla 6c.

Método temperatura de emulsificación a 70°C: PSR₄ y PSR₅.

La influencia en el tamaño de partícula por la temperatura de emulsión de 70°C y la velocidad de enfriamiento de 70 a 25°C se estudiaron en las muestras PSR₄, obtenidas por el método 3_A y en las muestras PSR₅ por el método 3_O. Las muestras PSR₄ y PSR₅ con concentraciones [2.5:5.0:92.5]% de F_O:F_S:F_W se obtuvieron a temperatura de 70°C ± 2°C y se enfriaron de 70 a 25°C variando la velocidad de enfriamiento a las muestras siguientes: a) PSR_{4a} y PSR_{5a} se enfriaron rápidamente mediante un baño de hielo y b) la PSR_{4b} y PSR_{5b} lentamente hasta que llegó a temperatura ambiente, tal como, se describe en la tabla 6d. Posteriormente estas muestras se caracterizaron respecto a los tamaños de partícula mediante la distribución de las partículas, el radio hidrodinámico en nanómetros [Rh (nm)] y el porcentaje en masa de la distribución (%M).

Fase 5. Efecto del tiempo de estabilidad del tamaño de partícula

El estudio que mostró la variación del tamaño de partícula y su comportamiento térmico durante el tiempo de maduración o estabilización del sistema, consistió en el análisis de las muestras en diferentes periodos de tiempo a partir de su fabricación conocido como tiempo inicial (T₀), después de 24 h (T₂₄) y hasta las 48 h (T₄₈), mostrando las variaciones de diámetros de partículas (nm) con respecto al tiempo de análisis.

Fase 6. Combinación de técnicas de homogenización: PSR₆

El estudio consistió en evaluar el efecto del orden de adición de la F_W, mediante el método PSR se obtuvieron las muestras con las diferentes proporciones [F_O:F_S:F_W]% siguientes: a) PSR_{6a} con una proporción [2.0:5.0:93.0]%, se adicionó la F_S y F_O al 50% de F_W mezclando por 10 min y completando el 100% de F_W completando los 30 min; b) PSR_{6b}, con [1.5:5.0:93.5]%, completando el 100% de F_W; c) PSR_{6c}, con [2.0:5.0:93.0] y d) PSR_{6d} con [2.5:5.0:92.05] finalmente todas las muestras siguieron el método {TAM:TAU} a T_{emul} = 15 ± 2°C, ver la tabla 6d.

Tabla 6. Comparación de métodos de NE variando factores extrínsecos de producción.

Inciso	Método	FEP	Muestra	[F ₀]:[F _s] + F _{w100%}	Adición de F _s	T / ΔT [°C]
a)	PS ₁	{TAM:TAU}	M _{1a}	1.5:5.0	F _w (2 _A)	15 ± 2
			M _{1b}	2.0:5.0		
			M _{1c}	2.5:5.0		
b)	PS ₂	{TAM:TAU}	PS _{2a}	1.5:5.0	F _w (2 _A)	20 ± 2
			PS _{2b}	2.0:5.0		
			PS _{2c}	2.5:5.0		
c)	PSR	{TAM:TAU _{2.5 x2.5} }	PSR ₃	2.5:5.0	F ₀ (2 ₀)	20 ± 2
			PSR _{4a}	2.5:5.0	F _w (3 _A)	70 a 25 lento
d)	PSR	{TAM:TAU _{2.5 x2.5} }	PSR _{4b}	2.5:5.0		F _w (3 _A)
			PSR _{5a}	2.5:5.0	F ₀ (3 ₀)	
			PSR _{5b}	2.5:5.0		F ₀ -F _s : F _{w50%} + F _{w50%}
			PSR _{6a}	2.0:5.0	F ₀ : F _{w100%}	
e)	PSR	{TAM:TAU _{2.5 x2.5} }	PSR _{6b}	1.5:5.0	F ₀ : F _{w100%}	15 ± 2
			PSR _{6c}	2.0:5.0	F ₀ : F _{w100%}	15 ± 2
			PSR _{6d}	2.5:5.0	F ₀ : F _{w100%}	15 ± 2

Abreviaturas: Método premezclado-sonicación (PS); método premezclado-sonicación-reposo(PSR); tiempo agitación mecánica (TAM); tiempo agitación ultrasonido (TAU) y tiempo agitación ultrasonido (TAU_{2.5 x2.5}).

Etapa 3. Caracterización de las NE

Para estudiar la estabilidad de las NE obtenidas bajo las distintas condiciones experimentales, éstas se evaluaron conforme sus características físicas, tales como: el aspecto físico (el color) y grado de turbidez (tamaño de partícula). Las muestras obtenidas fueron caracterizadas con técnicas de DLS para conocer el tamaño de partícula y simultáneamente se determinó el comportamiento térmico por DSC de las diferentes muestras de estudio.

Aspecto físico. La homogeneidad en la apariencia física fue un criterio de selección inicial para la caracterización de los sistemas preparados. Esto se llevó a cabo a través de la observación directa para aceptar o rechazar las muestras con relación a que éstas presentaron una apariencia translúcida con un toque tornasol, resultando del efecto *Rayleigh* característico de los sistemas nanoestructurados y de coloide de esta escala nanométrica (< 700 nm), el cual permitió descartar de forma rápida los sistemas que mostraron alta turbidez de color blanco sin efecto tornasol, que carecen o que tienen bajas concentraciones de nanoestructuración. Otro criterio para seleccionar sistemas nanoestructurados fue a través de la alta

resistencia a la sedimentación por fuerzas de gravedad que presentan contando con esos tamaños tan pequeños. Los sistemas preseleccionados que mostraron translucidez se centrifugaron durante 30 min a 10,000 rpm seleccionándose las muestras que no mostraban separación visible que son características de las macroemulsiones que se ven afectadas por la fuerza de gravedad.

Tamaño de partícula. La turbidez se evaluó mediante la determinación del tamaño de partícula de los sistemas que no se separaron en la prueba de estabilidad y centrifugación, mediante dos técnicas de DLS. El primero ya se constaba con él en el laboratorio era un modelo *ProteinSolutions DynaPro 99*[®], con el software *Dynamics Versión 5.24.02* y el segundo fue una nueva adquisición fue el *Zetasizer NanoDS, Malvern*[®] que puede medir el tamaño de partícula en el rango de 0.6nm-6µm en modo de retrodispersión con el software *DTS-Nano*[®] software versión 1.41.

Tratamiento de las muestras en estudio. Las muestras se diluyeron para tener una concentración de partículas determinada para que la luz láser pueda dispersarse para medir los diferentes parámetros de diámetro (D), radio hidrodinámico (R) en nanómetros, % de masa (%M), polidispersidad (%PD) y el índice de polidispersidad (IPD) para obtener el tamaño de partícula de la muestra en estudio programando en un promedio de 20 de acumulaciones.

Determinación morfológica mediante microfotografía. La microscopía electrónica de transmisión se ha descrito como una herramienta adecuada para caracterizar las nanoemulsiones (Klang *et al.*, 2012). La morfología de las NE obtenidas se investigó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, *Transmission electron microscopy*) utilizando un equipo *JEOL*[®] 1010 a 60 kV y las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara *Perfección Epson. Foto V700*, sistemas de doble lente. Las muestras se prepararon con técnicas de tinción negativa y sin cobertura con carbono (Araujo *et al.*, 2011).

Etapa 4. Estudios de estabilidad de NE por calorimetría de barrido diferencial

La estabilidad térmica de las NE se determinó con el estudio de su comportamiento térmico por DSC y el posterior análisis de termogramas mediante la técnica de deconvolución (Schäffer *et al.*, 2005).

El DSC utilizado fue un micro calorímetro marca *MicroCal*TM, modelo *VP-DSC*, con un volumen de muestra de 0.5 µL por corrida, un intervalo térmico de 20 a 120°C, a una velocidad de barrido de 1°C·min⁻¹ utilizando el software *Origin*[®], lo que permitió determinar las temperaturas y las entalpías en función de los termogramas obtenidos. La deconvolución permitió determinar el área bajo la curva o ΔH en kcal·mol⁻¹ del sistema, a través del tratamiento de los termogramas normalizados con una distribución anormal de los 3 ciclos de calentamiento de las muestras en estudio.

La metodología conocida en el presente trabajo como método DSC 3x3 consistió en obtener los termogramas totales que representan tres ciclos de calentamiento-enfriamiento, iniciando el calentamiento

de 20 a 120°C a una velocidad de calentamiento de 1°C·min⁻¹ y con un enfriamiento previo antes de iniciar el siguiente calentamiento. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Las entalpías de cada muestra se expresaron en kcal·mol⁻¹ después de restar su línea base. La deconvolución de los picos de los termogramas obtenidos se desarrolló a través de una técnica de descomposición en las curvas gaussianas mínimas necesarias para describir las envolventes térmicas experimentales de una manera muy similar al método de *Schäffer* (*Schäffer et al.*, 2005).

Los termogramas normalizados por los componentes molares masivos del sistema pueden corregir con la técnica de deconvolución aplicada a cada una de las muestras analizadas: ajustando las funciones gaussianas individuales; corrigiendo de los parámetros de funciones gaussianas separadas para lograr el ajuste entre las envolventes calorimétricas calculadas y experimentales a través del software *Origin*[®]. Algunas envolventes se ajustaron mediante el empleo de 5, 6 o incluso 7 funciones gaussianas, ya que fueron las mínimas necesarias para conseguir la reproducibilidad de cada envolvente experimental, con respecto a la envolvente calculada, empleando un método estadístico de regresión no lineal de análisis. En todos los casos probados se llevaron a cabo experimentos que empleaban de 3 a 10 funciones gaussianas y procedimientos iterativos para asegurar que la solución del sistema sea única y consistente.

Etapas 5. Estudio de citotoxicidad de las NE

La citotoxicidad de las NE se determinó por el proceso de inhibición de la proliferación al 50% en líneas celulares, empleando células A549 y células NL20. Método WST: a) reactivo para proliferación celular WST-11, 644 807 001 Roche; b) tripsina 0.5%; c) medio DMEM al 50%: (+) L glutamina, +15 mM HEPES; REF 11330-032 500mL; d) medio F12 *Nutrient Mixture Ham IX*, Referencia 11765 (+) L glutamina; e) suero fetal bovino y f) *buffer* PBS10X y agua de calidad ultrapura *MilliQ*[®].

Modelo de estudio *in vitro* constituido por células que crecen en monocapa en condiciones controladas para determinar la actividad biológica en las NE en el presente trabajo. Las NE vacías (NE_v) que están compuestas por la proporción de AO:PS₈₀:Agua [2.0:5.0:93.0:]_{Final}; ii) NE completas (NE_c) en formadas por [ATRA:AO:PS₈₀:Agua], para obtener las NE_c finales a concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM de ATRA.

Determinación de citotoxicidad *in vitro* de la NE por cultivo celular

Se requirió de dos líneas celulares: las NL20 de epitelio bronquial humano normal inmortalizada y las A549 de carcinoma epidermoide pulmonar (tipo histológico de CPCNP).

Líneas celulares NL20 y A549. Las células NL20 (ATCC[®]: CRL-2503) son células epiteliales bronquiales humanas no tumorigénicas inmortalizadas, se cultivaron rutinariamente en medio F12 de Ham

(Invitrogen, 21700-026) suplementado con 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de Suplemento de crecimiento epitelial (Invitrogen S0155) a 37°C en una incubadora humidificada con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Las células A549 (ATCC®: CCL-185) provienen de tejido carcinomatoso de pulmón y se cultivaron en medio DMEM-F12 con 10% de SFB a las mismas condiciones previamente mencionadas.

Determinación de citotoxicidad in vitro de la NE. La esterilización de la NE se debe realizar previamente: cuando no contiene ATRA, la NE_V, se coloca en una caja de Petri estéril y se expone con luz UV por 15 minutos; cuando contiene ATRA, NE_C, se debe realizar este paso en la oscuridad.

Método de citotoxicidad de la NE_V por el método WST

Siembra de línea celular en placa con 96 pozos. La línea celular A549 o NL20 se siembran en una placa de 96 pozos a una densidad celular de 1 x 10⁴ células por pozo, con su medio de cultivo respectivo que contiene SFB y se incuban por un periodo de 24 h a 37°C con atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se aspiran los pozos y se adiciona 300 µL de una dilución de la NE_V con medio de cultivo y como testigo se adiciona medio con SFB. Se realizaron triplicados y se incubó la placa por 48 h. Finalmente se aspira el medio, se adiciona 110 µL de reactivo a cada pozo (preparado al momento con 10 µL de WST disuelto en 100 µL de medio DMEM-F12) y después de 2 horas a las condiciones de incubación, se cuantifica espectrofotométricamente la bioreducción a 440 nm.

Preparación de las soluciones de trabajo al 0.05% de la NE_V en medio DMEM-F12. Tomando como base que el DMSO a concentración de 0.05% se ha demostrado no tener toxicidad a las células, se prepara una solución diluida de la NE_V al 0.05% en medio DMEM-F12.

$$mL_{NSTC} = \left[\frac{(0.05\%)(10mL_{DMEM-F12})}{(100\%)} \right] = 0.005mL_{NSTV} \quad (11)$$

Utilizando 5 µL de la NE_V con 10 mL de medio DMEM-F12 se obtiene 10 mL del estándar de trabajo al 0.05%.

Método de citotoxicidad de la NE_C con ATRA por el método WST

Siembra de las líneas celulares en placa con 96 pozos. La línea celular A549 se siembra en una placa de 96 pozos a una densidad celular de 1 x 10⁴ células por pozo, utilizando medio DMEM-F12 con 10% SFB y se incubó por un periodo de 24 h a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. El tratamiento consistió en adicionar a los pozos: una dilución de la NE_C en % peso que contenía 20.0µM de ATRA con medio DMEM-F12; medio DMEM-F12 (solo) y medio DMEM-F12 con 10% SFB como testigo, todos se realizaron por triplicado y se incubaron por 48 h. Finalmente se aspiraron los medios en cada pozo y se adicionaron 110µL del reactivo (preparado al momento con 10 µL de WST disuelto en 100 µL de medio

DMEM-F12) y después de 2 h a las condiciones de incubación, se cuantifica espectrofotométricamente la bioreducción a 440 nm.

NE_C en % peso. Con base a la formula en % peso de F_O:F_S:F_W (2.0:5.0:93.0); al IC_{50%} de ATRA encontrado previamente y al peso molecular del ATRA (330.44 g·mol⁻¹) se calculan los gramos de ATRA que debe contener la NE_C para tener 20 μM de ATRA:

$$g_{ATRA} = \left[\frac{(300.44 g_{ATRA})(20 \mu M_{ATRA})}{1 \times 10^6 \mu M_{ATRA}} \right] \frac{100 mL}{1000 mL} = 6.0 \times 10^{-4} g_{ATRA} \quad (12)$$

Obteniendo la formulación final en % peso con una relación de ATRA:F_O:F_S:F_W [6.0 x 10⁻⁴: 2.0:5.0:92.99] respectivamente, manteniendo las condiciones de obscuridad. Tabla 7b.

Solución Stock para obtener la NE_C con 20 μM de ATRA. Las condiciones de elaboración y almacenamiento de esta solución *stock* fueron de obscuridad para evitar la isomerización del ATRA. Con base a la IC₅₀ de ATRA en las células A549 se calcula la proporción que debe estar disuelto en 2% de la F_O.

$$g_{ATRA} = \left[\frac{(300.44 g_{ATRA})(20 \mu M_{ATRA})}{1 \times 10^6 \mu M_{ATRA}} \right] \frac{200 mL}{1000 mL} = 1.2 \times 10^{-3} g_{ATRA} \quad (13)$$

Utilizando 1.2 mg de ATRA se disuelve en 200 mL de fase oleosa para obtener 200 mL de la solución stock, Tabla 7a. Para obtener las concentraciones de estudio para determinar el IC₅₀ de la NE_C, se utilizó la ecuación 13. para preparar la solución stock de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM de ATRA se utilizaron las concentraciones de 0.6, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8 y 6.0 mg de ATRA en 200 ml de ácido oleico.

Preparación de la NE_C con ATRA. Las condiciones de elaboración y almacenamiento de esta solución *stock* fueron de obscuridad para evitar la isomerización del ATRA.

La elaboración de la NE_C en % peso [F_O:F_S:F_W (2.0:5.0:93.0)] se pesan 2 g de la solución *stock* (20 μM_{ATRA}) y se adiciona a la F_W mediante el método PSR_{Final} (pero en condiciones de obscuridad; PSR_{Final-Obs}) y obtener la NE_C con 20 μM de ATRA Tabla 7b. El resto de las completas (NE_C) finales se obtuvieron en formulaciones de [ATRA:AO:PS₈₀:Agua], variando las concentraciones de 10, 20, 40, 60, 80 y 100 μM de ATRA, para preparar las soluciones stock en gramos de ATRA para obtener las concentraciones de 0.3 x10⁻⁴; 6.0 x10⁻⁴; 12 x10⁻⁴; 18 x10⁻⁴; 24 x10⁻⁴ y 30 x10⁻⁴g de ATRA en 200 ml de ácido oleico. Para comprender la preparación de las soluciones de stock, de las concentraciones desde 10 a 100 μM de ATRA, de ejemplo manera de ejemplo se utilizó las ecuaciones 13 para calcular la NE_C con 20 μM de ATRA en 200 ml para obtener la formulación final [6.0x10⁻⁴:2.0:5.0:93.0]_{20 μM de ATRA}.

Obtención de la solución de trabajo de la NE_C con 20 μM de ATRA. Los 300 μL de solución de trabajo que se adicionaron a cada pozo se prepararon con 0.2 mL de la NE_C con 20 μM de ATRA y se

diluyeron con 0.8 mL de medio DMEM-F12 para tener un volumen final de 1 mL de la NE_C, ver tabla 7c, siempre en ausencia de luz para evitar isomerización del ATRA.

Ensayo WST de la NE_C. El procedimiento fue similar al descrito para la NE_V. Cabe resaltar que cada 300 µL de la NE_C contiene la relación: ATRA: F_O (1.2 x 10⁻⁶: 0.4 x 10⁻²) y F_S: F_W (1 x 10⁻²: 18.58 x 10⁻²)
Tabla 7c.

Tabla 7. Comparación de la concentración de las NE_V y NE_C con ATRA por el método WST en células A549. a) solución stock de ATRA 100%; b) Formulaciones al 100% de las NE_V y NE_C en %W y c) NE_V y NE_C en 1 ml de solución de trabajo.

ATRA		Solución de trabajo			NE _V				NE _C (con ATRA)				
ATRA (µM)	NE (mL)	*Medio (mL)	%w (g)	ATRA (%w)	F _O (%w)	F _S (%w)	F _W (%w)	ATRA (%w)	F _O (%w)	F _S (%w)	F _W (%w)	Total (mL)	
a)	20	-	-	-	1.2 x 10 ⁻³	200	-	-	-	-	-	-	
b)	20	-	-	-	-	2.0	5.0	93.0	6.0 x 10 ⁻⁴	2.0	5.0	92.9	100.0
c)	20	0.2	0.8	1.0	-	0.4 x 10 ⁻²	1.0 x 10 ⁻²	18.6 x 10 ⁻²	1.2 x 10 ⁻⁶	0.4 x 10 ⁻²	1.0 x 10 ⁻²	18.58 x 10 ⁻²	0.2

Abreviaturas: (1): Solución Stock de 20 µM; (2) Formulaciones al 100 % de la NE sin o con ATRA y (3): Formulación ajustada a 1 mL en el estándar de trabajo; (*): Medio DMEM-F12 sin SFB; (NE_V): NE vacía; (NE_C): NE completa; (%w): Fórmula en % en peso.

Determinación de valores de la IC₅₀

El método WST es el método MTT (Microtetrazolium) modificado siendo el primero el utilizado en el trabajo ya que utiliza el 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio (WST-1,2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium), estas moléculas se reducen tanto dentro como fuera de la mitocondria debido a sus características fisicoquímicas, que permite su solubilidad en el medio de crecimiento. El segundo método se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) que tiene lugar dentro de las mitocondrias formando cristales de formazan 4 y es una sal menos soluble que el WST (López *et al.*, 2020).

Para evaluar la viabilidad celular de las líneas NL20 y A549, las cuales se sembraron a una densidad de 1 x 10⁴ células por pozo de una caja de 96 posiciones. Después de un período de incubación de 48 horas, se extrajo el medio de cada pocillo, se repone con medio nuevo libre de suero que contiene diferentes concentraciones por separado de cada placa. Dicho procedimiento se repite para cada estudio, los cuales se enumeran a continuación.

Determinación de valores de la IC₅₀ de ácido oleico. La solución de 10 mM de AO con alcohol y se realizaron diluciones obteniendo diferentes concentraciones μM .

Determinación de valores de la IC₅₀ de polisorbato 80. Se preparó una solución de 10 mM de PS₈₀ con agua y se obtuvieron las concentraciones μM

Determinación de valores de la IC₅₀ de la NEV. Las soluciones con las proporciones de PS₈₀ / AO fueron determinadas de acuerdo con la formulación. La concentración final de etanol no excedió el 0.01% del medio de cultivo. La placa se incubó durante 48 h y al final del tratamiento, el reactivo WST-1 se añadió directamente al medio, y después de 2 h, la generación del cromóforo por la reacción se determinó a 450 nm en un lector de placa ELx800 de *Bio Tek*® y finalmente, se determinó la IC₅₀.

Análisis estadístico

Todos los experimentos basados en células se repitieron al menos tres veces. Las diferencias estadísticamente significativas entre los datos se determinaron mediante el análisis de ANOVA utilizando el software *GraphPad Prism*® 5.0. $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo. Los valores se presentan como la media \pm SEM.

Capítulo IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio describen las interacciones entre variables aplicadas durante el diseño experimental, las cuales consisten en evaluar los efectos de los F_{int} y F_{EP} de las NE.

Todas estas variables de estudio permitieron retar a la formulación para obtener un sistema de transporte que tuviera un aceite nanoparticulado, el cual, debió ser estabilizado con una F_S , que permitió obtener un sistema estable en un medio externo formado por agua y que por su naturaleza polar sería termodinámicamente inestable. La metodología descrita permitió estudiar el efecto de los F_{IF} y F_{EP} que son los cambios y combinación de variables posibles para obtener NE estables, por lo que, en esta sección se describen los efectos de dichas variables de estudio, evaluando las características físicas, químicas y termodinámicas propias de estas NE que se muestran con tablas, gráficos y microfotografías.

Etapa 1. Diseño de las nanoemulsiones

Se utilizaron dos metodologías de preparación, las cuales se dividieron en: etapa 1, modificación de los F_{IF} utilizando tensoactivos aniónico y catiónico *in situ* y los factores extrínsecos en la etapa 2, controlando los F_{EP} , para que finalmente fueron evaluados por el tamaño de partícula y la estabilidad de las NE.

Factores intrínsecos de la formulación

Desarrollo de NST con tensoactivos sintetizadas *in situ*. El estudio preliminar y comparativo de las NST utilizando tensoactivos aniónicos y catiónicos sintetizados *in situ* permitieron obtener NST estequiométricamente balanceados. El tensoactivo aniónico *in situ* oleato de potasio se obtuvo al reaccionar el ácido oleico con hidróxido de potasio y el tensoactivo catiónico *in situ* cloruro de oleilamonio resulto de la reacción del oleil amina con ácido clorhídrico ambos en medio acuoso.

Los NST obtenidos con el oleato de potasio variaron en su apariencia desde geles semisólidos hasta soluciones opalescentes, pasando por muestras con apariencia similar a las nanoestructuras que tuvieron un tamaño de partícula de 33 nm y con potencial Z de -140 obtenidas con 0.39% de ácido oleico que corresponde al 40%, ver tabla 8 formulación 4. Estudios similares utilizaron 25% de AO, obtuvieron partículas de 339 nm con potencial Z de -110.6 similar, con solo disminuir el 15% del reactivo (Solè *et al.*, 2006), ver Tabla 8.

Comparativamente los NST obtenidos con cloruro de oleilamonio obtenido *in situ*, a partir de concentraciones de 100, 60, 40, 20 y 10% de oleil amina, mostraron variaciones en la apariencia desde oleogeles, geles hasta líquidos poco viscosos con apariencia turbia cuando se disminuía del precursor

pasando por la muestra 3 con el 40% de oleilamina la cual que presentó una apariencia homogénea con un potencial Z de +59.58, ver Tabla 9 (Maestro *et al.*, 2008).

Tabla 8. Obtención de NST con oleato de potasio *in situ* a partir de una reacción estequiométrica 1:1 de ácido oleico y agua.

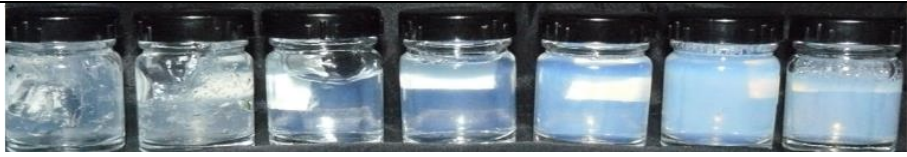

Formulación	1	2	3	4	5	6	7
Ácido oleico (%)	100	75	50	40	25	10	5
Ácido oleico (g)	4.48	3.58	2.39	1.91	1.19	0.48	0.24
Agua (g)	4.48	3.58	2.39	1.91	1.19	0.48	0.24
Oleato de potasio (g)	9.27	6.95	4.63	3.71	2.32	0.93	0.46
Apariencia							

Tabla 9. Obtención de NST con oleilamonio *in situ* a partir de una reacción estequiométricamente 1:2 de oleilamina, ácido clorhídrico y agua.

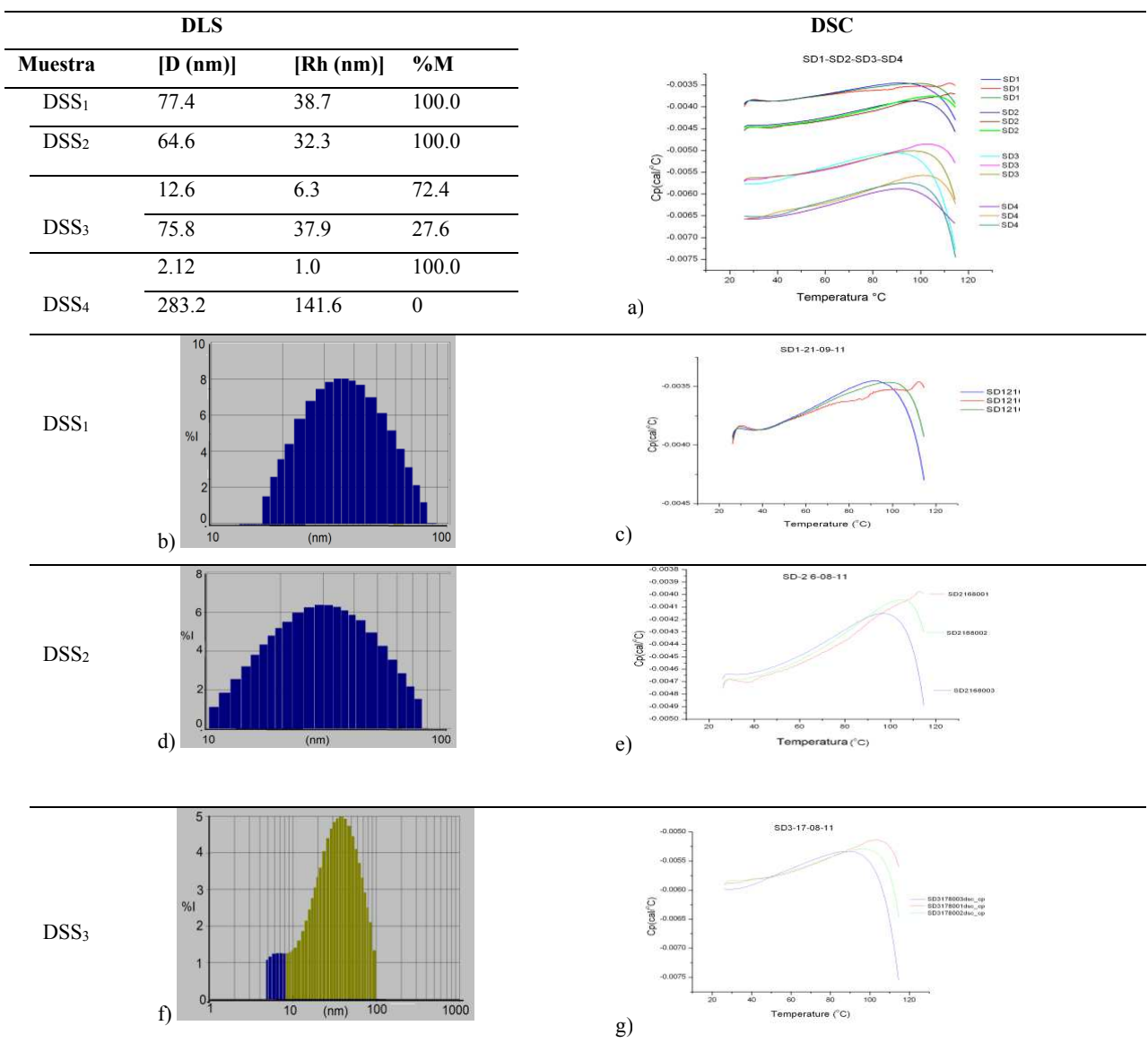
Muestra	1	2	3	4	5
Oleilamina (%)	100	60	40	20	10
Oleilamina (g)	3.92	2.35	1.57	0.78	0.39
Oleilamonio (g)	7.85	4.71	3.14	1.57	0.78
Agua (g)	7.85	4.71	3.14	1.57	0.78
Apariencia					

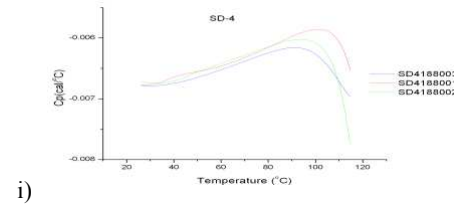
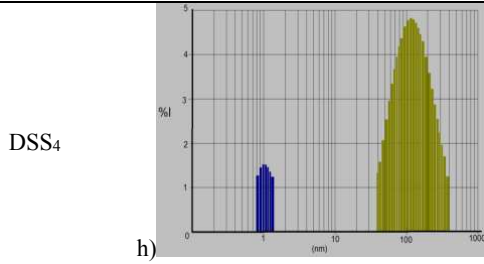
Estudio de adición de F_s externo. Los resultados del estudio comparativo de los sistemas obtenidos por adición externa de tensoactivo iónico y no iónico mediante el método 2_A (F_s en la F_w) probaron dos tipos de tensoactivos: el dodecil sulfato de sodio como tensoactivo iónico (tabla 10) y el PS_{80} como tensoactivo no iónico, obteniendo NST que fueron caracterizadas por DLS y DSC, ver tabla 11.

El tensoactivo iónico externo permitió estudiar el efecto de la naturaleza iónica del dodecil sulfato de sodio (DSS) como F_s a concentración fija de 5% evaluando el tamaño de partícula de los NST, los cuales fueron obtenidos con 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5% de AO y ajustado al 100 % con F_w , identificándose como: DSS_1 , DSS_2 , DSS_3 y DSS_4 , respectivamente. Las muestras de DSS_1 a la DSS_4 se les determinó el diámetro de partícula/radio hidrodinámico en nanómetros [(D/Rh)nm] y formación de sistemas monomodales o bimodales, estudiando las muestras diluidas para determinar 20 acumulaciones por DLS. Así como el comportamiento térmico empleando el *método DSC 3x3*.

Los resultados de las muestras DSS₄, DSS₃, DSS₂, y DSS₁ presentaron orden decreciente en el desplazamiento del evento térmico a la derecha y se muestran en la figura incluida en la tabla 10b,c,e y g. También se determinó que las muestras DSS₁ y DSS₂ fueron sistemas monodispersos, con tamaño de partícula de [(77.4/38.7)nm]_{DSS1} y [(64.6/32.3)nm]_{DSS2}, comparativamente con DSS₃ y DSS₄ que presentaron distribuciones de partículas de [(12.6/6.3:75.8/37.9)nm]_{DSS3} y [(2.0/1.0:283.2/141.6)nm]_{DSS4}. Las muestras DSS₁ y DSS₂ presentaron separación a los 3 meses de almacenamiento en tiempo real bajo condiciones controladas de luz y temperatura.

Tabla 10. Determinaciones de efecto en el tamaño de partícula y estabilidad de las formulaciones DSS1; DSS2; DSS3 y DSS4 utilizando DSC: a), c), e), g), i) y DLS b), d), f), h).





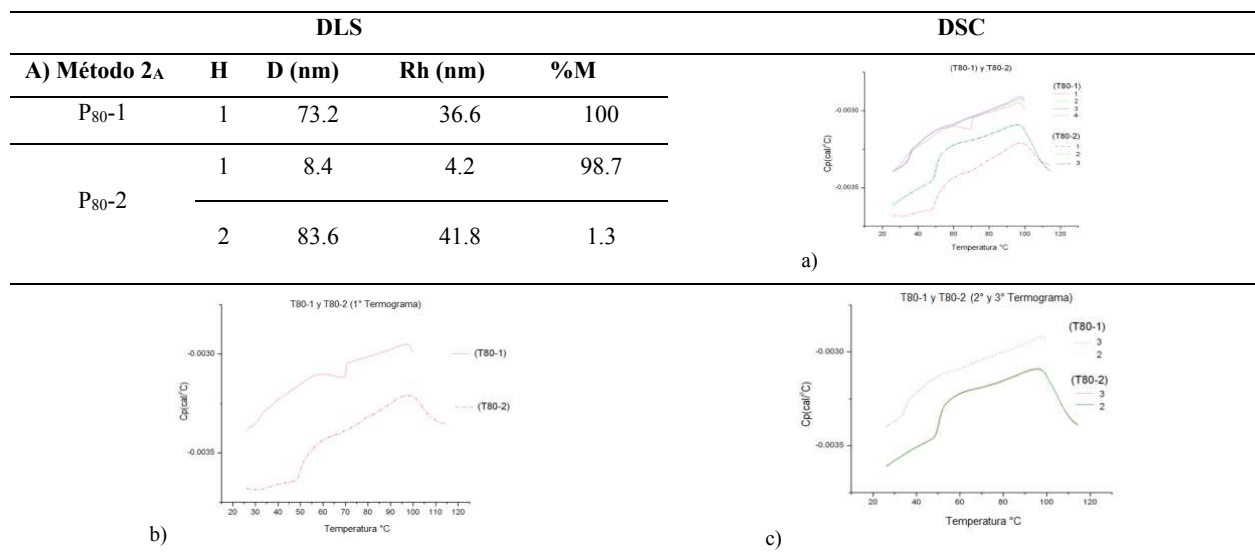
El tensoactivo no iónico PS₈₀ adicionado de manera externa se estudio a concentraciones de [5.0, 4.5, 3.5, 2.5, y 1.0]_{PS80} con una concentración fija de aceite [1%]_{FO} completándose al 100% con F_w. Además, se realizaron estudios preliminares de dos temperaturas de emulsión a 20 ± 2°C y 70 ± 2°C. En el primer inciso, se enlistan las muestras de la R1 a la R6 obtenidas a temperatura de emulsión de 20 ± 2°C (Tabla 11a) y en el segundo las muestras M1 a la M6 obtenidas a 70 ± 2°C (Tabla 11b). Comparativamente las muestras R1 y M1 presentaron la mayor transparencia y apariencia azul-rojiza, ambas tienen una proporción [F_O/F_S]=[1.0/5.0=0.2] y las muestras R4 a y M4 que tienen una proporción [F_O/F_S]=[1.0/2.5=0.4] con transparencia media y apariencia azul-rojiza presentaron un tamaño de partícula de 14.5 nm en la muestra R4 a 20 ± 2°C y 23.42 nm en la muestra M4 a 70 ± 2°C con potenciales Z de -10.4 y -13.6, respectivamente. Dichas proporciones de [F_O/F_S]=[0.2-0.4] de concentraciones de 1.0 a 2.5 % de F_O con 5% de F_S se tomaron como intervalo para los estudios posteriores.

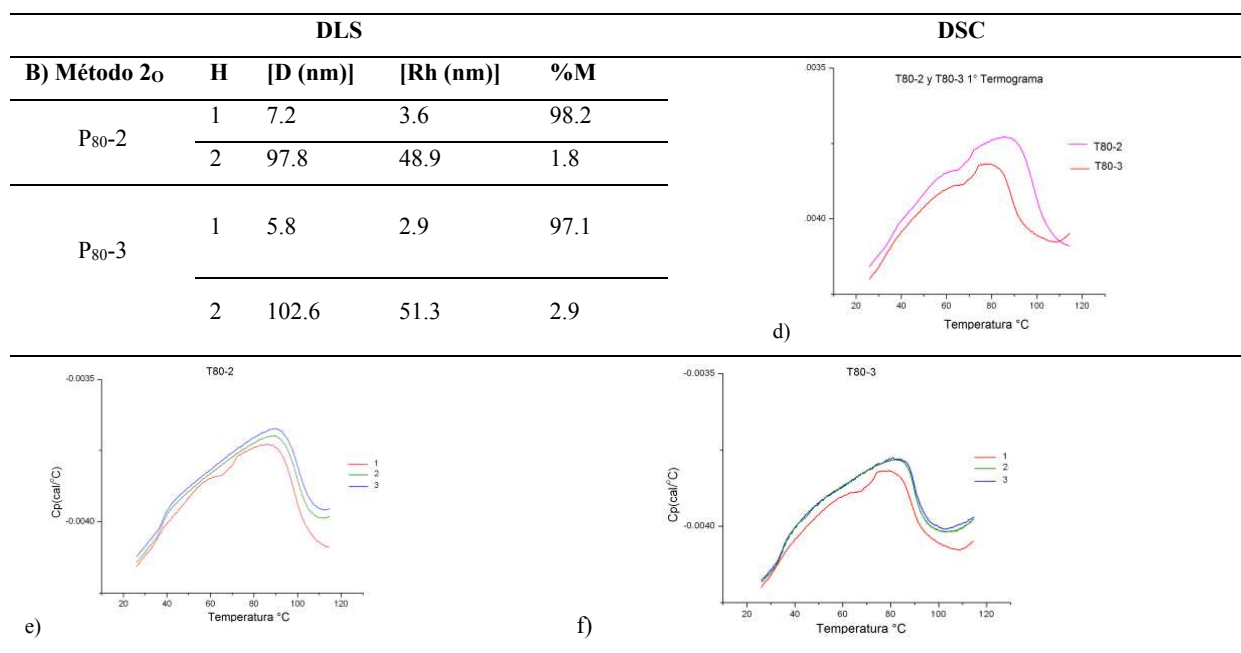
Tabla 11. Estudio de NST con relación F_O:F_S:F_w (AO/P₈₀/W) obtenidos con tensoactivo. a) no iónico a 20 ± 2°C y b) no iónico 70°C y observación con luz transmitida (LT) y refractada (LR).

a)	Formulación (%)	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆					
	Ácido oleico	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1,0					
	Polisorbato ₈₀	5.0	4.5	3.5	2.5	1.0	-					
	Agua	94.0	94.5	95.5	96.5	98.0	99.0					
LT:	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	LR: R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
b)	Formulación (%)	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆					
	Ácido oleico	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1,0					
	Polisorbato ₈₀	5.0	4.5	3.5	2.5	1.0	-					
	Agua	94.0	94.5	95.5	96.5	98.0	99.0					
LT:	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆	LR: M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	M ₆

Naturaleza química de la Fs: tensoactivo no iónico comercial en las NE. Los tensoactivos no iónicos comerciales utilizados son P₈₀₋₁, P₈₀₋₂ y P₈₀₋₃, obtuvieron sistemas nanoestructurados en proporción de [F_O/F_S]=[2.5/5.0=0.5] por el método 2_A y 2_O, ver tabla 12. Los tensoactivos P₈₀₋₁ y P₈₀₋₂ utilizaron el método 2_A para obtener las NE_{P80-1} y NE_{P80-2}, respectivamente, donde la primera resulto ser un sistema monomodal, con una relación [(D/Rh)nm] de [(73.2/36.6)nm]_{P80-1} y la segunda compuesta por dos poblaciones: [(8.4/4.2:83.6/41.8)nm]_{P80-2}, ambos tensoactivos con el 100 % en masa de la distribución (%M), ver Tabla 12a. El tensoactivo P₈₀₋₂ se comparo con el P₈₀₋₃ utilizando el método 2_O obteniendo la NE-P₈₀₋₂ que presentó dos poblaciones con partículas [(7.2/3.6:97.8/48.9)nm]_{P80-2}. Paralelamente, se desarrolló la NE-P₈₀₋₃ con el tercer tensoactivo (P₈₀₋₃) que obtuvo comportamiento bimodal con tamaños de partícula de [(5.8/2.9:102.6/51.3)nm]_{P80-3} con el 100 % en masa de la distribución (%M) de cada uno de ellos, mostrándose en la Tabla 12d. Así mismo los resultados del DSC presentan un gráfico de cada muestra obtenida por el *método DSC 3x3*. El primer ciclo T₁ de la muestra NE-P₈₀₋₁ presenta un pico a 70°C que representa un evento, el cual no se observa en el ciclo T₁ de la muestra NE-P₈₀₋₂ (tabla 12b), no así en los calentamientos T₂ y T₃ que tienen una restructuración similar entre sí cuando utilizan el método 2_A (tabla 12c). Las muestras NE-P₈₀₋₂ y NE-P₈₀₋₃ en el ciclo T₁ presentan un similar comportamiento térmico y los calentamientos T₂ (tabla 12e) y T₃ (tabla 12f) interpretándose que tienen una restructuración similar al utilizar el método 2_O. Sin embargo, al comparar las dos muestras de NE-P₈₀₋₂ obtenidas por el método 2_A y por método 2_O se pudo observar diferentes comportamientos térmicos y restructuración del sistema en los calentamientos T₁, T₂ y T₃, tal como se observa en la Tabla 12.

Tabla 12. Análisis comparativo de los tamaños de partícula de las muestras obtenidas por: A) el método 2_A, PS₈₀₋₁ y PS₈₀₋₂ y B) el método 2_O, PS₈₀₋₂ y PS₈₀₋₃ utilizando DLS y DSC.



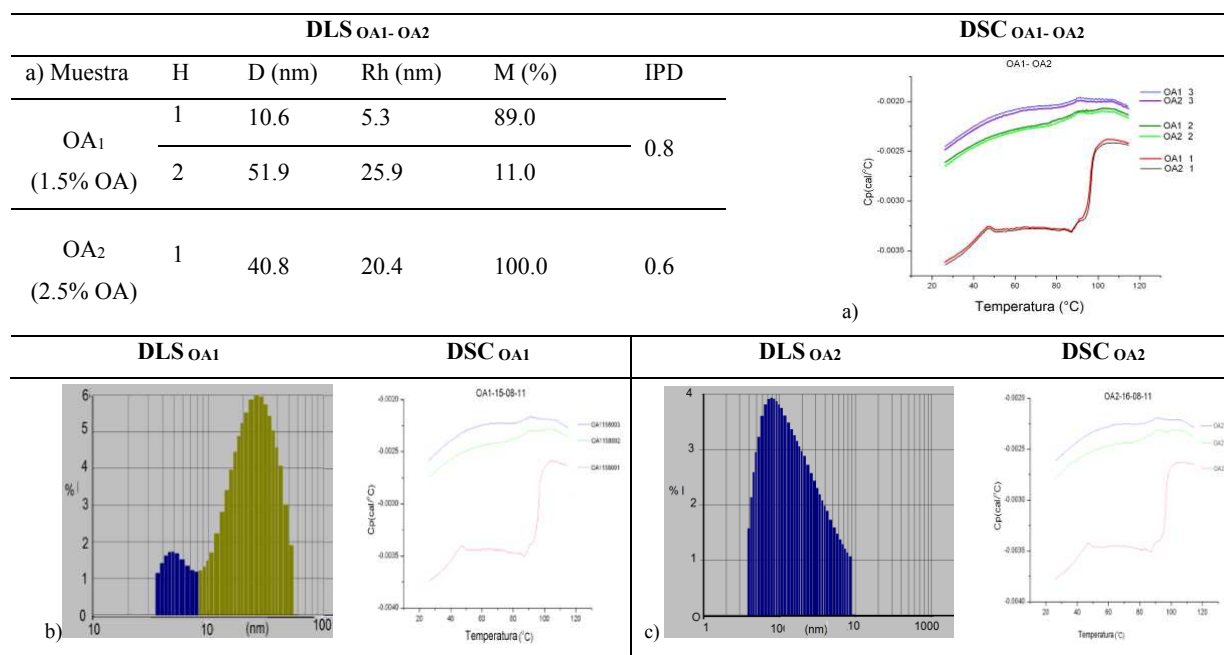


Concentración de FO. La interacción de la estructura química entre FO y FS se estudió en las NE obtenidas por el método 2A con dos tipos de FO, el ácido oleico (AO) y alcohol oleico (OA) a concentraciones de 1.5, 2.0 y 2.5 %, como FS, PS₈₀ con 5% fijo y con FW para completar al 100%.

Las NE que se clasificaron por el tipo de FO: a) alcohol oleico a dos concentraciones: OA₁, al 1.5% y OA₂, al 2.5% con una proporción de F_O:F_S:F_W [1.5:5.0:93.5] y [2.5:5.0:92.5], respectivamente y b) ácido oleico, AO₂ al 2.5% con una proporción de [2.5:5.0:92.5] obtenidas por el método 2A. Comparativamente, el resultado de la NE al 1.5% de OA₁ presentó un sistema bimodal de tamaño de partículas de (D/Rh)nm: [(10.6/5.3:51.8/25.9)nm] comparada con las NE al 2.5% de OA₂, que además fue monodispersa con partículas menores (40.8/20.4)nm (Tabla 13b y 13c). El valor log P de 7.73 de AO es ligeramente más lipófilo que 7.5 del OA obteniendo tamaño de gotas menores cuando se añadió PS₈₀ (Maibaum *et al.*, 2004).

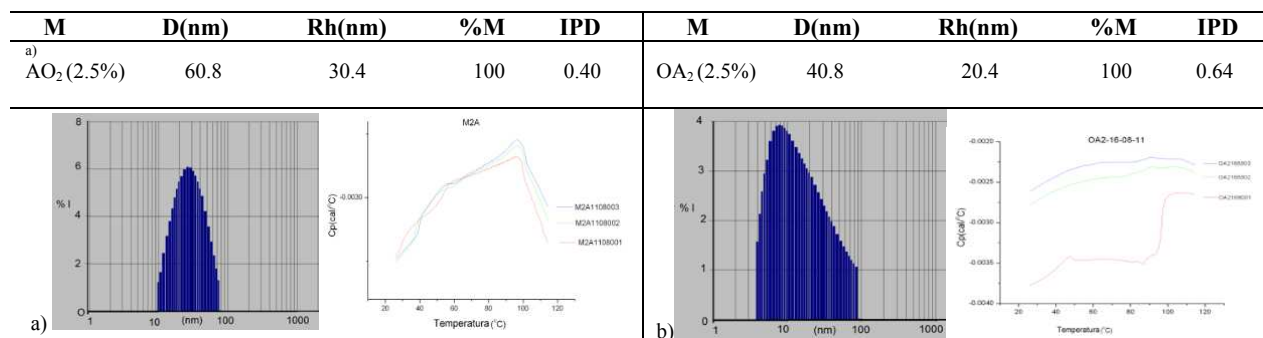
Las muestras OA₁ y OA₂ tienen un comportamiento térmico analizado por el método DSC 3x3, el cual consiste en la obtención de 3 termogramas resultado de tres ciclos de calentamiento de 20 a 120 °C: T₁, T₂, T₃ de cada muestra, ver en la tabla 13. Donde los T₁ de OA₁ y OA₂ presentan comportamiento térmico similar (Tabla 13a). Y los calentamientos T₂ y T₃ tienen una restructuración parecida con el desplazamiento del evento térmico a la derecha y requiere de mayor temperatura para que se lleve a cabo (Tabla 13b y 13c) y con ello mayor estabilización del sistema, similar a lo que ocurre con la estabilidad o maduración en el tiempo de almacenamiento.

Tabla 13. Comparación de los resultados del tamaño de partícula utilizando DLS y comportamiento térmico por DSC en las muestras OA1 y OA2 en concentraciones 1.5 y 2.5 % de FO, respectivamente.



Las NE obtenidas con AO₂ y OA₂ tienen la misma concentración de 2.5% de FO, sin embargo, la NE_{AO₂}, aunque también es monomodal como NE_{OA₂}. Comparativamente, la NE con alcohol oleico presentó un [D(nm)/IPD] de [40.8(nm)/0.64], a diferencia de la NE con ácido oleico que tiene partículas ligeramente mayores [60.8 (nm)/0.4] menor IPD y presentó mayor homogeneidad, tal como se observa en la tabla 14. Los resultados de los 3 termogramas que representan los tres ciclos de calentamiento de 0 a 120 °C: T₁-T₂-T₃ de las muestras AO₂ y OA₂ (Tabla 14b). OA₂ se diferenció en el calentamiento T₁ respecto al comportamiento similar de los termogramas T₂ y T₃ y se observó que T₂ se reestructuró de la misma manera que T₃ (tabla 14b). La muestra AO₂ presentó un similar comportamiento térmico entre T₂ y T₃, lo que permitió una estabilización similar del sistema, ver tabla 14a.

Tabla 14. Comparación de los resultados del tamaño de partícula utilizando DLS y comportamiento térmico por DSC en las muestras con ácido oleico al 2.5 % y alcohol oleico 2.5%.



Desarrollo de formulaciones con concentraciones variables de F_O y fijas de F_S . En las experimentaciones realizadas en el presente estudio se seleccionó el ácido oleico como F_O de 1.5, 2.0 y 2.5% y polisorbato 80 como F_S a 5.0%. La estructura química del AO como F_I proporcionó las características de hidrosolubilidad o liposolubilidad con la F_E y su grado de hidroafinidad o lipoafinidad que le permitió clasificarse por su coeficiente de partición ($\log P$), HLB y CMC. Esto para cada uno de los componentes que son dependientes de la concentración y que permiten su estabilidad en la NE.

Las propiedades fisicoquímicas en estudio como: el HLB, el $\log P$ y la CMC permitieron diseñar sistemas nanoestructurados que se estabilizaron en NE O/W . Cuando se utilizan tensoactivos no iónicos y obtienen un HLBr entre 8 y 18 se favorece la hidrofiliidad para conseguir el sistema O/W (Bullon *et al.*, 2007 y Mao *et al.*, 2009) determinado por la afinidad de la F_S por la F_E acuosa (Simoes *et al.*, 2005), por lo que, cuando se tiene una F_O con HLB_{AO} de 1 y F_S con HLB_{PS80} de 15, el HLBr dependió de las concentraciones de 1.5, 2.0 y 2.5% de la F_O y 5% fijo del F_S obteniendo un HLB de 11.8, 11.0 y 10.3 respectivamente, obteniendo una alta hidrofiliidad en las formulaciones por tener un HLBr entre 8 y 18. El $\log P_{AO}$ es 7.7 y el $\log P_{PS80}$ es 4.69, lo que indica que el AO al ser relativamente más lipófilo se estructuró en la FI. Mientras que PS_{80} al ser más hidrofílico se estructuró en la interfaz aceite-agua. Comparativamente, la CMC_{AO} es 0.006 mM y la CMC_{PS80} es 0.012 mM, lo que indica que el AO tiende a formar micelas a la mitad de la concentración que las forma el PS_{80} (Amani *et al.*, 2011). Por lo que el AO puede formar partículas primero en presencia de agua, convirtiéndose en el núcleo de la NE (Menard *et al.*, 2011).

El PS_{80} es la F_S del sistema nanoestructurado que está en concentración fija del 5% y que por su similitud estructural con el AO proporciona estabilidad y compatibilidad al sistema. La concentración de 5% obtenida en estudios previos (ver tablas 11 y 12), ha demostrado ser eficaz para que el sistema sea estable y proporcione mayor seguridad que cuando se utilizan en sistemas con mayores cantidades que pueden ser tóxicas (How *et al.*, 2013). Las formulaciones con alta concentración de tensoactivo no iónico mayores a su CMC, pueden asegurar una reserva de micelas de la F_S en la FE, favoreciendo la formación de formas liotróficas que aumenten la estabilidad termodinámica del sistema, debido al equilibrio dinámico que proporciona las fracciones de F_S cuando sea necesario (Mason *et al.*, 2007), sin embargo, dicha concentración no debe ser tan elevada para favorecer microemulsiones o para provocar un efecto tóxico que aumente la fluidez en la bicapa lipídica por modificar la polaridad de la membrana celular (Rege *et al.*, 2002).

La estructura química y el peso molecular del tensoactivo polimérico son factores importantes que se deben tener en cuenta al determinar una relación molar de $F_S:F_O$, de modo que la cantidad de tensoactivo requerido se determina experimentalmente para cubrir las partículas de las gotas de F_O recién formadas en una manera efectiva. Aunado a ello, la estructura química de los componentes también afecta la solubilidad del agente tensoactivo en la fase del sistema en relación con la solubilidad requerida para

formar micelas o la CMC. Las soluciones acuosas de PS₈₀ se prepararon usando un umbral de CMC (0.0015 g·mL⁻¹), con concentraciones que aumentaban de 0.01 a 0.07 g·mL⁻¹, que corresponden a 6.67·CMC_{PS80} a 46.67·CMC_{PS80}, respectivamente. Debido a que el tamaño de partícula disminuye proporcionalmente desde 8.8 nm a medida que la concentración aumenta de 0.01 a 0.06 g·mL⁻¹, sin embargo, no disminuye más desde 0.06 y hasta 0.07 g·mL⁻¹ y el tamaño de partícula se estabilizó uniformemente alcanzando 8.3-8.8 nm (resultados preliminares no mostrados). De modo que se formaron aglomerados micelares más pequeños a expensas de la presencia de un gran número de partículas en el sistema, como se ha visto en hallazgos relacionados (Menard *et al.*, 2011). Estudios similares con 0.002 g·mL⁻¹ de PS₈₀ (1.33·CMC_{PS80}) presentaron conjuntos de 15.0 nm, con 0.005 g·mL⁻¹ PS₈₀ (3.33·CMC_{PS80}) presentaron y conjuntos de 10.1 nm (Li *et al.*, 2013) y con 0.012 g·mL⁻¹ PS₈₀ (8·CMC_{PS80}) los conjuntos formados fueron de 10.0 nm (Liang *et al.*, 2011). Estas tendencias indican que, a estos intervalos, al igual que los utilizados en este estudio, hay equilibrios que generan un mayor número de partículas en el sistema a concentraciones más altas, lo que necesariamente reduce el tamaño del conjunto, como se determinó en el presente trabajo.

El diseño experimental se basó en la versión mínima del método multifactorial de Box y Hunter (Méndez *et al.*, 1990). La proporción de F_S se mantuvo constante al 5% principalmente por tres consideraciones, menor toxicidad que otros tensoactivos PS₈₀ (How *et al.*, 2013), proporciones que fueron empleadas por otros autores cuando PS₈₀ se utilizó como F_S para obtener NE_{O/W} (Leong *et al.*, 2009; Li, *et al.*, 2013; Ghosh *et al.*, 2013; Peshkovsky *et al.*, 2013; Sugumar *et al.*, 2014) y para simplificar el procedimiento experimental, teniendo en cuenta que la variable debería ser la concentración de AO.

Se realizó un análisis bibliográfico comparativo para observar las proporciones de F_O:F_S empleadas para obtener NE_{O/W} cuando se usó PS₈₀ como F_S en la formulación.

- Caso 1: La NE_{O/W} obtenida con aceite de albahaca (F_O) y PS₈₀ (F_S) en una relación F_O:F_S [1:4]_{v/v} con una proporción de [0.25], obtieron tamaño de partículas de 29.3 nm (Ghosh *et al.*, 2013).
- Caso 2: El uso de D-limoneno (F_O) y PS₈₀ (F_S) en una relación F_O:F_S [1.0:1.5] con una proporción de [0.66], al 4% (p/p) de F_S y la homogeneización mecánica a alta presión a 1,300 rpm durante 6 h, generó W/O → O/W 40.1-107.8, con una duración de 12 días a 28 °C (Li *et al.*, 2013).
- Caso 3: se produjeron ultrasónicamente NE de 150 nm usando 15% (p/p) de aceite de girasol (F_O) y 9.7% de mezcla de 5.3% de PS₈₀ y 4.4% de Span 80 (S₈₀), de una proporción de F_O:F_S [1.0:1.5] con una proporción de [0.66] (Leong *et al.*, 2009).
- Caso 4: se obtuvieron NE de 75 a 85 nm con una relación de F_O:F_S [1.0:1.0] con una proporción de [1.0], con 10% de aceite de soja (F_O) y una mezcla 10% (p/p) de 8% PS₈₀ y 2% de S₈₀, teniendo en cuenta HLB y factores de sonicación para diferentes tamaños (Peshkovsky *et al.*, 2013).

- Caso 5: se desarrollaron NE de 3.8 nm utilizando una relación de $F_O:F_S$ [1.0:1.0] con una proporción de [1.0] utilizando 16.7% (p/p) de aceite de eucalipto (F_O) y un 16.7% de PS_{80} (F_S), estable durante 3 meses (Sugumar *et al.*, 2014). Por lo tanto, manteniendo F_S en los valores *ca.* 5% debería ser suficiente para cubrir las gotas de aceite, y en esta línea el sistema podría simplificarse a una sola variable de F_O usando solo tres variaciones porcentuales, en la cantidad mayor de F_O de 2.5% (p/p) en una relación $F_O:F_S$ [2.5:5.0] con una proporción de [0.5], la cantidad media de 2.0% de F_O en una relación de $F_O:F_S$ [2.0:5.0] con una proporción de [0.4] y la cantidad baja de F_O de 1.5%, en relación de $F_O:F_S$ [1.5:5.0] con una proporción de [0.3]. Dicho diseño permitió encontrar pequeños tamaños de partículas en los sistemas como se observará a continuación, también se consideró una proporción relativamente alta de F_S para ampliar el periodo de estabilidad.

Etapa 2. Desarrollo y Caracterización de las nanoemulsiones

Factores extrínsecos del proceso (F_{EP})

Los F_{EP} involucrados durante la fabricación de un sistema nanoparticulizado, se estudian evaluando los efectos que provocan las siguientes variaciones: 1) Tiempo y tipo de agitación: mecánica y ultrasónica; 2) Orden de adición de los componentes de la formulación en las fases; 3) Metodología de premezclado-sonicación-reposo: PSR; 4) Temperatura de emulsión y la velocidad de enfriamiento; 5) Tiempo de maduración con el tamaño de partícula y 6) Grado de solubilidad de la F_S en la F_O o F_W . Todos los resultados de la combinación y variación de los puntos mencionados se evalúan comparando el tamaño de partícula y la estabilidad de las NE obtenidas, los cuales se resumen en la Tabla 15.

Tabla 15. Análisis comparativo de las condiciones de estudio para obtener $NE_{O/W}$ y sus efectos sobre el tamaño de partícula D [nm] y polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD). Los sistemas M_1 , PS_2 y PSR_{3-5} tienen una distribución multimodal.

Método	Adición de F_S	T / ΔT [°C]	[O]:[S]	Tamaño de partícula						
				t_0	D (nm) [% PD/IPD]	t_1	D (nm) [% PD/IPD]	t_{12}	D (nm) [% PD/IPD]	
a)	F_W (2 λ)	15 ± 2	1.5:5.0		194.6/21.8 [15.5/33.8]		120.0 [29]		---	
				M_{1b}		220/21.2 [18.8/40.5]		113.6 [28.4]		---
				M_{1c}		200/20.0 [17.2/40.1]		103.2 [25.8]		---

	PS _{2a}			1.5:5.0	74.6/10.1 [15.8/39.9]	53.4 [26.7]	52.2 [0.2]
b)	PS _{2b}	F _w (2 _A)	20 ± 2	2.0:5.0	90/9.7 [20/53.5]	76.2 [38.1]	42.0 [0.31]
	PS _{2c}			2.5:5.0	73.2/9.2 [13.6/29.4]	63.6 [31.8]	95.0 [0.29]
	PSR ₃	F _O (2 _O)	20 ± 2	2.5:5.0	60.3 [0.64]	---	63.0 [0.27]
c)	PSR _{4a}	F _w (3 _A)	70 a 25 lento	2.5:5.0	124.0 [0.29]	---	88.7 [0.76]
	PSR _{4b}		70 a 25 rápido	2.5:5.0	138.8 [0.71]	---	88.8 [0.50]
	PSR _{5a}	F _O (3 _O)	70 a 25 lento	2.5:5.0	119.0 [0.26]	---	104.6 [0.89]
	PSR _{5b}		70 a 25 rápido		119.7 [0.31]	---	86.4 [0.49]
	d)	PSR _{6a}	O:W _{50%}	15 ± 2	2.0:5.0	529.0 [0.68]	13.41 [0.43]
PSR _{6b}		O:W _{100%}	15 ± 2	1.5:5.0	528.0 [0.83]	11.86 [0.37]	4554 [0.19]
PSR _{6c}		O:W _{100%}	15 ± 2	2.0:5.0	61.37 [0.51]	---	---
PSR _{6d}		O:W _{100%}	15 ± 2	2.5:5.0	140.2 [0.59]	15.82 [0.44]	---
PSR _{Final}		O:W _{100%}	15 ± 2	2.0:5.0	71.86 [0.42]	---	---

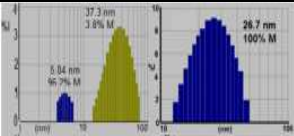
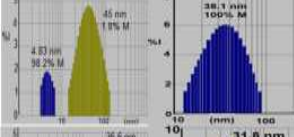
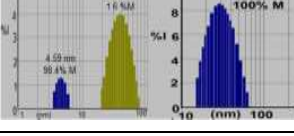
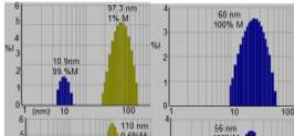
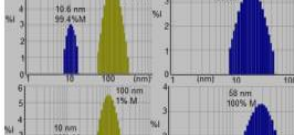
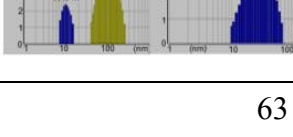
Para los sistemas obtenidos por los métodos M₁, PS₂, PSR₃₋₆ y PSR_{Final}, los tamaños de partícula se determinaron al comienzo, t₀, después de un mes, t₁, o después de doce meses, t₁₂, de almacenamiento a temperatura ambiente en ausencia de luz. Las mediciones de tamaño de partícula en los métodos M₁ y PS₂ se determinaron en DynaPro99 y para PSR₃₋₆ en instrumentos Zetasizer NanoDS.

Tiempo y tipo de agitación: mecánica y ultrasónica. El tiempo y tipo de agitación mecánica con energía de baja, o alta cizalla y cavitación se basa en la premisa de que la entropía del mezclado puede conducir a un potencial químico que inicialmente se opone a la maduración de *Ostwald* (Tadros *et al.*, 2004), aunado a la incorporación de aceite con las micelas del tensoactivo no iónico en la fase acuosa continua, generando partículas, que están formadas por pequeñas gotas de [F_O-F_S] y [F_O] de diferentes tamaños, así como micelas del tensoactivo como único componente [F_S] y que carecen de F_O en el núcleo. Dicha mezcla de partículas y micelas del tensoactivo en el sistema son finalmente las que generan una estabilización especial, porque se ha determinado experimentalmente que el transporte de aceite desde las partículas y NE es casi cero o incluso cero (debido al potencial químico), para finalmente obtener partículas de un tamaño promedio en el que todos los conjuntos contengan aceite (Arregui de la Cruz *et al.*, 2017; BINKS *et al.*, 1999). Debido a que la energía libre total requerida para crear NE es positiva, se

debe aplicar una energía externa alta porque el proceso no es espontáneo, permitiendo que el F_S reduzca la energía requerida al reducir la tensión superficial en la interfaz aceite-agua (Tadros *et al.*, 2004).

Las formulaciones m_1 , m_2 y m_3 inicialmente fueron obtenidas por el método 1, premezclado manual (TAm) (TAM) y el método 2, premezclado mecánico (TAM) y con 15 minutos de sonicación a 15°C. Ambos métodos utilizan las mismas concentraciones fijas de tensoactivo no iónico PS₈₀, variando el ácido oleico a 1.5, 2.0 y 2.5% con la relación $F_O:F_S:F_W$ de [1.5:5.0:93.5]; [2.0:5.0:93.0] y [2.5:5.0:92.5] respectivamente, completándose con agua al 100%. Finalmente, las NE obtenidas por el método 1 TAM-TAM se les determinó los diámetros de tamaño de partícula $[D(\text{nm})_1:D(\text{nm})_2]$ de las muestras m_1 , m_2 y m_3 se determinó por DLS el diámetro de las partículas inicial (t_0) son $[10(\text{nm})_1:74.6(\text{nm})_2]_{m1}$; $[9.6(\text{nm})_1:90.0(\text{nm})_2]_{m2}$ y $[9.2(\text{nm})_1:73.2(\text{nm})_2]_{m3}$ y a 1 mes de almacenamiento (t_1) $[53.4(\text{nm})]_{m1}$; $[76.2(\text{nm})]_{m2}$ y $[63.3(\text{nm})]_{m3}$; y las muestras M_1 , M_2 y M_3 obtenidas por TAM se determinó por DLS el diámetro de las partículas inicial (t_0) son $[21.8(\text{nm})_1:194.6(\text{nm})_2]_{M1}$; $[21.2(\text{nm})_1:220.0(\text{nm})_2]_{M2}$ y $[20.0(\text{nm})_1:200.0(\text{nm})_2]_{M3}$ y a 1 mes de almacenamiento (t_1) $[120.0(\text{nm})]_{M1}$; $[112.0(\text{nm})]_{M2}$ y $[118.0(\text{nm})]_{M3}$, Tabla 16.

Tabla 16. Caracterización de las muestras 1, 2 y 3 obtenidas por: a) método Tam-TAM y b) método TAM por determinación de tamaño de partícula en tiempo inicial y 30 días por DLS.

a)TAM- TAM	H	[D (nm) / [Rh (nm)]		% Masa		DLS [Rh (nm)]	
		(T ₀)	(T ₃₀)	(T ₀)	(T ₃₀)	(T ₀)	(T ₃₀)
m_1	1	10.0 / 5.0	53.4 / 26.7	3.8	100		
	2	74.6 / 37.3		96.2			
m_2	1	9.6 / 4.8	76.2 / 38.1	1.8	100		
	2	90.0 / 45.0		98.2			
m_3	1	9.2 / 4.6	63.6 / 31.8	1.6	100		
	2	73.2 / 36.6		98.4			
b) TAM	H	[D (nm) / [Rh (nm)]		% Masa		DLS [Rh (nm)]	
		(T ₀)	(T ₃₀)	(T ₀)	(T ₃₀)	(T ₀)	(T ₃₀)
M_1	1	21.8 / 10.9	120 / 60	1.0	100		
	2	194.6 / 97.3		99.0			
M_2	1	21.2 / 10.6	112 / 56	0.6	100		
	2	220.0 / 110.0		99.4			
M_3	1	20.0 / 10.0	118 / 58	1.0	100		
	2	200.0 / 100		99.0			

Las muestras m_1 , m_2 y m_3 , obtenidas por TAM-TAM y las muestras M_1 , M_2 y M_3 , por TAM son inicialmente sistemas bimodales y pasan a monomodales después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, con una tamaño de partícula de (D/Rh)nm de [(53.4/26.7)nm] $_{m1}$; [(76.2 /38.1)nm] $_{m2}$ y [(63.6/31.8)nm] $_{m3}$. Para las muestras con método TAM presentaron [(120/60)nm] $_{M1}$ [(112/56)nm] $_{M2}$ y [(118/58)nm] $_{M3}$, donde estas últimas son partículas más grandes a diferencia de las primeras que se separaron a los 6 meses. Aunque ambos permanecieron con partículas dentro del límite de 100 nm máximo de diámetro de tamaño de partícula. El comportamiento térmico de las muestras M_1 , M_2 y M_3 se observan en los termogramas a T_0 y T_{30} días que se muestran en la figura 5. Donde el comportamiento térmico a tiempo inicial (T_0) es diferente después de un mes de almacenamiento (T_{30}) con un desplazamiento del evento térmico a la derecha, que indica, que se requiere de mayor temperatura para que se lleve a cabo la degradación y con ello mayor estabilidad.

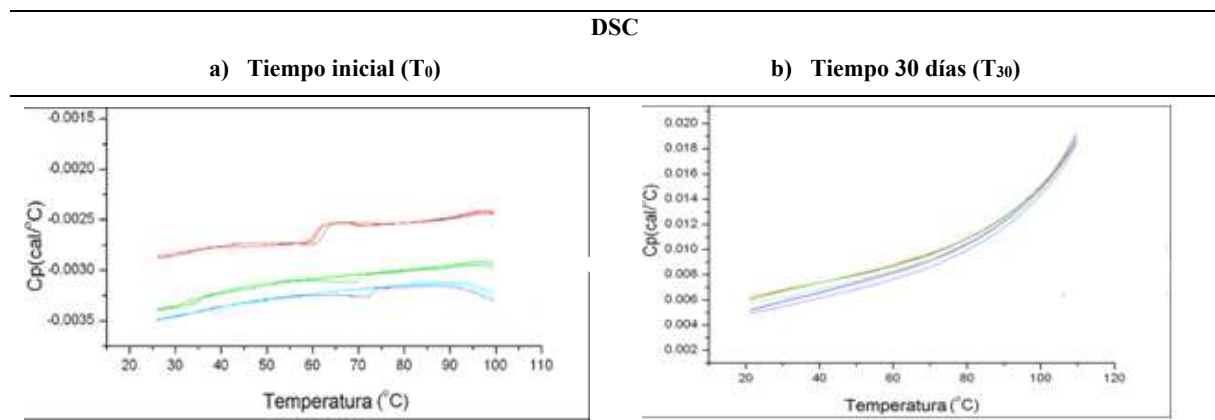


Figura 5. Caracterización por el comportamiento térmico de las muestras M_1 , M_2 y M_3 obtenidas por el método 1, a tiempo: a) inicial y b) después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente utilizando DSC.

Las NE utilizaron el método 2_A que consiste en la combinación de premezclado mecánico (TAM) y posterior mezclado por sonicación (TAU) o sea el método {TAM:TAU} y variando el tiempo: a) método M_1 , {TAM:TAU} por 5 min a 20°C = {TAM:TAU} $_{M1}$ y b) el método PS_2 , {TAM:TAU} durante 15 min a 20°C = {TAM:TAU} $_{PS2}$ que mediante análisis visual se observó la separación macroscópica en algunos de ellos. Posteriormente se realizaron modificaciones de los métodos de M_1 y PS_2 los cuales se mostraron en los métodos PSR_{3-5} , hasta obtener el método PSR_6 para lograr la estabilidad y la disminución del tamaño de partícula necesarias.

La caracterización por el tamaño de partícula se utilizaron técnicas ópticas para determinar indirectamente la refracción de la luz de estas partículas con DLS (Ashizawa 2019) y se almacenaron a temperatura ambiente en ausencia de luz que simulaban el envejecimiento a condiciones normales. Los tamaños de partícula para sistemas obtenidos usando los métodos M_1 y PS_2 se determinaron al principio, t_0 , y al final

del período de almacenamiento inicial de 1 mes, t_1 . Los tamaños de partícula de los sistemas mediante los métodos PSR₃₋₆, se determinaron al principio (inicial), t_0 , y después de doce meses, t_{12} , debido principalmente a la mejora de la estabilidad.

Los métodos M_1 , M_2 y M_3 se obtuvieron con TAM y TAU durante 15 min a 15°C obteniendo diámetros hidrodinámicos de la partícula en sistema bimodal $\{D(\text{nm})/[\%PD/IPD]_1; [D(\text{nm})/[\%PD/IPD]_2]\}$ de dichas muestras a t_0 fueron $\{194.6(\text{nm})/[15.5]_1; 21.8(\text{nm})/[33.8]_2\}_{M1a}$; $\{220.0(\text{nm})/[18.8]_1; 21.2(\text{nm})/[40.5]_2\}_{M1b}$ y $\{200.0(\text{nm})/[17.2]_1; 20.0(\text{nm})/[40.1]_2\}_{M1c}$. La estabilización del sistema monomodal ocurrió después de un mes de almacenamiento: t_1 $\{120.0(\text{nm})/[29]\}_{M1}$; $\{113.6(\text{nm})/[28.4]\}_{M2}$ y $\{103.2(\text{nm})/[25.8]\}_{M3}$, presentando mayores tamaños de partícula que las muestras producidas usando el método PS_{2a-c}, que usó premezclado mecánico por 30 min y seguido por homogeneización ultrasónica durante 15 min a 20°C, ver tabla 17a. Dicha metodología PS_{2a-c} obtuvo sistemas bimodales a t_0 $\{74.6(\text{nm})/[15.8]_1; 10.1(\text{nm})/[39.9]_2\}_{PS2a}$; $\{90.0(\text{nm})/[20]_1; 9.7(\text{nm})/[53.5]_2\}_{PS2b}$; $\{73.2(\text{nm})/[13.6]_1; 9.2(\text{nm})/[29.4]_2\}_{PS2c}$ y después de un mes de almacenamiento se estabilizaron a sistemas monomodales a t_1 $\{53.4(\text{nm})/[27.7]\}_{PS2a}$; $\{76.2(\text{nm})/[38.1]\}_{PS2b}$ y $\{63.6(\text{nm})/[31.8]\}_{PS2c}$ y a doce meses: t_{12} $\{52.2(\text{nm})/[0.2]\}_{PS2a}$; $\{42.0(\text{nm})/[0.31]\}_{PS2b}$ y $\{95.0(\text{nm})/[0.29]\}_{PS2c}$, ver tabla 17b. Un efecto similar fue obtenido por Tang y colaboradores, quienes determinaron un efecto del tamaño de partícula y la reducción de IPD en NE con 30 minutos de premezclado (Tang *et al.*, 2013).

Las NE_{O/W} obtenidas en la primera formulación: M_{1a-c} , (TAM)_{M1} y la segunda formulación: método PS₂, $\{TAM:TAU\}_{PS2}$, se diferencian en la temperatura de emulsificación de $15 \pm 2^\circ\text{C}$ y $20 \pm 2^\circ\text{C}$, (t_0) respectivamente, la diferencia pequeña de 5°C en la temperatura de emulsión entre los métodos favorece la reducción del tamaño de partícula en poblaciones bimodales (Tabla 17). Posteriormente, en las muestras obtenidas por el método M_1 , se observó una separación física después de 12 meses de almacenamiento, con un aumento en el tamaño de partícula en la NE y, por lo tanto, fue descartado. El análisis DLS ha demostrado que las muestras presentaron inicialmente un comportamiento bimodal y que después de 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, ambos sistemas se reestructuraron para ser monomodales y con IPD menor, sin embargo, el método PS₂ obtuvo sistemas mas estables, ver Tabla 17. La prueba inductiva de la estabilidad de un sistema nanoestructurado es la ultracentrifugación, por lo cual, la diferencia en turbidez quedó en evidencia con los resultados de centrifugación a 10,000 rpm por 30 min. Existe una relación directa entre el aumento de temperatura y la ruptura de la fase oleosa, favoreciendo la formación de gotas más pequeñas a escala nanométrica, más transparentes y de mayor estabilidad, que resisten la ultracentrifugación (Shafiq *et al.*, 2007^b).

Tabla 17. Comparación de las condiciones de estudio para obtener NE_{O/W} y sus efectos sobre el tamaño de partícula (D [nm]) y polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD). Los sistemas M₁, PS₂ y PSR₃₋₅ todos tienen una distribución multimodal.

Método	Adición de F _S	T °C	[F _O]:[F _S]	Tamaño de partícula							
				t ₀	D (nm) [% PD/IPD]	t ₁	D (nm) [% PD/IPD]	t ₁₂	D (nm) [% PD/IPD]		
a)	M _{1a}	15 ± 2	1.5:5.0		194.6/21.8 [15.5/33.8]		120.0 [29]		---	---	
	M _{1b}			F _W (2 _A)		220.0/21.2 [18.8/40.5]		113.6 [28.4]		---	---
	M _{1c}					200.0/20.0 [17.2/40.1]		103.2 [25.8]		---	---
b)	PS _{2a}	20 ± 2	2.0:5.0		74.6/10.1 [15.8/39.9]		53.4 [26.7]		52.2 [0.2]		
	PS _{2b}			F _W (2 _A)		90.0/9.7 [20/53.5]		76.2 [38.1]		42.0 [0.31]	
	PS _{2c}					73.2/9.2 [13.6/29.4]		63.6 [31.8]		95.0 [0.29]	

Para los sistemas obtenidos por los métodos M₁, y PS₂, los tamaños de partícula se determinaron al comienzo, t₀, después de un mes, t₁, o después de doce meses, t₁₂, de almacenamiento a temperatura ambiente en ausencia de luz. Las mediciones de tamaño de partícula en los métodos M₁ y PS₂ se determinaron en el dispersor DynaPro99.

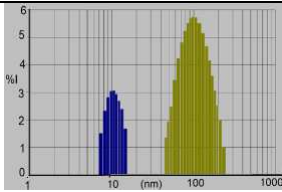
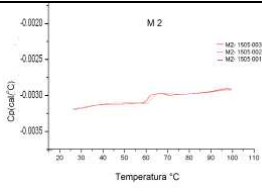
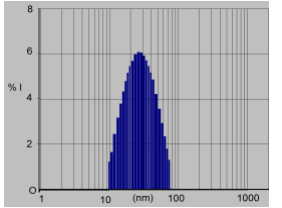
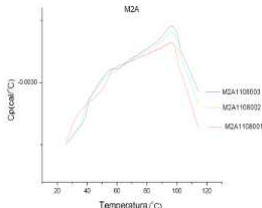
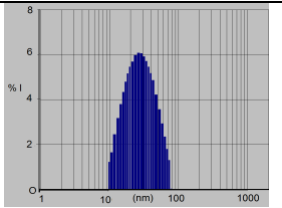
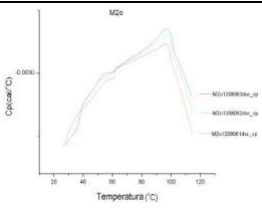
Orden de adición de FS en las fases FO o FW. El estudio se basa en la variación del orden de adición de los excipientes, para evaluar el efecto de la disolución del tensoactivo en la fase acuosa o en la oleosa, midiendo el tamaño de partícula y su comportamiento térmico para determinar la estabilidad del sistema.

Los resultados de las pruebas preliminares fueron obtenidos con una misma formulación en una relación de concentración F_O:F_S:F_W [2.5:5.0:92.5] utilizando el método 2 {TAM:TAU} y variando el orden de adición de la F_S: a) método 2, la mezcla F_O:F_S:F_W se adicionaron todos los excipientes en una sola vez; b) método 2_A, donde la F_S se adicionó en la F_W y c) método 2_O, la F_S fue adicionada en la F_O, para obtener los tamaños de partículas que se muestran en la tabla 18.

El método 2, obtuvo un sistema bimodal con diámetros de partícula: [(D/Rh)nm] de [(20.1/10.6)nm;(221.8/110.9)nm]₂ con un IPD de 0.98; el método 2_A, con un sistema monomodal con partículas de [(60.8/30.4)nm]_{2A} con un menor IPD de 0.45 y el método 2_O, también tiene una distribución monomodal de partículas con [(73.2/36.6)nm]_{2O} y con un medio IPD de 0.71.

Las muestras 2, 2_A y 2_O se estudiaron en los termogramas obtenidos por el *método DSC 3 x 3* observándose, que el método 2 tiene un diferente comportamiento térmico comparado con las muestras 2_A y 2_O, las cuales tienen similares termogramas que indican tener estabilidad similar (Tabla 18).

Tabla 18. Tabla comparativa de las muestras: a) 2, b) 2_A y b) 2_O diámetros/radios hidrodinámicos de partículas en nanómetros de los métodos 2, 2_A y 2_O utilizando DLS y los gráficos comparativos del 1°, 2° y 3er termogramas de los métodos 2_A y 2_O, utilizando DSC.

M	H	D (nm)	Rh (nm)	M(%)	IPD	DLS	DSC
a)							
	1	20.1	10.6	99.4	0.98		
2	2	221.8	110.9	0.6			
b)							
2 _A	1	60.8	30.4	100	0.45		
c)							
2 _O	1	73.2	36.6	100	0.71		

Abreviaturas: método (m); métodos 2 (TAM:TAU); método 2_A {TAM:TAU} F_S en F_W; método 2_O {TAM:TAU} F_S en F_O; porcentaje en masa de distribución del histograma (%M) y radio hidrodinámico en nanómetros [Rh (nm)].

Método premezclado-sonicación-reposo: PSR. Los métodos PSR se obtuvieron por la variación del método PS o {TAM:TAU}_{PS} en el que se intercalaron intervalos de tiempo de 2.5 min de reposo (R) entre los períodos de sonicación de 2.5 min (método 2.5' x 2.5') y manteniendo la temperatura de 20 ± 2°C con baño de hielo. Las muestras PS_{2a-2c} y PSR₃ fueron obtenidas variando el orden de adición por el método 2_A o el método 2_O respectivamente, manteniendo la misma concentración porcentual de F_O:F_S (2.5:5.0) a temperatura de 20± 2°C. Dicha modificación produjo inicialmente sistemas [bimodales]_{PS2a-c} y [monomodales]_{PSR3} que se estabilizan después de t₁₂ de almacenamiento, tal como se muestra en la tabla 19.

Las muestras PS_{2a-c} son bimodales a t₀: [74.6(nm)₁;10.1(nm)₂]_{PS2a}; [90.0(nm)₁;9.7(nm)₂]_{PS2b} y [73.2(nm)₁; 9.2(nm)₂]_{PS2c}, estabilizándose a monomodales, después del almacenamiento a t₁₂ [52.2(nm)]_{PS2a}; [42.0(nm)]_{PS2b} y [95.0(nm)]_{PS2c}, ver tabla 19a. Para la muestra PSR₃ presentó partículas de diámetros e

índice de polidispersidad a t_0 de $[60.3(\text{nm})]_{\text{PSR}_3}$ e IPD $[0.64]_{\text{PSR}_3}$ y a t_{12} se mantienen monomodales a t_{12} , $[63.0(\text{nm})]_{\text{PSR}_3}$ e IPD $[0.27]_{\text{PSR}_3}$, (ver tabla 19b). Comparativamente a t_{12} el método 2_A obtiene tamaños menores en las muestras $[(52 \text{ nm})]_{\text{PS}_{2a}}$; $[(42 \text{ nm})]_{\text{PS}_{2b}}$ y $[(95 \text{ nm})]_{\text{PS}_{2c}}$ que el $[63.0(\text{nm})]_{\text{PSR}_3}$, esto se debió a que el valor log P de 7.73 de AO al ser más lipófilo se favorece una reducción en el tamaño de las pequeñas gotas que forman la F_O , que cuando se añadió PS_{80} a la F_O produjo partículas más pequeñas, favoreciendo la rápida formación de una microemulsión con muy poca energía (Maibaum *et al.*, 2004) que cuando el PS_{80} se adiciona a la F_W , debido a que diferencia, el log P de 4.69 de PS_{80} que es más hidrófilo y favorece la solubilidad F_S en la F_W , prefiriendo el aumento en las formas micelares que están relacionadas con una mayor afinidad de F_O a F_S , cuando F_S es parcialmente secuestrada por la F_W . Sin embargo, la aplicación de alta energía reduce el tamaño de partícula para formar NE, ver tabla 19.

Tabla 19. Comparación de las metodologías 2_A y 2_O a temperatura de emulsión ($T^{\circ}\text{C}$)_{Emul} de 20 °C, determinando los diámetros de partículas en nanómetros y la polidispersidad/índice de polidispersidad (% PD/IPD) de los métodos PS_{2a-c} y PSR₃.

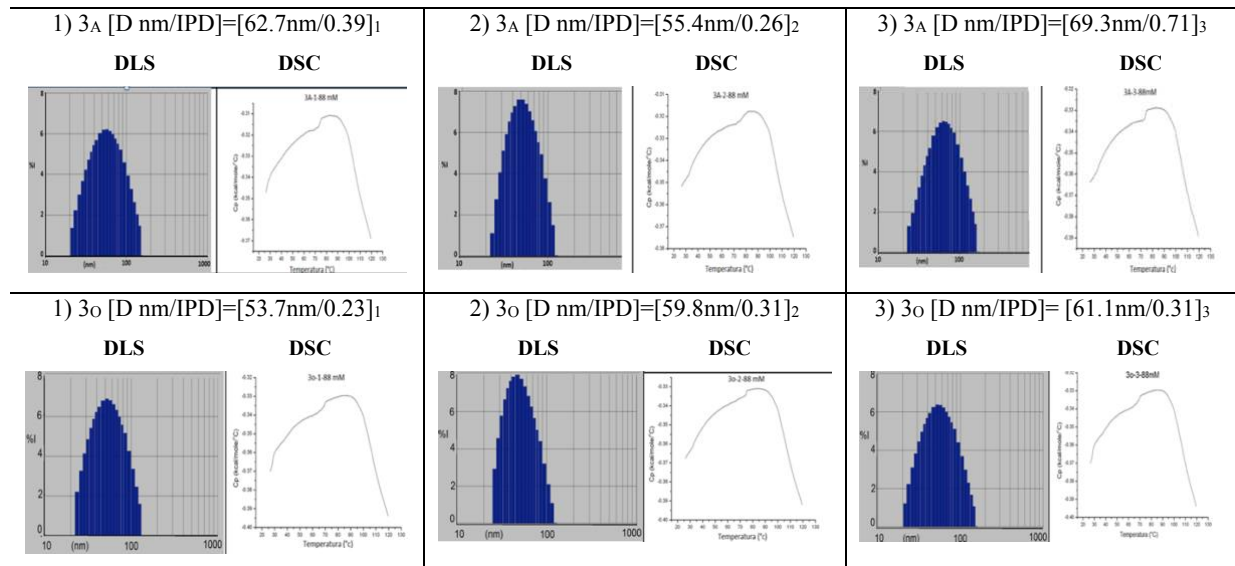
Método	Adición de F_S	$(T^{\circ}\text{C})_{\text{Emul}}$	$[F_O]:[F_S]$	Tamaño de partícula		
				t_0	t_1	t_{12}
				D (nm) [% PD/IPD]	D (nm) [% PD/IPD]	D (nm) [% PD/IPD]
a)	PS _{2a}	20 ± 2	1.5:5.0	74.6/10.1 [15.8/39.9]	53.4 [26.7]	52.2 [0.2]
	PS _{2b}			90/9.7 [20/53.5]	76.2 [38.1]	42.0 [0.31]
	PS _{2c}			73.2/9.2 [13.6/29.4]	63.6 [31.8]	95.0 [0.29]
b)	PSR ₃	20 ± 2	2.5:5.0	60.3 [0.64]	--- [---]	63.0 [0.27]

Temperatura de emulsión y velocidad de enfriamiento. El estudio del efecto de la temperatura de emulsión y la influencia de la velocidad de enfriamiento de la emulsión en el tamaño de partícula y en el comportamiento térmico de las muestras fueron determinados en los estudios preliminares y finales.

Los estudios preliminares se realizaron a 70°C fijos y se varió el método de disolución del F_S en la F_W (método 3_A) obteniendo las tres muestras (3_{A1}, 3_{A2} y 3_{A3}) con una relación $[D(\text{nm})/\text{IPD}]$ de $[(62.7)\text{nm}/0.39]_{3A1}$; $[(55.4)\text{nm}/0.26]_{3A2}$ y $[(69.3)\text{nm}/0.71]_{3A3}$ que resultaron ser mayores que las tres muestras (3_{O1}, 3_{O2} y 3_{O3}) $[(53.7)\text{nm}/0.23]_{3O1}$; $[(59.8)\text{nm}/0.31]_{3O2}$ y $[(61.1)\text{nm}/0.31]_{3O3}$ obtenidas por el método 3_O, de disolución del F_S en la F_O , cuyos resultados mostraron tener una relación inversa del tamaño de partícula a la temperatura de emulsión a 70°C, tal como se muestra en la tabla 20. El comportamiento

térmico de las muestras 3_A y 3_O son muy similares y no se observa una diferencia en los termogramas *método DSC 3x3*.

Tabla 20. Comparación del efecto de la temperatura de emulsión de 70° C. 1) método de disolución del tensoactivo en la fase acuosa (Método 3_A): 1a) efecto de la temperatura en el tamaño de partícula y 1b) comportamiento térmico, y 2) método de disolución del tensoactivo en la fase oleosa (Método 3_O): 2a) efecto de la temperatura de emulsión en el tamaño de partícula y 2b) comportamiento térmico y el diámetro (nm)/ IPD.



Muestras finales PSR₄ y PSR₅: temperatura de emulsión a 70°C. Las pruebas finales para determinar el efecto de la temperatura de emulsión a 70°C se realizaron mediante dos métodos variando la velocidad de enfriamiento lenta y rápida. Las muestras PSR_{4a} y PSR_{4b} dispersaron por el método 3_A y se emulsionaron a 70°C, controlando el enfriamiento lento y rápido a 20°C respectivamente. Comparativamente, las muestras PSR_{5a} y PSR_{5b} dispersaron por el método 3_O y se emulsionaron a 70°C enfriándose lenta o rápidamente utilizando baño con hielo, respectivamente. Los resultados de la relación entre el tamaño de partícula y polidispersidad [D(nm)]/[% PD/IPD] fueron determinados al inicio (t₀) y después de doce meses (t₁₂) de almacenamiento a temperatura ambiente. La muestra PSR_{4a} con enfriamiento lento tuvo una relación de [(124.0/0.29)nm]_{t₀} disminuyendo a [(88.7/0.76)nm]_{t₁₂} y la PSR_{4b} con enfriamiento rápido obtuvo una disminución similar del tamaño de partícula de [(138/0.71)nm]_{t₀} a [(88.8/0.5)nm]_{t₁₂}. Sin embargo, la muestra PSR_{5a} con enfriamiento lento, no presentó una gran disminución durante el almacenamiento de [(119.0/0.26)nm]_{t₀} a [(104.6/0.89)nm]_{t₁₂} a diferencia de la muestra PSR_{5b} con enfriamiento rápido que disminuyó de [(119.7/0.31)nm]_{t₀} a [(86.4/0.49)nm]_{t₁₂}, tal como, se muestra en la tabla 21.

El incremento en la temperatura de emulsificación se justificó esperando favorecer la emulsificación, tratando de romper las gotas grandes de la F_O, produciendo muchas gotas pequeñas. Además, al alcanzar

el punto de ruptura de gotitas, una velocidad de enfriamiento rápida debió preservar la estabilidad de las gotas más pequeñas, en lugar de una velocidad de enfriamiento lenta, que conducirían a la maduración, como se observó que la relación $[D \text{ (nm)}/\% \text{ PD/IPD}]$ después del periodo de estabilidad para el método PSR_{5a} con partículas de $[104.0\text{nm}/0.89]_{t_{12}}$, en comparación con el PSR_{5b} de $[86.4\text{nm}/0.49]_{t_{12}}$ comparativamente, con el método PSR_{4a} a que no tuvieron diferencias entre las partículas de $[88.7\text{nm}/0.76]_{t_{12}}$ en comparación con el PSR_{4b} de $[88.8\text{nm}/0.50]_{t_{12}}$ con la agitación rápida. Tabla 21

Tabla 21. Comparación de las condiciones para obtener una NE_{O/W} a temperatura de emulsión (T_{emul}) de 70°C y la velocidad de enfriamiento (V_{Ef}), determinando el tamaño de partícula D (nm) y polidispersidad/índice de polidispersidad $[\% \text{PD/IPD}]$ en los métodos PSR₄ y PSR₅ que tienen una distribución monomodal.

Método	Adición de F _S	T_{emul} V_{Ef}	[F _O]:[F _S]	Tamaño de partícula			
				t_0	t_1	t_{12}	
				D (nm) [% PD/IPD]	D (nm) [% PD/IPD]	D (nm) [% PD/IPD]	D (nm) [% PD/IPD]
PSR _{4a}	F _W (3 _A)	70 a 25 lento	2.5:5.0	124.0 [0.29]	---	---	88.7 [0.76]
PSR _{4b}		70 a 25 rápido		138.8 [0.71]	---	---	88.8 [0.50]
PSR _{5a}	F _O (3 _O)	70 a 25 lento	2.5:5.0	119.0 [0.26]	---	---	104.6 [0.89]
PSR _{5b}		70 a 25 rápido		119.7 [0.31]	---	---	86.4 [0.49]

Para los sistemas obtenidos por los métodos PSR₄₋₅, los tamaños de partícula se determinaron al comienzo, t_0 , después de un mes, t_1 , o después de doce meses, t_{12} , de almacenamiento a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Las mediciones de tamaño de partícula para P_{SR4-5} se determinaron en el instrumento *Zetasizer NanoDS*.

Efecto del tiempo de maduración con el tamaño de partícula. La muestra m_{3O} con la formulación que tiene relación de concentraciones F_O:F_S:F_W [2.0:5.0:93.0] obtenidas por el método 3_O que se sometió a periodos de almacenamiento a temperatura ambiente y resguardada de la luz.

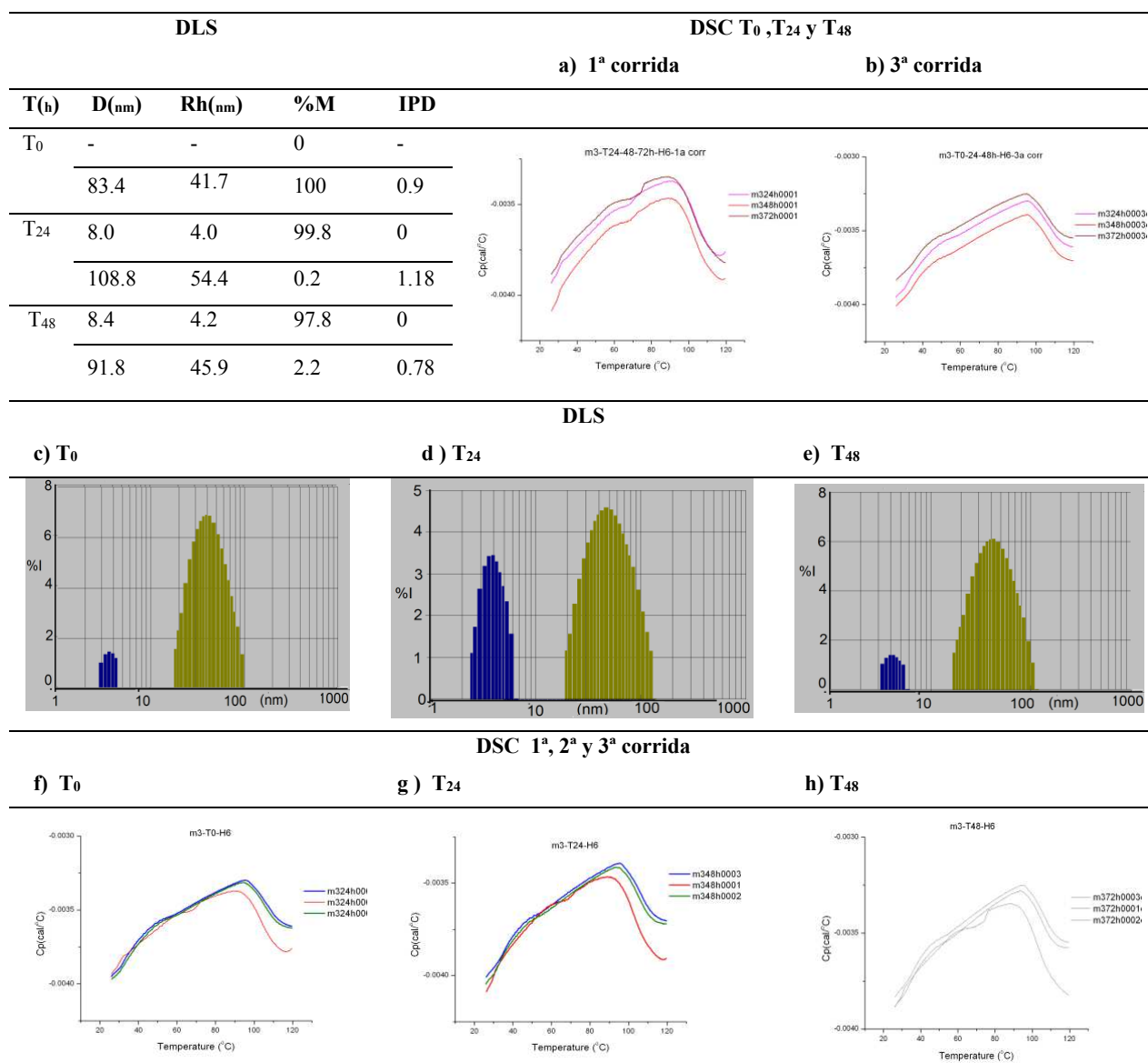
Estudios preliminares de las variaciones del tamaño de partícula en las primeras 48 horas.

El estudio a corto plazo del efecto del tiempo de maduración se evaluó inicialmente en las primeras 48 horas almacenamiento determinando la variación del tamaño de partícula y su comportamiento térmico en periodo corto de tiempo, desde el inicio, t_0 , un día después al tiempo, t_{24} hasta el tiempo t_{48} .

La muestra 3_O presentó un comportamiento bimodal de $[D(\text{nm})/\% \text{PD/IPD}]$: a) al inicio: $[83.4\text{nm}/0.90]_{t_0}$; a las tiempo 24 horas, $[8.0\text{nm}/0;108.8\text{nm}/1.18]_{t_{24}}$; y a las 48 horas, $[8.4\text{nm}/0.0;91.8\text{nm}/0.78]_{t_{48}}$, sin presentar cambios representativos en las primeras 48 horas, ver la tabla 22a, b, c, d y e. El estudio comparativo de las nanoemulsiones analizadas por el método DSC 3x3 a T_0 , T_{24} y T_{48} muestran un comportamiento térmico en su primer calentamiento con un evento aproximadamente a los 60° C que es

similar en todos los tiempos, ver la tabla 22^a. En el 2^o y 3^{er} calentamiento se elimina el evento que apareció en el 1^{er} calentamiento, ver la tabla 22b. Las corridas completas a T₀, T₂₄ y T₄₈ analizadas con el método DSC 3x3 descritas en la tabla 22f, g y h, respectivamente, ratificando los resultados descritos en la 1^a y 3^a corridas.

Tabla 22. Comparación en el tamaño de partícula y su comportamiento térmico de nanoemulsiones en periodos cortos de tiempo, determinadas desde inicio (T₀), a las 24 (T₂₄) y a las 48 horas (T₄₈) obtenidas con el tensoactivo polisorbato 80 (PS₈₀₋₂), utilizando DLS y DSC



Abreviaturas: Tiempo en horas (T_h); Tamaño de partículas en nanómetros, T_p (nm); porcentaje en masa de la distribución (%M) e Índice de polidispersidad (IPD).

Muestras finales PSR₆: Estudio del orden de adición de la F_w. Para determinar el efecto del orden de adición de la F_w se realizó la muestra PSR_{6a} con una formulación con 2.0% de F_O agregándole el 50% de F_w, posteriormente se añadió 5.0% de la F_s y completando la formulación con el 100% de la F_w. La metodología al 100% de la F_w se realizó con 1.5, 2.0 y 2.5% de F_O para obtener las muestras PSR_{6b}, PSR_{6c} y PSR_{6d}, respectivamente, Los resultados de las distribuciones (DS) del tamaño de partícula de las muestras PSR_{6a} tuvieron una relación del tamaño de partícula y polidispersidad [D (nm)/% PD/IPD] de [529nm/0.68;13.41nm /0.43]_{PSR6a} con una distribución bimodal, véase la Tabla 23.

Tabla 23. Las condiciones para obtener NE_{O/W} y sus efectos sobre el tamaño de partícula D(nm) y polidispersidad/índice de polidispersidad [% PD/IPD].

Método	Adición de F _S	T _{emul} V _{Ef}	[F _O]:[F _S]	Tamaño de partícula					
				DS ₁	D (nm) [% PD/IPD]	DS ₂	D (nm) [% PD/IPD]	DS ₃	D (nm) [%PD/IPD]
PSR _{6a}	[F _O :F _w] _{50%}	15 ± 2	2.0:5.0		529.0 [0.68]		13.41 [0.43]		--- [---]
PSR _{6b}	[F _O :F _w] _{100%}	15 ± 2	1.5:5.0		528.0 [0.83]		11.86 [0.37]		4554 [0.19]
PSR _{6c}	[F _O :F _w] _{100%}	15 ± 2	2.0:5.0		61.37 [0.51]		--- [---]		--- [---]
PSR _{6d}	[F _O :F _w] _{100%}	15 ± 2	2.5:5.0		140.2 [0.59]		15.82 [0.44]		--- [---]

Tamaños de partículas de PSR₆-PSR_F fueron medidos en un *Zetasizer NanoDS instruments*. Monodisperso (MD) y Polidisperso (PD). Los sistemas fueron obtenidos por los métodos M₁, PSR₆ y PSR_F, los tamaños de partículas fueron determinadas a almacenamiento a temperatura ambiente en ausencia de luz.

Para los métodos PSR_{6b-d}, todos los componentes F_O:F_S:F_w se pre-mezclaron al mismo tiempo y más tarde se sometieron a energía ultrasónica a 15 ± 2°C, como temperatura de emulsificación, con diferentes concentraciones de F_O, 1.5, 2.0 y 2.5% para PSR_{6b}; PSR_{6c} y PSR_{6d} respectivamente. Este método proporcionó el premezclado necesario, así como la energía requerida, a través de la sonicación, para generar semillas de todos los componentes y, al mismo tiempo, retenía el enfriamiento del sistema para generar tamaños pequeños y distribuciones más estrechas de las partículas. [D (nm)/ % PD/IPD].

Los resultados obtenidos permitieron comparar el método PSR_{6b} y PSR_{6d} que presentaron distribuciones bimodales con [528nm/0.83;11.86nm/0.37]_{PSR6b} y partículas de [140.2nm/0.59;15.82nm/0.44]_{PSR6d}, respectivamente. A diferencia del método PSR_{6c} que tuvo una distribución monomodal con partículas de [61.37nm/0.51]_{PSR6c}. La muestra PSR_{6c} se determinó como la formulación final y se repitió por triplicado, identificándose como el método de PSR_{Final}, con 2.0% de F_O, 5% de F_S y 93% de F_w, obteniendo un

promedio de [71.86nm/0.42], manteniendo una distribución monomodal y buena reproducibilidad. Dado que las fracciones de peso empleadas no proporcionan proporciones molares, fue necesario evaluarlas para determinar la importancia estructural en dicha buena estabilización.

Así, los tamaños nanométricos más pequeños se encontraron para PSR_{6c} con una relación F_O:F_S [AO]/[PS₈₀]=0.0708/0.0382=1.85 [mol·L⁻¹] con (2.0% de F_O y 5% F_S) proporciones en este trabajo que presentó partes del AO están cubiertas/estabilizadas por una parte de PS₈₀, dando lugar a partículas de 71.86 nm, con un índice de polidispersidad (IPD) de 0.42. En comparación, para otros trabajos que presentaron una proporción de 0.74, por lo que haciendo el cálculo requeriría una relación F_O:F_S [AO]/[PS₈₀]=0.0708/0.0956=0.74 [mol·L⁻¹] con (2.0% de F_O y 12.5% F_S), dicha proporción de 0.74 produjeron microemulsiones con 500 nm, incluso, utilizando cotensoactivos como propilenglicol (Abd-Allah *et al.*, 2010). Para PSR_{6b}, las proporciones fueron de [AO]/[PS₈₀]=1.39 (con 1.5% de F_O y 5% F_S), mientras tanto para PSR_{6d}, las proporciones fueron de [AO]/[PS₈₀]=2.32 (con un 2.5% de F_O y un 5% F_S) con tamaños e IPD descritos previamente y colocados en la tabla 23. Un análisis más profundo de esta información y resultados evidenciaron que el [AO]/[PS₈₀]=1.85 proporción es un buen punto de equilibrio para encapsular casi la cantidad doble de F_O en comparación con F_S, prevaleciendo los tamaños nanométricos y las distribuciones más estrechas, que son muy buenos resultados en el diseño y la preparación de nanoemulsiones para diversos propósitos de aplicación. La relación entre la composición del factor intrínseco y la preparación del factor extrínseco determinó la reducción y la estabilidad de la NE, similar a los resultados informados por Gutiérrez y colaboradores (Gutiérrez *et al.*, 2008).

Muestras finales PSR_F. El método PSR_{Final} es la repetición de PSR_{6c} con 2.0% de F_O y 5% de F_S, desarrollando con relación D (nm)/[% PD/IPD] de [71.86nm/0.42] con buena reproducibilidad y distribución monomodal. Estos dos resultados se colocan en la tabla 24, ya que son los únicos dos ensayos que desarrollaron distribuciones monomodales y de manera complementaria, ver figura 6.

Tabla 24. Verificación de la formulación final de la NE O/W comparando el tamaño de partícula (D [nm]) y polidispersidad/índice de polidispersidad [% PD/IPD].

Método	Adición de F _S	T _{emul}	[F _O]:[F _S]	Tamaño de partícula						
				MD	D (nm) [% PD/IPD]	PD	D (nm) [% PD/IPD]	PD	D (nm) [% PD/IPD]	
PSR _{6c}	F _O :F _W 100%	15 ± 2	2.0:5.0		61.37 [0.51]		---		---	
PSR _{Final}	F _O :F _W 100%	15 ± 2	2.0:5.0		71.86 [0.42]		---		---	

Tamaños de partículas de PSR₆- PSR_F fueron medidos por DLS, Monodisperso (MD) y Polidisperso (PD).

Los sistemas fueron obtenidos por los métodos M₁, PSR₆ y PSR_F, su tamaño de partículas fue determinadas a almacenamiento a temperatura ambiente en ausencia de luz.

En PSR_F: “F” significa la formulación final y es una repetición de PSR_{6c}.

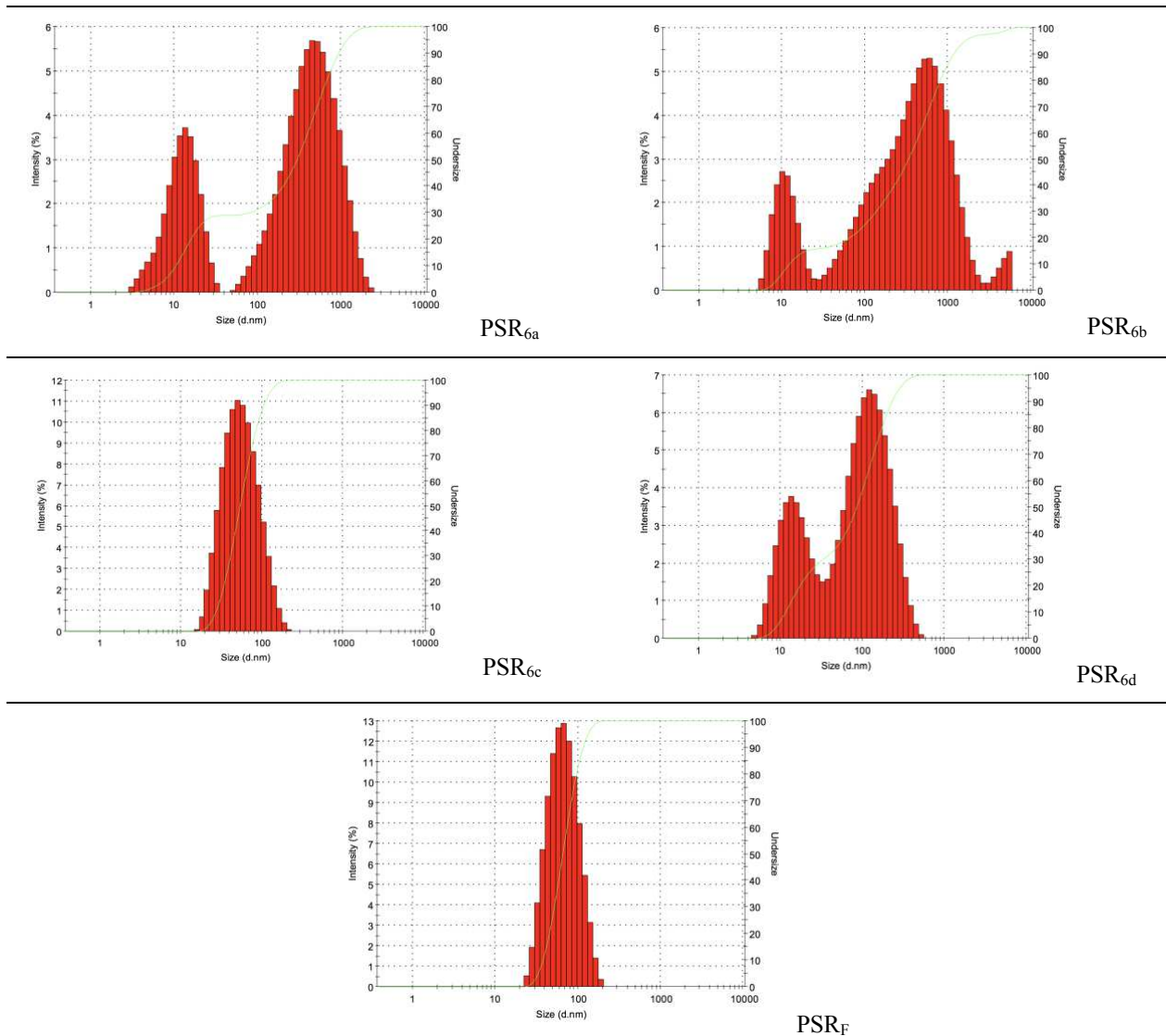


Figura 6. Distribuciones de tamaño de diámetro [nm] por DLS de los sistemas obtenidos por los métodos PSR_{6a-d} y PSR_{Final}.

Etapas 3. Estudio de estabilidad

El estudio de la estabilidad de las muestras a tiempo real se evaluó mediante el almacenamiento a temperatura ambiente y bajo resguardo de la luz durante un periodo de tiempo hasta que se presentaron inestabilidades, como cambios en apariencia física, separación de fases y cambios de color, así como por aumento de tamaño de partícula o distribuciones multimodales, siendo estos los parámetros de rechazo. Las muestras aprobadas se mantuvieron estables, durante un periodo mayor a 12 meses (t_{12}), sin presentar

cambios físicos durante el almacenamiento, evaluando su tamaño de partícula y polidispersidad por DLS y su comportamiento térmico por DSC (Tabla 24 y figuras de 9-12) y finalmente el tamaño de partícula se evaluó por TEM (figura 8). Las muestras estudiadas se obtuvieron por los métodos PSR₂₋₆ (Tablas 19, 21 y 23) y PSR_{6FINAL} (Tabla 24) afirmando la premisa de la estabilización.

Estudio de estabilidad por apariencia física

Las nanoemulsiones obtenidas en el presente trabajo presentaron apariencia física homogénea, viscosidad baja (Mason *et al.*, 2006) y color azul-rojiza (Figura 7a), por el efecto de dispersión de *Rayleigh* con una apariencia translúcida con tonos suaves rojizos cuando la luz es transmitida (Figura 7b y 7d) ligero azul con la luz refractada (Figura 7c y 7e) (Shafiq *et al.*, 2007^a) y que es característico por el tamaño de partícula de la FI en la FE, dándole sus propiedades fisicoquímicas como: dispersiones de tamaño nanométrico (Shah *et al.*, 2010; Leong *et al.*, 2009 y Shakeel *et al.*, 2008^a). Además, las nanoemulsiones, macroemulsiones y microemulsiones pueden diferenciarse principalmente por el tipo de estabilidad termodinámica o cinética, determinando el tamaño de partícula, la viscosidad, la densidad y de manera complementaria por apariencia visual del color: blanco característico en las macroemulsiones, transparente en las microemulsiones y translucido tornasol para las nanoemulsiones (ver Tabla 1).

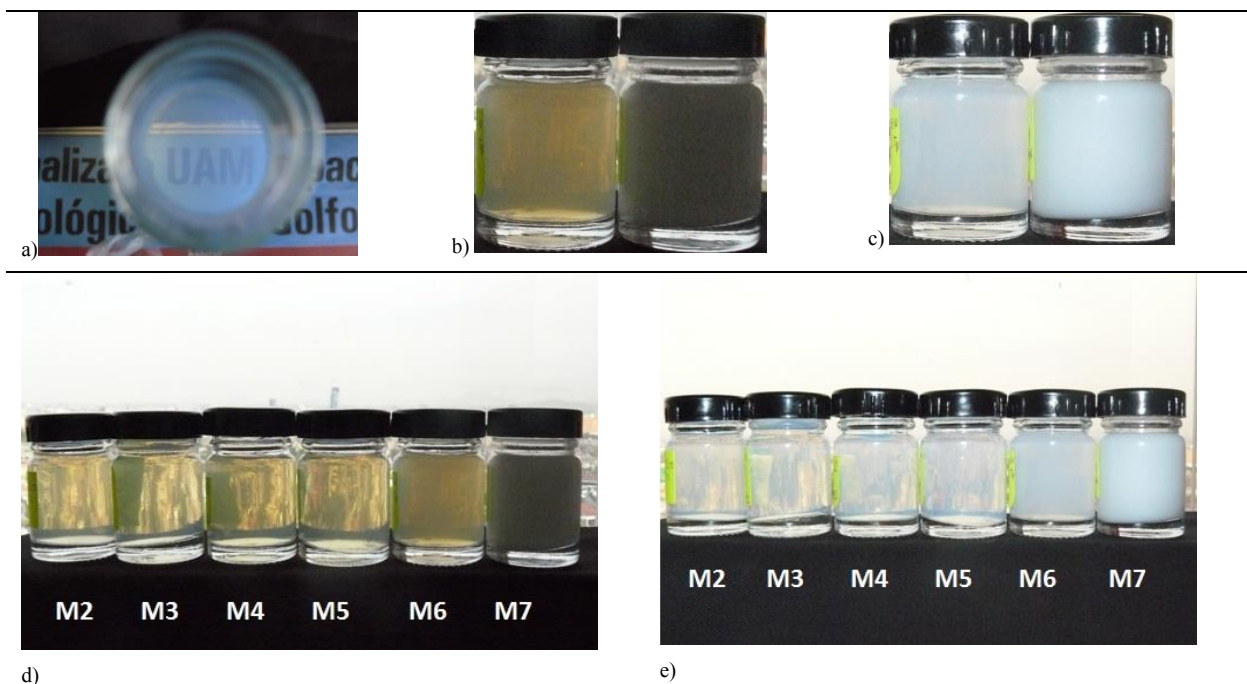


Figura 7. Comparación por apariencia: a) La muestra M4 presenta mayor transparencia y opacidad; b) Muestras M6 y M7 a contraluz; c) Muestra M6 y M7 con luz frontal; d) M2 a M6, se observa transparencia y opalescencia rojiza contra luz a diferencia de la M7 que presenta un color blanco y opacidad; e) M2 a M6, muestran transparencia y opalescencia rojiza contra luz a diferencia de la M7 que presenta un color blanco y opaco.

Morfología microscópica

Para determinar el tamaño y la polidispersidad, así como la forma de estas NE obtenidas, se empleó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para la mejor formulación PR_{6c}/PSR_{Final}. Debido a la falta de los restos de agente de contraste cromóforos o relacionados en esta formulación, se necesitaban técnicas de tinción negativa, ya que este tipo de nanomotivos normalmente aparecen como gotas de luz sobre un fondo más oscuro, como también se reveló por la tinción de otros nanomotivos (Espinoza *et al.*, 2019; Buller 2017; Lambert y Rigaud 2003). Los resultados revelaron que, de hecho, el tamaño de estas nanoemulsiones oscilaba *ca.* 72 nm (motivos medidos 120-65 nm) de diámetro, resultaron casi isométricos y de conformación esférica. Estudios realizados en la caracterización de nanopartículas homogéneas de oro, compararon diferentes técnicas y criterios de medida para los métodos de rutina DLS, UV-VIS y HR-TEM, encontrando que la diferencia entre el diámetro efectivo promedio de 17.67 nm medido por HR-TEM es de aproximadamente un 20% mayor que el diámetro de 14.14 nm medido por DLS. Dichos resultados corroboran los obtenidos en la NE_{Final} que presentaron tamaño de partícula mayores por TEM que las obtenidas por DLS (Botasini, 2020). Algunos motivos eran un poco más grandes que 100 nm, ver la microfotografía derecha en la Figura 8a. En ella se puede observar que la mayoría de ellos resultaron más pequeños que 100 nm, y estos se observan en la Fig. 8b, pero todos ellos conformaron la misma estructura esférica.

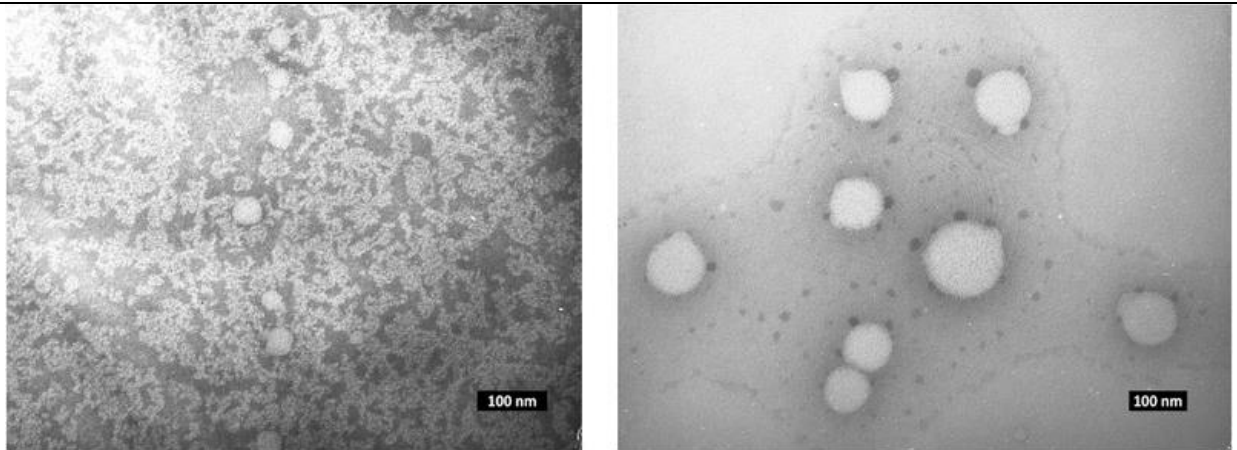


Figura 8. Microfotografías TEM 100kx de PSR_{6c}/PSRF (2% ácido oleico, 5% de polisorbato 80 y 93% de agua) evidenciando tamaños de partícula entre 65-120 nm.

Estudio de estabilidad por calorimetría

Las muestras obtenidas a través de los métodos PSR_{6b-d} se caracterizaron adicionalmente por microcalorimetría mediante DSC, análisis de termogramas y deconvolución estadística obtenidos de cada

muestra a fin de determinar y comprender sus estabildades (Schäffer *et al.*, 2005; Dettler *et al.*, 2011). El análisis de termogramas reveló que al menos dos eventos están presentes, uno de partida a 30°C que se superpone con un segundo evento que comenzó *ca.* 50-60°C según la muestra, lo que coincide con el punto de nube de PS₈₀ a 65°C. Se sabe que este punto de nube se produce debido a la disminución de la solubilidad del PS₈₀ en la fase acuosa y al aumento de su afinidad por la interfaz o la fase de aceite a esa temperatura (Kerwin *et al.*, 2008). Posteriormente, en los ciclos de calentamiento segundo y tercero de los sistemas probados, se observaron ligeros cambios en las formas de la envoltura y la entalpía. Además, por la reorganización molecular en la NE, se observó una tendencia que indica que el calentamiento de las muestras alcanza *ca.* 120°C y el retorno a 30°C en la celda sellada produjeron un ligero efecto de desestabilización. Esto se debe a la maduración de Ostwald y como se analizó previamente, la temperatura de emulsificación se controló de manera importante a $15 \pm 2^\circ\text{C}$ para disminuir la maduración y promover la estabilidad (LI *et al.*, 2013), por lo tanto, la energía proporcionada al sistema no era de naturaleza térmica sino a través de vibraciones por ultrasonidos. Los termogramas de la muestra PSR_{6c} muestra desplazamiento hacia la derecha del ciclo 1 al ciclo 3, lo que indica que se requiere de mayor temperatura para que se lleve a cabo y con ello tiene una mayor estabilización del sistema, similar a lo que ocurre con la estabilidad o maduración en el tiempo de almacenamiento, ver figura 9b. Sin embargo, en los termogramas PSR_{6b} y PSR_{6d} se observa un desplazamiento hacia la izquierda del ciclo 1 al ciclo 3 indicando que estos sistemas son menos estables, ver figura 9a y b.

Los termogramas se normalizaron con las concentraciones de AO: a) 1.5% que equivale a 53.1 mM de AO en la muestra PSR_{6b}; b) 2.0% que equivale a 70.8 mM de AO en PSR_{6c} y c) 2.5% equivale a 88.5 mM de AO en la muestra PSR_{6d} y todas con 5% de PS₈₀ equivalente a 38.8 mM en los tres ciclos de calentamiento pudiéndose determinar la ΔH de cada sistema en $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla 25).

Los termogramas normalizados no mostraron una distribución simétrica en la envoltura de ninguno de los tres ciclos de calentamiento de las muestras PSR_{6b-d}, en contraste, como se muestra en 2a-c, se observaron envolturas con formas complejas. A pesar de la complejidad, estas envolturas se conservaron en gran medida durante los tres ciclos de calentamiento y enfriamiento, lo que permite afirmar que la estructura de los ensamblajes en las formulaciones debe ser muy similar, incluso en el caso de una pequeña maduración, como se explicó previamente. Los valores de ΔH ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) fueron 2698.27 (53.1 mM AO:38.8 mM PS₈₀,) para PSR_{6b} y 4788.56 para PSR_{6c} (70.8 mM AO:38.8 mM PS₈₀,) y 2869.12 en PSR_{6d} (88.5 mM AO:38.8 mM PS₈₀,). Esto en el primer ciclo de calentamiento, que debería corresponder con el comportamiento térmico de la NE, ver figura 9. Además, el análisis de la forma de la envoltura evidenció claramente varios procesos implícitos que pueden estimarse mediante el proceso de deconvolución de termogramas. Los termogramas normalizados con una distribución anormal de los 3 ciclos de calentamiento de las muestras PSR_{6b} PSR_{6c} y PSR_{6d} se sometieron a deconvolución para

determinar el área de la curva o ΔH en $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ del sistema, se muestran en las figuras 10 a la 12. En los tres casos, se logró una confianza estadística entre curvas contorneadas y envolvente, ya que todo Chi^2 no superó 1.06 y todos los cuadrados R ajustados están por encima de 0.99, los resultados se resumen en la tabla 25. Para reproducir las envolventes térmicas experimentales, se emplearon de 3 a 10 funciones gaussianas, utilizando un procedimiento iterativo que optimizó la altura, el ancho y la posición de cada curva gaussiana, minimizando la diferencia de capacidad de calor (C_p) observada y calculada en cada punto de la curva final.

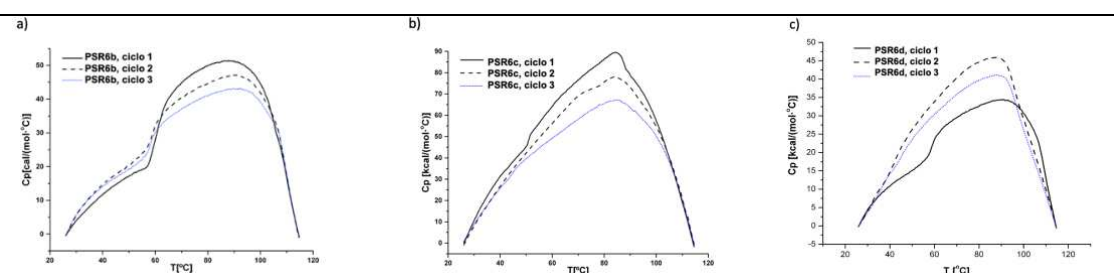


Figura 9. Termogramas estandarizados obtenidos por el método DSC 3x3 a partir de 3 ciclos de calentamiento de las muestras: a) PSR6b (1.5:5.0, FO:FS), b) PSR6c (2.0:5.0, FO:FS) y c) PSR6d (2.5:5.0, FO:FS).

Tabla 25. Deconvolución de picos DSC, T [°C], ΔH [$\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$], Capacidad calorífica C_p [$\text{kcal}\cdot(\text{mol}\cdot^\circ\text{C})^{-1}$] y Ancho del pico a la mitad de la altura [APMA, °C].

Pico/muestra	1	2	3	4	5	6	7	Entalpia ΔH $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$
PSR6b ; Ciclo 1; $\text{Chi}^2=0.15368$; Adj. $R^2=0.99951$; # puntos= 330; ° grados de libertad=309; SS= 47.488								
T	38.2	49.9	63.7	75.6	93.5	102.8	108.8	
ΔH	131.48	178.86	102.29	1356.79	632.34	248.53	47.98	2698.27
C_p	8.90	12.25	10.22	46.81	33.35	20.86	7.64	
APMA	14.2	13.7	9.4	27.2	17.9	11.3	6.0	
PSR6b ; Ciclo 2; $\text{Chi}^2=0.14423$; Adj. $R^2=0.99934$; # puntos= 329; ° grados de libertad=308; SS= 44.423								
T	34.7	47.4	62.4	77.6	93.2	101.7	107.6	
ΔH	72.68	350.96	297.64	1070.44	518.04	247.73	118.95	2676.47
C_p	6.30	17.90	18.0	41.3	29.8	20.8	14.9	
APMA	11.1	18.5	14.9	24.3	16.3	11.2	7.6	
PSR6b ; Ciclo 3; $\text{Chi}^2=0.12009$; Adj. $R^2=0.99932$; # puntos= 330; ° grados de libertad=309; SS=37.109								
T	34.0	46.8	61.8	76.9	93.1	101.6	107.7	
ΔH	65.02	337.04	236.82	1027.01	472.11	237.75	121.14	2675.76
C_p	5.9	16.9	15.5	38.1	26.7	19.6	15.4	
APMA	10.7	18.7	14.3	25.3	16.6	11.4	7.5	
PSR6c ; Ciclo 1 ; $\text{Chi}^2=1.05187$; Adj. $R^2=0.99848$; # puntos= 329; ° grados de libertad=314; SS=330.870								
T	37.2	50.0	---	68.3	---	87.5	102.3	

ΔH	236.32	584.61	---	1883.19	---	1570.00	514.42	4788.56
Cp	16.6	27.1	---	64.8	---	67.8	38.0	
APMA	13.8	20.3	---	27.3	---	21.8	15.0	
PSR_{6c} ; Ciclo 2; Chi ² = 0.80331; Adj. R ² =0.99851; # puntos= 329; ° grados de libertad=314; SS=252.238								
T	36.4	48.0	---	70.3	---	90.6	103.8	
ΔH	111.48	504.49	---	2103.39	---	1190.66	329.09	4239.13
Cp	8.8	23.6	---	63.7	---	51.7	24.1	
APMA	12.1	20.1	---	31.0	---	21.7	13.1	
PSR_{6c} ; Ciclo 3; Chi ² = 0.69929; Adj. R ² = 0.99817; # puntos= 330; ° grados de libertad=315; SS=220.276								
T	37.9	53.6	---	---	77.8	94.1	104.9	
ΔH	146.26	989.76	---	---	1714.88	720.49	265.55	3836.95
Cp	9.3	35.6	---	---	56.6	34.6	20.8	
APMA	15.3	26.3	---	---	28.5	19.7	12.3	
PSR_{6d} ; Ciclo 1; Chi ² = 0.16178; Adj. R ² = 0.99940; # puntos= 329; ° grados de libertad=308; SS=49.827								
T	33.7	43.8	57.8	61.7	80.9	94.3	105.6	
ΔH	55.62	249.85	6.55	866.09	1031.50	532.55	126.94	2869.12
Cp	56.8	14.6	1.8	33.6	41.3	28.3	11.2	
APMA	9.5	16.1	3.3	24.1	23.4	17.8	10.9	
PSR_{6d} ; Ciclo 2; Chi ² = 0.08126; Adj. R ² = 0.99961; # puntos= 330; ° grados de libertad=312; SS= 25.352								
T	33.8	43.9	58.6	---	79.0	94.1	106.1	
ΔH	28.09	182.02	667.46	---	1001.90	516.29	99.0	2495.03
Cp	3.4	10.5	25.9	---	37.4	27.5	92.6	
APMA	7.7	16.4	24.2	---	25.1	17.7	10.3	
PSR_{6d} ; Ciclo 3; Chi ² =0.05622; Adj. R ² = 0.999660; # puntos= 330; ° grados de libertad=312; SS=17.541								
T	36.4	47.5	64.6	---	82.6	94.9	103.3	
ΔH	65.24	242.21	788.30	---	647.94	421.74	88.51	2253.96
Cp	5.1	12.2	28.0	---	27.9	24.3	8.4	
APMA	12.2	18.6	26.4	---	21.7	16.3	10.0	

Para PSR_{6b}, la deconvolución estadística se alcanzó con 7 funciones gaussianas; para PSR_{6c} con 5 funciones; mientras tanto, para PSR_{6d} se correlacionó con 6. Se realizaron pruebas adicionales para obtener deconvoluciones equivalentes con 5 a 7 curvas para comparar todas las series, pero esto no fue posible en ningún caso. Únicamente se obtuvieron resultados adecuados con el número de funciones gaussianas para cada caso, en el que se llegó a la convergencia requerida con la estadística necesaria para conseguir una buena descripción. Por lo que cada muestra debió describirse de manera eficiente con su propio número necesario de procesos térmicos. Sin embargo, para la misma muestra, pero con un ciclo de calentamiento diferente, esta condición del mismo número de funciones gaussianas se logró solo para la misma formulación. Estas diferencias también apuntan en la comprensión de las características

físicoquímicas de cada formulación, como se discutirá más adelante. Una comparación calorimétrica simple entre muestras obtenidas en los métodos PSR_{6b-d} indica claramente que PSR_{6c} con [O]/[S]=1.85 proporcionó sistemas más estables con una barrera térmica de estabilización (ΔH) de 4788.56 kcal·mol⁻¹. Esta proporción resultó muy estable, ya que la diferencia de entalpía para tal muestra es aproximadamente 1919.44 kcal·mol⁻¹ más estable que PSR_{6d}, con [F_O]/[F_S]= 2.32 ($\Delta H = 2869.12$), y 2090.29 kcal·mol⁻¹ más estable que PSR_{6b}, con [F_O]/[F_S]= 1.39 ($\Delta H = 2698.27$). Siendo la segunda muestra más estable que con [[F_O]/[F_S]=2.32. Este análisis proporcionó criterios de formulación claros en función de [F_O]/[F_S] > 1.85 pero < 2.32 para generar tamaños pequeños, distribuciones más estrechas y también estabilidad térmica.

Los termogramas de la muestra PSR_{6b} en el primer, segundo y tercer ciclo de calentamiento se normalizaron en función del 1.5% (p/p) F_O, con una concentración molar de 52.7 mM, 5.0% (w/w) con una molaridad de 38.16 mM de F_S y 93.5% de F_W. Los termogramas representan 91.16 mM (F_O+F_S), con ΔH (kcal·mol⁻¹) de 2698.27, 2676.47 y 2675.76 respectivamente.

La formulación de PSR_{6c}, compuesta de 2.0% F_O, 5.0% F_S y 93% F_W, se normalizó a concentraciones molares de 70.4 mM de F_O y 38.16 mM de F_S, que corresponden a 2:5 (F_O:F_S). La concentración total en la formulación de PSR_{6c} resultó en 108.57 mM (F_O+F_S), con ΔH (kcal·mol⁻¹) de 4788.56, 4239.1 y 3836.95, respectivamente. Los termogramas de la formulación de PSR_{6d} en los ciclos de calentamiento primero, segundo y tercero se normalizaron en función del 2.5% (p/p) y una concentración molar de 88.50 mM, 5.0% (p/p) con una molaridad de 38.16 mM de F_S y 92.5% de W. La formulación de PSR_{6d}, con una concentración total de 126.66 mM (F_O+F_S) dio como resultado un ΔH (kcal·mol⁻¹) de 2869.12, 2495.03 y 2253.96, respectivamente.

El comportamiento térmico y la estabilidad de la muestra de PSR_{6c} presentaron una disminución total, determinada como $\Delta\Delta H$ (kcal·mol⁻¹) de 951.61, esto como resultado de la diferencia entre H de 4788.56 (ciclo 1) y 3836.95 (ciclo 3); La formulación de PSR_{6d} disminuyó su estabilidad debido al calentamiento térmico para una cantidad de H de 615.16 kcal·mol⁻¹, bajando de ΔH de 2869.12 (ciclo 1) a 2253.96 (ciclo 3). Mientras tanto, la muestra de PSR_{6b} ha mostrado una disminución de la estabilidad con un $\Delta\Delta H$ de 22.51 kcal·mol⁻¹, como resultado de un ΔH de 2698.27 (ciclo 1) a 2675.76 (ciclo 3). Sin embargo, esa reducción de $\Delta\Delta H$ es mayor en magnitud para PSR_{6c}, lo que significa una alta desestabilización térmica del sistema, esta muestra exhibió un alto ΔH residual de 3836.95 kcal·mol⁻¹, mayor en comparación con los valores iniciales de ΔH (pertenecientes al ciclo 1) en PSR_{6b} y formulaciones PSR_{6d} con $\Delta\Delta H$ de 1138.68 y 967 kcal·mol⁻¹, respectivamente. Esta comparación evidencia claramente que la formulación de PSR_{6c} es la más estable en estas tendencias, seguida de PSR_{6d} y finalmente PSR_{6b}.

El análisis más detallado de los resultados de la deconvolución apunta a la comprensión de que tales procesos fueron necesarios para describir envoltentes experimentales en muestras de PSR_{6b-d}. Independientemente de los ciclos de calentamiento, la formulación PSR_{6b} se describió detalladamente con

7 funciones gaussianas, ver Figura 10; PSR_{6c}; con 5 funciones, ver Figura 11; y PSR_{6d} con 6 funciones, consulte la Figura 12, como se indicó anteriormente.

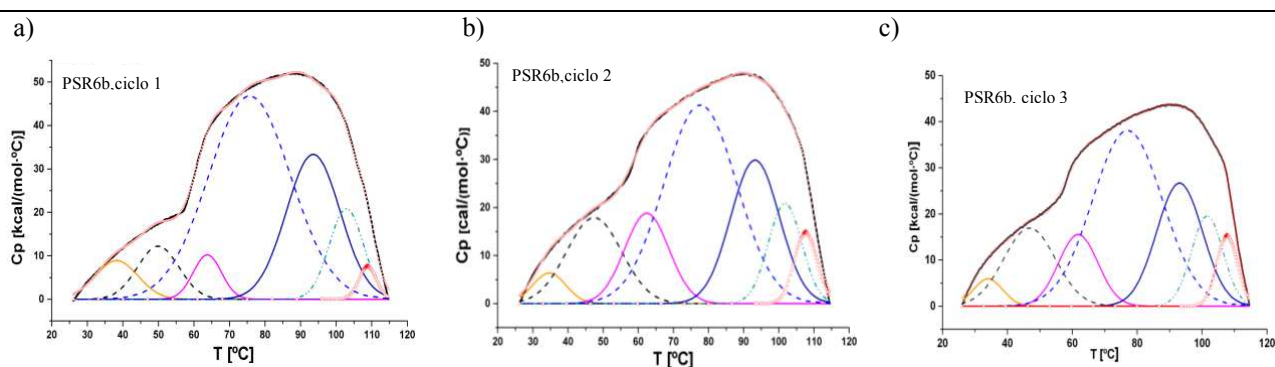


Figura 10. Los termogramas fueron normalizados por deconvolución en 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6b y determinando su ΔH kcal·mol⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3; la optimización de la deconvolución fue lograda con 7 curvas que describen el contenido estadísticamente.

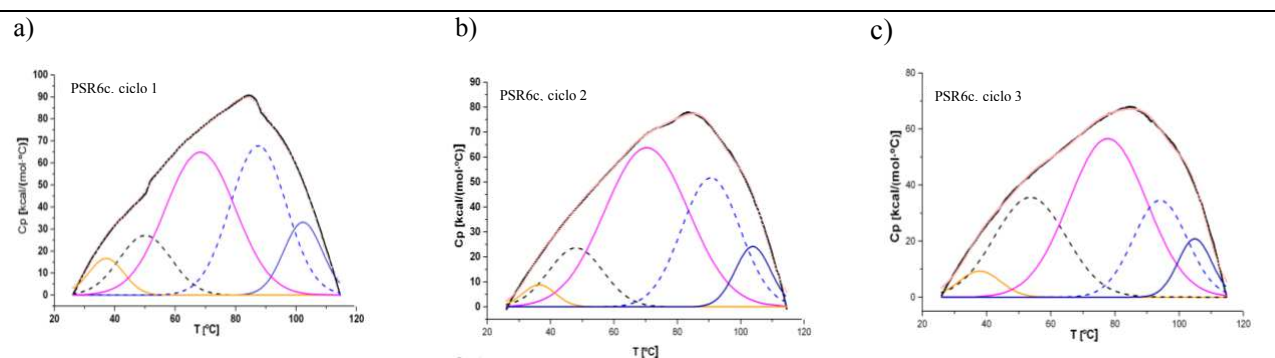


Figura 11. Los termogramas se normalizaron mediante la desconexión de 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6c para determinar los ΔH kcal · mol⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3. La optimización de la deconvolución se logró con 5 curvas para describir estadísticamente la envolvente.

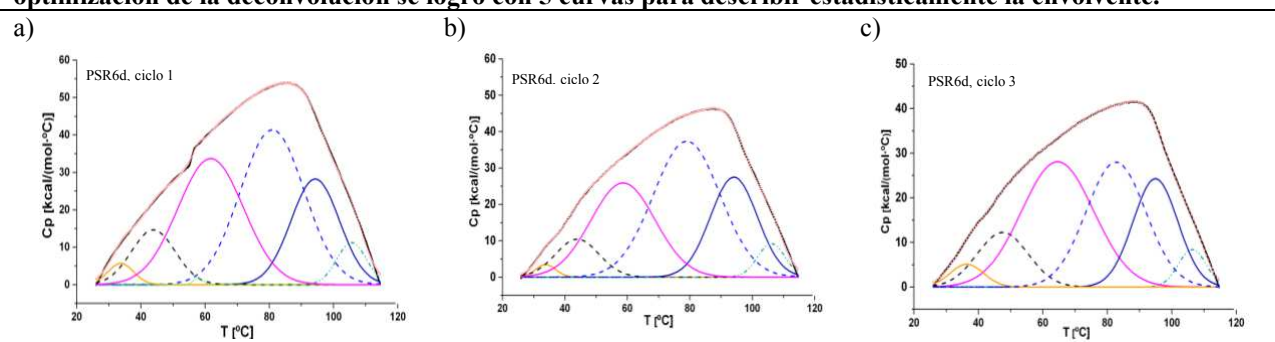


Figura 12. Los termogramas se normalizaron mediante la desconexión de 3 ciclos de calentamiento de la muestra PSR6d para determinar los ΔH kcal · mol⁻¹ del sistema: a) ciclo 1, b) ciclo 2 y c) ciclo 3; La optimización de la deconvolución se logró con 6 curvas para describir estadísticamente la envolvente.

Etapa 4. Estudio de citotoxicidad de NE

Los estudios de citotoxicidad de las NE determinan la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀) en líneas celulares: A549 de cáncer de pulmón de células no pequeñas y NL20, que son células bronquiales normales e inmortalizadas.

Cultivo celular de línea celular A549

Los resultados obtenidos en la investigación demuestran que el ATRA libre con un IC₅₀ 58 μM aumenta su 48% su citotoxicidad al estar nanoestructurado donde requiere de un IC₅₀ 28 μM en la NE_{ATRA}. Estudios *in vitro* que fueron encontrados en la bibliografía y se enumeran a continuación: 1) similar IC₅₀ 50μM de ATRA en A549 (Kawakami *et al.*, 2006 y Kawakami *et al.*, 2005); 2) IC₅₀ de 92.3 μM de ATRA utilizando una línea celular de la Universidad de Tokyo, mediante un ensayo de viabilidad celular por luminiscencia Cell Titer-Glo (Akita *et al.*, 2016); 3) IC₅₀ 27.11 μM de ATRA en línea celular A549 con mutación EGFR^{wt} por un método colorimétrico utilizando cristal violeta (YAO *et al.*, 2020); 4) IC₅₀ 20 nM de 9-cis-ácido retinoico (9-Cis-AR) y un IC₅₀ 20.0 nM con el 13-Cis-ácido retinoico (13-Cis-AR) en las líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón NCI-H322 y NCI-H69 con (Al-Wadei y Schuller. 2006); 5) IC₅₀ de 84 μM de ATRA en células A549 y otras once líneas celulares más, las cuales fueron comparadas con dos nuevos potentes derivados sintéticos, el para-isómero, ácido 4-(5,5,8,8-tetrametilo 5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-iletinilo) benzoico, a menudo se denomina EC23 y el metaisómero, 3-(5,5,8, ácido 8-tetrametilo-5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-iletinilo) benzoico, llamado EC19 (Abdelaal *et al.* 2021), ver la tabla 26a. El efecto del incremento de la citotoxicidad del ATRA libre al estar nanoestructurado en algún NST ha sido reproducible en estudios *in vitro* determinando: 6) IC₅₀ de 204 μM de ATRA libre y combinado con 88 μg/L de ficocianina encontraron 102 μM de ATRA incrementando un 50% de citotoxicidad al utilizar menos dosis de ATRA (Li *et al.*, 2015); 7) IC₅₀ de 37.63 μg/mL de naringenina Ng libre y 19.28 μg/mL de NE con naringenina (NE-Ng) incrementando 25 % la citotoxicidad (Shadab et al. 2020); 8) IC₅₀ de 4.0 μg/mL de aceite de hojas de *Casearia sylvestris* (Cs) y un IC₅₀ de 1.0 μg/mL de NE-C_s , incrementando el 75 % de la citotoxicidad (Pereira et al., 2017) y 9) Inducción del 25% al 50% de la toxicidad con ATRA incrementandose la citotoxicidad en un 25%) Inducción (Grace *et al.*, 2020); ver tabla 26b.

Tabla 26. Comparación de IC₅₀ del ATRA: a) ATRA libre y b) NE con ATRA en estudios similares.

Inciso	Nº	IC ₅₀ Activo libre	IC ₅₀ NST (µM)	Incremento citotoxicidad por la NST
		58 µM ATRA	28 µM de NEc	48%
a)	1	50µM ATRA		
	2	92.3 µM ATRA		
	3	27.11 µM ATRA		
	4	20 nM 9-Cis-AR y 20.0 nM 13-Cis-AR		
	5	84 µM ATRA		
b)	6	204µM ATRA	102 µM	50%
	7	37.63 µg/mL Ng	19.28 µg/mL de NE-Ng	25%
	8	4.0 µg/mL CS	1.0 µg/mL de NE-CS	75%
	9	Inducción del 25%	Inducción del 50%	25%

1) Kawakami *et al.*, 2006 Kawakami *et al.*, 2005); 2) (Akita *et al.*, 2016); 3) (YAO *et al.*, 2020) ; 4) 9-cis-ácido retinoico (9-Cis-AR) y 13-Cis-ácido retinoico (13-Cis-AR) (Al-Wadei y Schuller. 2006); 5) (Abdelaal *et al.*, 2021); 6) (Li *et al.*, 2015); 7) NE con naringenina (Ng) (Shadab *et al.*, 2020); 8) NE aceite de hojas de *Casearia sylvestris* (Cs) (Pereira *et al.*, 2017) y 9) Inducción de la toxicidad con ATRA (Grace *et al.*, 2020).

Determinación de IC₅₀ de ATRA en células A549. Se analizan los resultados obtenidos en 3 estudios para determinar la IC₅₀ a diferentes concentraciones µM de ATRA variando las condiciones de incubación de placas de confluencia del 90% de crecimiento de la línea celular A549 [(C_{90%})_{A549}] y su relación de tiempo de biorreacción del colorante WST [(T_B)_{WST}]. El estudio 1, [(C_{90%})_{A549}]=72 horas y [(T_B)_{WST}]= 2, 3 y 4 horas y para el estudio 2 y 3, [(C_{90%})_{A549}]=48 horas y [(T_B)_{WST}]=2 horas que se determinaron espectrofotométricamente a 440 nm, ver en la tabla 27.

El estudio 1 utilizó las concentraciones 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0 y 25 µM de ATRA, las cuales fueron concentraciones bajas y no permitieron determinar la inhibición al crecimiento del 50% para dichos límites (Tabla 26), sin embargo, en el estudio 2 se utilizaron concentraciones 25.0, 35.0, 45.0, 50.0, 65.0, 85.0 y 100 µM de ATRA, las cuales se basaron en la información obtenida en otros estudios (Kawakami *et al.*, 2006), solo se modificó el periodo de incubación a 48 horas, (Tabla 27) y el tiempo de reacción con el colorante WST por 2 horas se determinó la inhibición al crecimiento del 50% a la concentración de 65 µM de ATRA y finalmente en el estudio 3 en que solo se modificaron las concentraciones de ATRA del estudio 2 con 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 y 100 µM, se realizaron la prueba 1 y 2 con una IC₅₀ de 57 µM de ATRA (Figura 13a) y 59 µM de ATRA (Figura 13b) respectivamente, obteniendo un promedio de IC₅₀ de 58 µM que es muy cercano al encontrado por Kawakami y colaboradores que es de IC₅₀ 50µM de ATRA (Kawakami *et al.*, 2005), ambos obtenidos por el método MTT modificado al igual que en el presente estudio. Estudios obtenidos de nanopartículas de un copolímero (β-amino ester) con ATRA obtuvieron un IC₅₀ de 0.007 mg/ml de ATRA y un IC₅₀ de 0.005 mg/ml de ATRA libre en una línea celular endotelial de la vena umbilical humana HUVEC (Karimi, *et al.*, 2020).

Tabla 27. Estudios para determinar el IC₅₀ de ATRA en células A549 variando concentraciones de ATRA, condiciones de incubación de líneas celular en la placa y tiempo de reacción colorida.

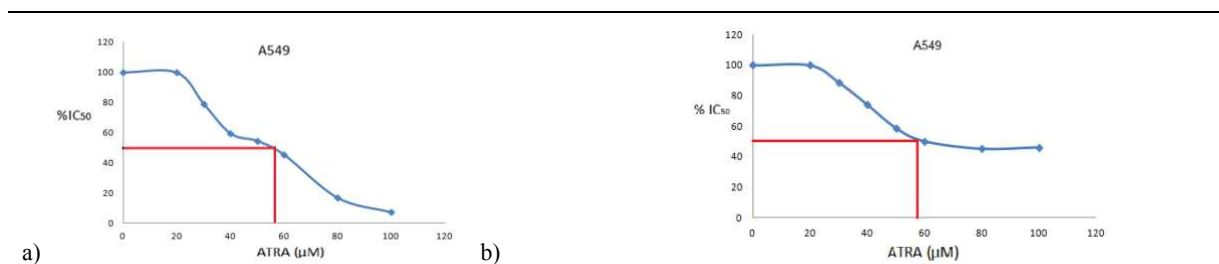
Estudio	Concentración (µM de ATRA)	Condiciones de Incubación (horas)		IC ₅₀ (µM) ATRA
		[(C _{90%}) _{A549}]	[(T _B) _{WST}]	
1	0.01; 0.1; 1.0; 5.0; 10.0 y 25.0	72	2, 3 y 4	-
2	25.0; 35.0; 45.0; 50.0; 65.0; 85.0 y 100.0	48	2	65
3	20.0; 30.0; 40.0; 50.0; 60.0 80.0 y 100.0	48	2	58

Abreviaturas: Condiciones de incubación de placa para 90% de confluencia de A549 [(C_{90%})_{A549}]; de tiempo de bio-reducción del colorante WST [(T_B)_{WST}] determinada espectrofotométricamente a 440 nm; concentración en (µM) ATRA de la inhibición al crecimiento del 50% (IC₅₀).

Determinación de IC₅₀ de la NE en células A549. Se determinó el IC₅₀ del ATRA de las NE_C y NE_V en células A549 se pueden observar en la Figura 13 donde se muestran los gráficos comparativos en porcentaje de inhibición celular contra concentraciones de ATRA en el valor de IC₅₀ µM. La NE_C ha obtenido: a) Las 3 muestras de las NE_C con concentraciones de 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 100.0 µM obtuvieron IC₅₀ de 24 µM, 31 µM y 32 µM de ATRA cuyo promedio IC₅₀ de 28 µM de ATRA, que se muestran en la Figura 13d. Los resultados comparativos IC₅₀ de 58 µM ATRA y 28 µM de la NE_C (Figura 13a y d) muestran que la nanoestructuración permite utilizar 48% menos ATRA para obtener la misma actividad citotóxica en las células A549. Shadab y colaboradores desarrollaron nanoemulsiones con naringenina (Ng) y obtuvieron efectos similares en células A549 al comparar el IC₅₀ de 19.28 µg/mL de la NE-Ng comparada con la Ng sola de 37.63 µg/mL, demostraron que también se reduce un 25% de la cantidad de la naringenina en la NE, sin perder su efectividad biológica (Shadab *et al.* 2020). Otros estudios similares, utilizando un aceite esencial puro a partir de las hojas de *Casearia sylvestris*, obtuvieron un IC₅₀ de 4.0 µg/mL que representa 75% mayor cantidad que al estructurarlo en una NE (5% de aceite, 5% de tensoactivo y 90% de agua) que obtuvo un IC₅₀ 1.0 µg/mL para tener la misma actividad citotóxica (Pereira *et al.*, 2017). Grace y colaboradores también obtuvieron resultados similares a los resultados del presente trabajo en relación con que el liposoma nanoestructurado con lípido polar catiónico DOPAP-colesterol-ATRA en una proporción (5:4:1) fue más eficaz para inducir el 50% de citotoxicidad en comparación con el tratamiento con el ATRA libre que indujo aproximadamente el 25% de muerte en las células A549 a las 48 h (Grace *et al.*, 2020), ver tabla 26b.

El estudio de MTT modificado permitió determinar el IC₅₀ de la NE vacía que partió de la muestra PSR_{Final} para obtener concentraciones de 0.005, 001, 005, 010, 0.05 % determinando el IC₅₀ de 0.028 % de la NE_V que corresponde en una proporción porcentual de 0.0015 % de PS₈₀ y 0.00056 % de AO en una relación % [2.0:5.0:93.0] NE_V. Resultados obtenidos por Geys y colaboradores encontraron un IC₅₀ de 0.03 % de PS₈₀ en células A549, tomando como valor teórico dicha concentración el PS₈₀

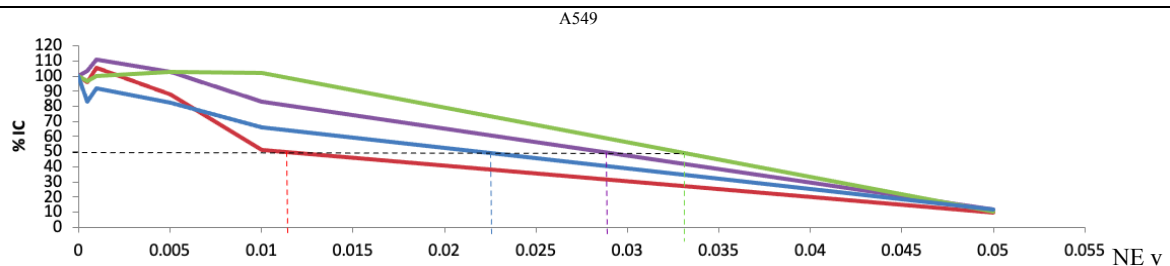
nanovehiculizado requiere una proporción 20 veces menor [$20=0.03\%/0.0015\%$] para obtener la misma citotoxicidad disminuyendo la citotoxicidad que cuando se encuentra libre. Así que la NE_V tiene una IC_{50} de 0.028 % comparado con el IC_{50} 0.030 % de PS_{80} libre en células A549 (Geys *et al.*, 2010), figura 13c. Comparativamente, estudios realizados en fibroblastos de ratón determinaron el IC_{50} de 0.129% de PS_{80} (How *et al.*, 2013). La citotoxicidad de la NE_C en células A549 fue obtenida a partir de concentraciones molares del 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 y 100.0 μM de la NE_C y se determinó que la IC_{50} es de 28.0 μM de la NE_C ver figura 13c. De igual manera, se puede comparar las ventajas de nanoestructurar el ATRA, siendo la principal que le permite aumentar la fotoestabilidad al estar protegido en un nanovehículo utilizando una proporción 2 veces menor [$2.02 = 58.0 \mu M / 28.0 \mu M$] y sin afectar su efecto citotóxico, se muestra en la figura 13a-b y 13d.



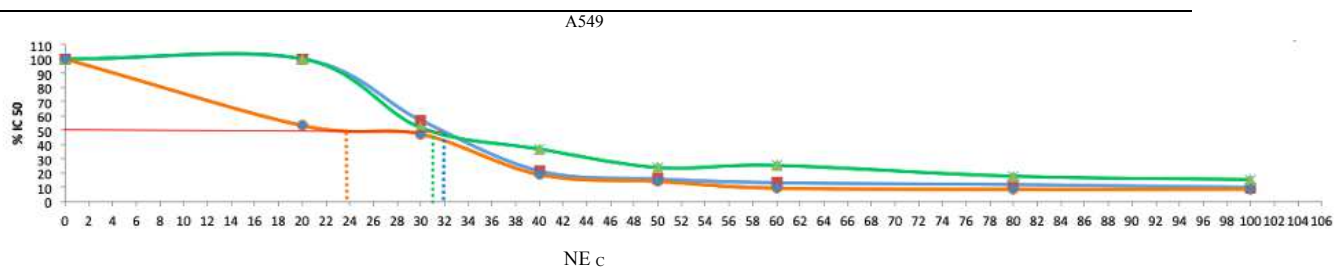
a)

b)

Promedio de pruebas 1 y 2 tiene una IC_{50} de 58 μM de ATRA sin nanoestructurar.



c) La IC_{50} 0.028% de la NE_V del promedio de cuatro determinaciones



d) El IC_{50} es 28.0 μM de la NE_C de tres determinaciones

Figura 13. Gráficos comparativos en porcentaje de inhibición de la proliferación de células A549 contra concentraciones de ATRA en μM y tiempo de tratamiento. En los incisos a) IC_{50} de 57 μM de ATRA en la prueba 1; IC_{50} de 59 μM de ATRA en la prueba 2 y b) prueba 2 con ATRA sin nanoestructurar utilizaron concentraciones de 25.0, 35.0, 45.0, 50.0, 65.0, 85.0 100.0 μM ; c) concentraciones de 0.005, 0.01, 0.05, 0.10, 0.05 % de la NE_V y d) NE_C 20.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 80.0 y 100.0 μM .

Determinación de IC₅₀ de la NE en células NL20. Los efectos del sistema desarrollado a nivel biológico se evaluaron mediante MTT modificado para determinar la citotoxicidad (IC₅₀) de cada componente por separado y de la nanoestructura en la línea celular NL20. Como podemos observar en la figura 28a, la IC₅₀ para AO en células NL20 fue de 1123 μM ; de manera similar, Yin y sus colegas observaron una disminución del 54.3% en la proliferación de una línea celular de neuroblastoma de ratón con AO 1770 μM y el doble del tiempo de incubación (Yin *et al.*, 2005). Otro resultado consistente fue la disminución observada del 30% en la proliferación de la línea celular de tumor hepático HepG2 en una concentración de aproximadamente 1100 μM (Cui *et al.*, 2010) y otro grupo de investigación observó una disminución significativa en la proliferación de las mismas células en concentraciones de AO conjugado con albúmina $\geq 1500 \mu\text{M}$ (Ziamajidi *et al.*, 2013).

La concentración de AO en el suero normal es de aproximadamente $0.05 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, (Liu *et al.*, 2013) pero la concentración aumenta según la dieta ingerida, lo que se ha atribuido a un efecto estimulante sobre las células de cáncer de mama. Sin embargo, estudios *in vitro* han demostrado que el AO exógeno potencia la acción del trastuzumab, promoviendo la apoptosis en una línea celular de cáncer de mama (Menendez *et al.*, 2005). El PS₈₀ se utiliza como solubilizante de fármacos liposolubles contra cáncer, sin embargo, se le atribuyen algunos efectos perjudiciales, principalmente con el uso de etanol como cosolvente (Li *et al.*, 2013). También, se ha observado un aumento de la toxicidad en dosis superiores al 10% (Sun *et al.*, 2014), por lo cual en la formulación desarrollada en este trabajo de investigación se utilizó un 5% de PS₈₀.

Los resultados obtenidos indican que la citotoxicidad del AO se aumento 29 veces la citotoxicidad (1123/37.9) en la nanoestructuración, ver tabla 28b. Guo y sus colegas identificaron un efecto similar, donde el AO exhibió un aumento del 29% en la toxicidad cuando se nanoencapsula en la fase interna formada por un complejo alcaloide (AO:Ly) con licopeno (Ly) (Guo *et al.*, 2012). Estudios con AO a concentraciones de 50 μM a 200 μM encontraron efectos estimuladores celulares de 30 y 45%, respectivamente, en células cancerosas renales (Liu *et al.*, 2013). En otros estudios *in vitro*, los investigadores simularon las concentraciones sanguíneas de AO libre y AO unido a proteínas plasmáticas a través de α -lacto-albúmina (complejo proteico α -LA) en una proporción de AO: α -LA de 10:1 y encontró que 600 μM AO ($170 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostró el 50% del efecto hemolítico de 1000 μM AO ($284 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), que afectó al 100% de las células (Hoque *et al.*, 2013), ver tabla 28a. En otro estudio con fibroblastos, se obtuvo un IC₅₀ de 160 μM con 4 h de tratamiento (Arechabala *et al.*, 1999) y PS₈₀ mostró un IC₅₀ de 380 μM en una línea celular Caco-2 con 72 h de tratamiento.

La citotoxicidad de los componentes de la NE en la línea NL20 se muestran en la tabla 28. El IC₅₀ del AO fue de 1123 (tabla 28a) y 2.6 μM del PS₈₀ (tabla 28c). Los resultados experimentalmente determinaron el IC₅₀ de la NE obtenida con 2.0 de AO y 5% de PS₈₀, que corresponde a una proporción teórica de 37.97 μM de AO y 21.83 μM de PS₈₀ al estar ambos nanoestructurados, dichas comparaciones nos permiten

observar que el AO incrementa y el PS₈₀ reduce la citotoxicidad al formar la NE, como se muestra en la tabla 28b y d.

Tabla 28. Determinación de porcentaje de inhibición celular: a) Comparación del AO libre: NL20 del estudio; Neuroblastoma de ratón, NB-R¹; Tumor hepático HepG2²; Efecto hemolítico³ y AO libre comparado con cuatro líneas celulares; b) NE_C con ATRA del estudio comparado con AO en las nanocápsulas (NC)⁴ y si incremento al nanoestructurarse; c) PS₈₀ libre del estudio comparado con las líneas celulares: NL20; Fibroblastos (Fb)⁵; Caco-2⁵; Vero⁶ y MA 104 (MA)⁶ y d) la NE_C del estudio el PS₈₀ redujo su toxicidad al igual que las otras células.

Línea celular											
a)	IC ₅₀				b) Incremento de citotoxicidad						
	NL20	NBR ¹	HepG2 ²	EH ³	NE _C		NC ⁴				
AO	1123 (μM)	1700 (μM)	1100 (μM)	1000 (μM)	37.97 (μM)	29 veces	29%				
Línea celular											
c)	IC ₅₀					d) Reducción de citotoxicidad					
	NL20	Fb ⁵	Caco ⁵	Vero ⁶	MA ⁶	NE _C		Vero ⁶	MA ⁶		
PS ₈₀	2.6 μM	160 μM	380 μM	249.2 μM	204.3 μM	21.83 μM	7.9 veces	34%	378. μM	19%	249.2 μM

Referencia bibliográficas: (Yin *et al.*, 2005)¹; (Cui *et al.*, 2010)²; (Hoque *et al.*, 2013)³; (Guo *et al.*, 2012)⁴; (Arechabala *et al.*, 1999)⁵ y (Caon *et al.*, 2010)⁶.

Algunos estudios coinciden con nuestros hallazgos en relación con la disminución de la citotoxicidad de la PS₈₀ nanoestructurado. Por ejemplo, Caon y colegas utilizaron células Vero para obtener un IC₅₀ de 249.2 μM para PS₈₀ en ausencia de nanoestructuración y un IC₅₀ de 378.6 μM para PS₈₀ nanoestructurado, lo que representa una reducción del 34% en la citotoxicidad. Además, en las células MA 104, los autores determinaron un IC₅₀ de 204.3 μM para PS₈₀ libre y un IC₅₀ de 249.2 μM para PS₈₀ nanoestructurado, lo que corresponde a una reducción del 19% en la citotoxicidad (Caon *et al.*, 2010). Se informó otro ejemplo de la citotoxicidad reducida del PS₈₀ nanoestructurado en fibroblastos 3T3 utilizando NLC, en los que se observó una IC₅₀ del 0.4% para PS₈₀ al 1% y se observó una IC₅₀ del 0.129% para la misma concentración de PS₈₀ en un tratamiento de 72 h; por lo tanto, cuando PS₈₀ está nanoestructurado, su citotoxicidad disminuye (How *et al.*, 2013). Estos informes respaldan nuestros hallazgos, y muestran que el PS₈₀ no estructurado es más tóxica (IC₅₀ de 2.6 μM) para las células NL20 en comparación con el PS₈₀ nanoestructurado con AO en la PSR_{6c}. La toxicidad de PS₈₀ se redujo 7.9 veces, por lo que se requería más PS₈₀ para que la nueva superficie estuviera cubierta por las moléculas de tensoactivo de la FE, ver tabla 28d.

La toxicidad de PS₈₀ disminuyó 7.9 veces cuando está nanoestructurado con el AO en el método de NE preparado con PSR_{6c}, posiblemente incrementando el área de superficie disponible de la fase interna de modo que una mayor cantidad de PS₈₀ cubra las NE de AO y menos micelas de PS₈₀ libres están presentes

en la fase externa (Petersen *et al.*, 2011). Por lo tanto, la toxicidad se reduce a 21.8 μM cuando se incluye PS_{80} en el método PSR_{6c} . Se observó un efecto similar en las nanopartículas lipídicas sólidas cuando el PS_{80} se encuentra en una concentración de 0.001% en la superficie de las nanopartículas lipídicas sólidas presentó menor toxicidad para las células promielóticas humanas HL60 y en granulocitos humanos que cuando el PS_{80} estaba libre (Muller *et al.*, 1997).

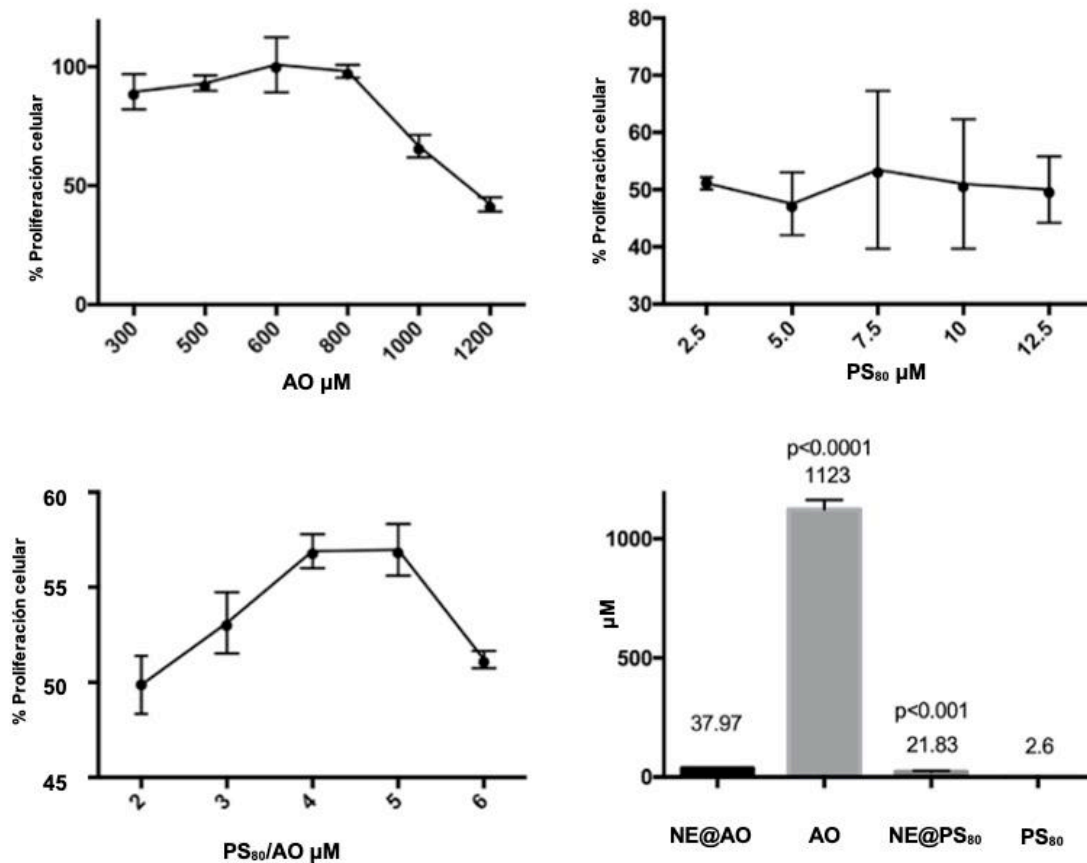


Figura 14. Porcentaje de inhibición de la proliferación de células NL20 por diferentes concentraciones de soluciones de a) Ácido oleico, μM b) PS_{80} en agua y c) NE en medio de cultivo con diferentes radios $\text{PS}_{80} / \text{AO}$ (2 = 20/37; 3 = 40/74; 4 = 60/111; 5 = 80/148 y 6 = 100/185), correspondientes a valores de IC_{50} de 1123 μM de AO, 2.6 μM de PS_{80} y 21.8/37.9 de μM PS_{80}/AO en la NE. d) Análisis estadístico de la IC_{50} de AO y PS_{80} libre y en la NE (promedio \pm SEM, $p < 0.001$; $p < 0.0001$).

Capítulo V. CONCLUSIONES

- Tal cual se estipula en la hipótesis de este trabajo, en esta investigación doctoral se logró desarrollar un método o procedimiento de alta energía, reproducible, para la obtención de NE aceite en agua como NST, empleando sólo tres componentes simples: ácido oleico como fase oleosa, polisorbato 80 como tensoactivo y como fase continua un sistema acuoso puro.

- Para conseguir lo anterior, fueron estudiadas las condiciones de preparación para generar prototipos de NE de baja toxicidad, los cuales de manera completa contenían ATRA, y consiguieron proteger la integridad química del activo, no solo manteniendo su efecto biológico en líneas celulares de cáncer pulmonar, si no mejorándolo en comparación cuando no se encuentra nanoestructurado.

- Los estudios de preformulación con diferentes aceites, tensoactivos y agua permitieron determinar que el 2.0% de ácido oleico y el 5.0% polisorbato 80 con una relación másica de 1.85, fue la formulación más estable y homogénea, debido a que estas dos fases tienen características anfífilas por su similitud estructural, que permitieron obtener NE con un 30% de gotas más pequeñas con la combinación del PS₈₀ y el AO, debido al factor lipofílico de este último, al poseer un log de P ligeramente mayor que el alcohol oleico.

- Las propiedades químicas y fisicoquímicas como factores intrínsecos del sistema de emulsificación determinaron al AO como FI y al PS₈₀ como FS, así como, por otra parte, se estableció que el orden de adición, mantener la temperatura de emulsificación a 15±2°C y la combinar la agitación de baja con alta energía alternando los tiempos de agitación y reposo permiten controlar las variables o factores extrínsecos de la fabricación.

- La muestra PSR_c mantuvo la apariencia homogénea, tamaño monomodal y estabilidad térmica proporcionada por su elevada entalpía promedio de 4788.56 kcal·mol⁻¹ que actuó como barrera térmica de estabilización comparada con las muestras PSR_b y PSR_d, por lo que, se aprobó como muestra final, PSR_{Final}.

- El desarrollo de los NST formulados como NE a diferentes concentraciones y condiciones, permitieron obtener una formulación de tamaño promedio de gota de 71.86 nm e índice de polidispersidad de 0.42, más estable de un año; debido al conocimiento de los factores intrínsecos, así como de los extrínsecos del sistema de emulsificación.

- Los resultados de la inhibición del crecimiento al 50% del ATRA, de las NE con y sin ATRA en líneas celulares de pulmón normal y de cáncer de pulmón permitieron de comprobar los efectos citotóxicos de que estos NST, además que el ATRA al encontrarse solubilizado en la FI oleosa de la

nanoemulsión se protege de una posible degradación, favoreciendo la farmacocinética y reduciendo la biotransformación del hígado y el almacenado en el tejido adiposo del organismo.

- Los estudios de toxicidad de la NE en la línea celular NL20 permitieron determinar que el PS₈₀ es el componente de la NE que resultó más tóxico para este tipo de células. Sin embargo, el IC₅₀ del PS₈₀ disminuyó su toxicidad cuando formaba parte de la NE que al estar libre.

- Comparativamente, la citotoxicidad del AO para las células NL20 fue menor al estar libre que al encontrarse en la NE, aumentando su toxicidad en la NE, dicho resultado se debe, a que el AO se encuentra protegido al estar formando la FI. Sin embargo, el efecto global de la toxicidad disminuye de manera general para el sistema nanoestructurado en la línea celular NL20.

- La comparación del IC₅₀ del ATRA libre y del ATRA nanovehiculizado (NE_{ATRA}), permite afirmar que se requiere de una mayor cantidad de ATRA sin vehiculizar para obtener el mismo efecto citotóxico en las células de cáncer A549, incrementando la toxicidad del ATRA al estar en la NE desarrollada y así mismo, que el efecto citotóxico de observado no puede ser atribuible por sí sólo, a los aditivos utilizados en la NE sin ATRA (NE_v).

- El diseño sistemático para estudiar los factores intrínsecos de la formulación, como la selección de los excipientes y su proporción en concentración, así como los factores extrínsecos de la fabricación permitieron desarrollar NE estables para transportar y proteger la integridad del ATRA, manteniendo o inclusive incrementado su efecto biológico en las líneas celulares de cáncer pulmonar en estudio.

- La principal aportación del presente trabajo consistió en obtener un NST del tipo nanoemulsión aceite en agua que demostró una baja citotoxicidad al obtener el efecto antineoplásico esperado, permitiendo nanovehiculizar ácido retinoico manteniendo su estabilidad y eficacia en términos de actividad citotóxica *in vitro* y su estudio posterior *in vivo* a las dosis estudiadas.

- Finalmente, podemos sustentar que dichos sistemas desarrollados permitirán nanovehiculizar fármacos liposolubles para obtener nuevas formas farmacéuticas que mantengan el efecto farmacológico, además que permitan disminuir la toxicidad en las células sanas, postulándose como candidatos importantes de aplicación en la industria de alimentos y cosméticos.

“La belleza de las nanoemulsiones es que nos permiten contemplar el color rojizo del atardecer y el azul del amanecer en un solo frasco”.

María Luisa de Lourdes Pérez Gonzláz

Capítulo VI. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas de la presente tesis podemos sustentar que la pregunta de investigación al ser respondida abre la pauta para estudiar cuestionamientos futuros en relación con la aplicación de los NST. Partiendo que la principal aportación del presente trabajo consistió en obtener una NE_{O/W} desarrollada protegió la integridad del ATRA demostrando que disminuyó la toxicidad en líneas de células sanas, así como, en células anormales de cáncer pulmonar manteniendo o inclusive incrementando su efecto biológico.

- Las conclusiones enfatizan la aplicabilidad potencial de las NE_{O/W} obtenidas con ATRA para el tratamiento de otros tipos de cáncer, tales como de leucemia y mama los cuales utilizan el ATRA en combinación con otros antineoplásicos. Así como vehiculizar otros fármacos liposolubles que por su naturaleza química son un reto para el farmacia convencional, permitiendo innovar en el desarrollo de formas farmacéuticas, que además de mantener el efecto farmacológico, favorecerán la farmacocinética y farmacodinamia de principios activos poco o insolubles en agua, y con esto ampliando las expectativas de desarrollo de nuevas formas farmacéuticas que la industria requiere actualmente.

- Las NE_{O/W} obtenidas se postulan como candidatos importantes para el desarrollo de NST que transporten sustancias, tales como, nutrientes, antimicrobianos, antioxidantes que puedan ser utilizados en la conservación y prevención de la descomposición prematura de los alimentos, así como, en la calidad y estabilidad de alimentos envasados beneficiando la cadena de distribución entre los consumidores y a la industria alimentaria.

- Las NE_{O/W} como NST obtenidas podrán ser utilizadas para nanovehiculizar activos en nuevos cosméticos aplicados tanto en la cosmética de higiene personal como en la decorativa o colorida. Siendo la primera muy importante, debido que permitirá desarrollar cosméticos de aseo personal que contribuyan para prevenir enfermedades por falta de higiene y la segunda no menos primordial, para conseguir resaltar el color natural de la apariencia sana de la piel normal.

- El desarrollo y actualización de nuevos métodos de conservación y distribución de alimentos, así como disimular cosméticos innovadores tanto en la higiene personal como en la cosmética decorativa para disimular imperfecciones y enmascarar los daños causados por enfermedades cutáneas, proporcionan seguridad económica y psicosocial necesaria para el desarrollo emocional y de adaptación social, ambas desde el mantenimiento y mejoramiento superficial de la piel normal.

Capítulo VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Allah FI, Dawaba HM, Ahmed AM. Development of a microemulsion-based formulation to improve the availability of poorly water-soluble drug. *Drug discoveries & therapeutics*. 2010; 4(4): 257–266.
- Abdelaal MR, Soror SH, Elnagar MR, Haffez, H. Revealing the Potential Application of EC-Synthetic Retinoid Analogues in Anticancer Therapy. *Molecules*. 2021; 26: 506.
- Akita T, Horiguchi M, Ozawa C, Terada H, Yamashita C. The effect of a retinoic acid derivative on cell-growth inhibition in a pulmonary carcinoma cell line. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2016; 39: 308–312.
- Alcoutlabi M, McKenna GB. Effects of confinement on material behaviour at the nanometric size scale. *Journal of Physical: Condensed Matter*. 2005; 17: 461–524.
- Allen TM, Cullis PR. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 2004; 303: 1818-1822.
- Alvarado G, Medina E. Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80. *Rev. Soc. Quím. Perú* [online]. 2019, vol.85, n.2 [citado 2020-08-18], pp.189-205. Disponible en:<http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X2019000200007&lng=es&nr m=iso>. ISSN 1810-634X.
- Alymov MI, Shorshorov MKH. Surface tension of ultrafine particles. *Nanostructured Materials*. 1999; 12(1-4): 365–368.
- Al-Wadei HA, Schuller HM. Cyclic adenosine monophosphate-dependent cell type-specific modulation of mitogenic signaling by retinoids in normal and neoplastic lung cells. *Cancer Detection and Prevention*. 2006; 30(5): 403-11.
- Amani A, York P, De Waard H, Anwar J. Molecular dynamics simulation of a polysorbate 80 micelle in water. *Soft Matter*. 2011;7: 2900.
- Anton N, GAYET P, Benoit JP, Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007; 344(1-2): 44–52.
- Arancibia C, Riquelme N, Zúñiga R, Matiacevich S. Comparing the effectiveness of natural and synthetic emulsifiers on oxidative and physical stability of avocado oil-based nanoemulsiones. *Innovative Food Science & Emerging technologies*. 2017; (44): 159–166.
- Araújo F, Kelmann R, Araujo B, Finatto R, Teixeira H, Koester L. Development and characterization of parenteral nanoemulsions containing thalidomide. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2011; 42: 238–45.

Arechabala B, Couteau C, Rivalland P, Coiffard L, De Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human Fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*. 1999; 19: 163–165.

Arredondo-Ochoa T, García-Almendárez B, Escamilla-García M, Martín-Belloso O, Rossi-Márquez G, Medina-Torres L, Regalado-González C. Physicochemical and Antimicrobial Characterization of Beeswax–Starch Food-Grade Nanoemulsions Incorporating Natural Antimicrobials. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017; 18: 2712.

Arregui de la Cruz FJ, Cabrera RE, Cobacho JR.; Gómez Sellés E.; Soriano Olivares J. (2017). Apuntes de mecánica de fluidos. Valencia: Universitat Politècnica de València.

Arrieta O, González-De La Rosa CH, Aréchaga-Ocampo E, Villanueva-Rodríguez G, Cerón-Lizárraga TL, Martínez-Barrera L, Vázquez-Manríquez ME, Ríos-Trejo M, Álvarez-Avítia M, Hernández-Pedro N, Rojas-Marín C, De la Garza J. Randomized Phase II Trial of all-trans retinoic acid with chemotherapy based on paclitaxel and cisplatin as first-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2010; 20: 3463–3471.

Ashizawa K. Nanosize particle analysis by Dynamic Light Scattering (DLS). *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*. 2019;139 (2): 237-248.

Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*. 2009; (10) 1: 69–76.

Baboota S, Shakeel F, Ahuja A, Ali J, Shafiq S. Design, development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib. *Acta Pharmaceutica*. 2007; 57: 315–332.

Badawi AA, El-Laithy HM, El Qidra RK, El Mofty H, El dally M. Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery. *Archives of Pharmacal Research*. 2008; 31(8): 1040-9.

Bali V, Ali M, Ali J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2010; 76: 410–420.

Bawarski WE, Chidlowsky E, Bharali DJ, Mousa SA. Emerging nanopharmaceuticals. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*. 2008; 4(4): 273–282.

Behrend O, Ax K, Schubert H. Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2000; 7: 77–85.

Binks BP, Clint JH, Fletcher PDI, Rippon S, Lubetkin SD, Mulqueen PJ. Kinetics of swelling of oil-in-water emulsions stabilized by different surfactants. *Langmuir* 1999; 15 (13): 4495–4501.

Borgsthal GE. How to use dynamic light scattering to improve the likelihood of growing macromolecular crystals. *Methods in Molecular Biology*. 2007; 363: 109–29

- Botasini S. Comparación del tamaño de nanopartículas de oro empleando diferentes técnicas y protocolos de medición. *INNOTEC. Revista de Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU)*. 2020: 10–24.
- Briger I, Duvernet C, Couvreur O. Nanoparticle in cancer and diagnosis. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002; 54: 631–651.
- Buller RML. 170 - poxviruses, in: J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal (Eds.), *Infectious diseases*, fourth edition, Elsevier, 2017; 1451–1457.
- Bullón J, Molina J, Ronald Márquez R, Véjar F, Scorzza C, Forgiarini A. Nano-emulsification of triglyceride oils for parenteral use by mean of a low-energy emulsification method. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*. 2007;30(1):1-9.
- Caon T, Zanetti-Ramos BG, Lemos-Senna E, Cramail ECR, Borsali R, Soldi V, Oliveira CM. Evaluation of DNA damage and cytotoxicity of polyurethane-based nano- and microparticles as promising biomaterials for drug delivery systems. *Journal Nanoparticle Res*. 2010; 12: 1655–1665.
- Carvalho PM, Felício MR, Santos NC, Gonçalves S, Domingues MM. Application of Light Scattering Techniques to Nanoparticle Characterization and Development. *Frontiers in Chemistry*. 2018; 6: 237.
- Celis MT, García I. Spectroscopy. Spectroscopy measurements for determination of polymer particle size distribution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008^a; 331(1-2): 91–96.
- Celis MT, García I. Interpretación espectral de dispersiones líquido usando espectroscopia ultravioleta visible (UV-Vis). *Revista Ciencia e Ingeniería*. 2008^b. 29(1): 27–34.
- Chávez NG, Para CI, Luzardo M, Bravo B, Nelson YF. Caracterización de cristales líquidos por microscopía óptica en sistemas tensoactivo polietoxilado-alcano-agua. *Química Nova*. 2013; 36(9): 1343–347.
- Chiesa M, Garg J, Kang YT, Chen G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008; 326: 67–72.
- Choi EJ, Whang YM, Kim SJ, Kim HJ, Kim YH. combinational treatment with retinoic acid derivatives in non-small cell lung carcinoma *in vitro*. *Journal of Korean Medical Science*. 2008; 22: 52-60.
- Chu YY, Hsu YC, Chien YW. Novel Therapeutic Nano-carrier for Enhanced Delivery of Anti-colorectal. *Cancer Drugs*. 2009: 232–243.
- Cui W, Chen SL, Hu KQ. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *American Journal of Translational Research*. 2010; 2(1): 95–104.
- Davis BM, Richens J L, O'shea P. Label-free critical micelle concentration determination of bacterial quorum sensing molecules. *Biophysical Journal*. 2011; 101(1): 245–254.
- Dettler JM, Buscaglia R, Le VH, Lewis EA. DSC deconvolution of the structural complexity of c-MYC P1 promoter G-quadruplexes. *Biophysical Journal*. 2011; 100(6): 1517–1525.

Di Scipio S, Escalona Y, Quijada K. Estudio del mezclado de emulsiones concentradas de aceite en agua aplicando la metodología de superficie de respuesta. *Revista de la Facultad de Ingeniería. UCV*. 2008; 23 (3): 5364.

Douguet D, Etienne T, Gérard G. Quantitative structure-activity relationship studies of *RAR* α , β , γ retinoid agonists. *Quantitative Structure-Activity Relationship*. 2019; 18: 107–123.

Edelman MJ, Smith R, Hausner P. Phase II Trial of the Novel Retinoid, Bexarotene, and Gemcitabine Plus Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23: 5774–5778.

Elzayat A, Adam-Cervera I, Alvarez-Bermúdez O, Muñoz-Espí R. Nanoemulsions for synthesis of biomedical nanocarriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2021:11764 A.

Erdoğan N, Akkin S, Bilensoy E. Nanocapsules for drug delivery: an updated review of the last decade. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2018; 12(4): 252–266.

Espinoza LC, Silva-Abreu M, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Halbaut L, Cañas MA, Calpena AC. Formulation Strategies to Improve Nose-to-Brain Delivery of Donepezil. *Pharmaceutics*. 2019; 11(64): 1–6.

Fainerman VB, Miller R. Simple method to estimate surface tension of mixed surfactant solutions. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2001;105(46): 11432-11438.

Fenske DB y Cullis PR. Liposomal nanomedicines. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2008; 5(1): 25–44.

Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*. 2019; 144(8): 1941–1953.

Ferrer-Viñals D, Álvarez-Brito R, Baeza-Fonte AN. Desarrollo de un sistema de partículas poliméricas nanoestructuradas para la liberación controlada del 5- fluorouracilo. *Revista Cubana de Química*. 2021; 33(2): 301-323.

Fryd MM, Mason TG. Advanced Nanoemulsions. *Annual Review of Physical Chemistry*. 2012; 63(1):493-518.

Forgiarini AM, Pietrangeli G, Arandía M, Guédez V, Celis M. Influencia del tipo de alcohol sobre la formación de nanoemulsiones de aceite de soja-en-agua. *Revista ciencia e ingeniería*. 2009; 30(2):115–120.

Forgiarini AM, Esquena J, González C, Solans C. Formation of nano-emulsion methods at constant temperature. *Lagmuir*. 2001; 17: 2076–2083.

Fukumori Y, Ichikawa H. Nanoparticles for cancer therapy and diagnosis. *Advanced Powder Technology*. 2006; 17(1); 1–28.

Ganta S, Amiji M. Coadministration of paclitaxel and curcumin in nanoemulsion formulations to overcome multidrug resistance in tumor cells. *Molecular Pharmaceutics*. 2009; 6(3): 928–939.

Garidel P, Hoffmann C, Blume A. A thermodynamic analysis of the binding interaction between polysorbate 20 and 80 with human serum albumins and immunoglobulins: a contribution to understand colloidal protein stabilization. *Biophysical Chemistry*. 2009; 143(1-2): 70–8.

Geys J, Nemery B, Hoet PHM. Assay conditions can influence the outcome of cytotoxicity tests of nanomaterials: Better assay characterization is needed to compare studies. *Toxicology in Vitro*. 2010; 24: 620–629.

Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013; 20(1): 338–344.

Goldberg JS, Vargas M, Rosmarin AS, Milowsky MI, Papanicolaou N, Gudas L, Shelton G, Feit Petrylak D, Nanus DM. Phase I trial of interferon alpha2b and liposome-encapsulated all-trans retinoic acid in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer*. 2002; 95 (6): 1220–1227.

Grace VMB, Wilson DD, Guruvayoorappan C, Danisha JP, Bonati L. Liposome nano-formulation with cationic polar lipid DOTAP and cholesterol as a suitable pH-responsive carrier for molecular therapeutic drug (all-trans retinoic acid) delivery to lung cancer cells. *IET Nanobiotechnology*. 2021; 15(4): 380-390.

Granger CL, McDonald CF, Berney S, Chao C, Denehy L. Exercise intervention to improve exercise capacity and health related quality of life for patients with Non-small cell lung cancer: A systematic review. *Lung Cancer*. 2011; 72: 139–153.

Graves SM, Mason TG. Transmission of visible and ultraviolet light through change-stabilized nanoemulsion. *Journal of Physical Chemical Communications*. 2008; (112): 12669–12676.

Graves SM, Mason TG, Wilking J. Structure of concentrated nanoemulsions. *Journal of Chemical Physics*. 2005; 122: 134703-1-134703–6.

Grigoriev DO, Miller R. Mono- and multilayer covered drops as carriers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2009; 14 (1): 48–59.

Guerra-Rosas M. I, Morales-Castro J, Ochoa-Martínez L.A, Salvia-Trujillo L, Martín-Belloso O. Long-term stability of food-grade nanoemulsions from high methoxyl pectin containing essential oils. *Food Hydrocolloids*. 2016; 52: 438–446.

Gutiérrez JM, González C, Maestro A, Solè I, Pey CM, Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2008; 13: 245–251.

Guo YM, Liu X, Sun X, Zhang Q, Gong T, Zhang SR. Mannosylated Lipid Nano-emulsions Loaded with Lycorine-oleic Acid Ionic Complex for Tumor Cell-specific Delivery. *Theranostics*. 2012; 2(11): 1104–1114.

Haider M, Shifaa A, Kamal L, Orive G. Nanostructured Lipid Carriers for Delivery of Chemotherapeutics: A Review. *Pharmaceutics* 2020, 12, 288: 1–26.

Harmon TM y Huang J. Nano-Emulsion Formulations: Nano-emulsion formulations for injection & oral administration. *Drug Development & Delivery*. 2014;14 (8):34-38. Acceso 21-08-2021. In <https://drug-dev.com/nanoemulsion-formulations-nanoemulsion-formulations-for-injection-oral-administration/>

Hoque M, Dave S, Gupta P, Saleemuddin M. Oleic Acid May Be the Key Contributor in the BAMLET-induced erythrocyte hemolysis and tumoricidal action. *Plos One*. 2013; 8(9): e68390.

How CW, Rasedee A, Abbasalipourkabir R. Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80. *IEEE Transactions on NanoBioscience*. 2013; 12(2): 72–78.

How CH, Abdullah R, Abbasalipourkabir R. Physicochemical properties of nanostructured lipid carriers as colloidal carrier system stabilized with polysorbate 20 and polysorbate 80. *African Journal of Biotechnology*. 2011; 10(9):1684–1689.

Hwang TL, Fang CL, Chen CH, Fang JY. Permeation enhancer-containing water-in-oil nanoemulsions as carriers for intravesical cisplatin delivery. *Pharmaceutical Research*. 2009; 26 (10): 2314–2323.

INN- *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2009; (9), Issue 2: 170–175.

Jafari SM, Assadpoora E, Heb Y, Bhandaric B. Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food Hydrocolloids*. 2008; 22: 1191–1202.

Jasmina H, Džana O, Alisa E, Edina V, Ognjenka R. Preparation of nanoemulsions by high-energy and lowenergy emulsification methods. In: Badnjevic A. (eds) CMBEBIH 2017. IFMBE Proceedings, vol 62. Springer.

Jeong YI, Kang MK, Sun HS, Kang SS, Kim HW, Moon KS, Lee KJ, Kim SH, Jung S. All-trans-retinoic acid release from core-shell type nanoparticles of poly(epsilon-caprolactone)/poly(ethyleneglycol)diblockcopolymer. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2004; 273(1-2): 95–107.

Jiménez-Lara AM, Aranda A, Gronemeyer H. Retinoic acid protects human breast cancer cells against etoposide-induced apoptosis by NF-kappaB-dependent but cIAP2-independent mechanisms. *Molecular Cancer*. 2010; 9:1-16.

Jones RAL. *Soft Machines: nanotechnology and life*, by. Ed. Oxford University Press. 2004. 225.

Junyaprasert VB, Teeranachaideekul V, Souto EB, Boonme P, Muller RH. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation. *International Journal of Pharmacology*. 2009; 3(1-2): 207–214.

- Kamkar M, Bazazi P, Kannan A, Chandran Suja V, Hossein Hejaz S, Fuller G, Sundararaj U. Polymeric-nanofluids stabilized emulsions: Interfacial versus bulk rheology. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2020; 576: 252–263.
- Karimi N, Mansouri K, Soleiman-Beigi M, Fattah A. All-trans retinoic acid grafted poly beta-amino ester nanoparticles: A novel anti-angiogenic drug delivery system. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2020; 10(2): 221-232,
- Katagi S, Kimura Y, Adachi S. Continuous preparation of O/W nano-emulsion by the treatment of a coarse emulsion under subcritical water conditions. *LWT - Food Science and Technology*. 2007; 40 (8): 1376–1380.
- Kawada H, Kume T, Matsunaga T, Iwai H, Sano T, Shibayama M. Structure and Rheology of a Self-Standing Nanoemulsion. *Langmuir*. 2009; 26(4): 2430–2437.
- Kawakami S, SUZUKI S, Yamashita F, Hashid M. Induction of apoptosis in A549 human lung cancer cells by *all-trans retinoic acid* incorporated in DOTAP/cholesterol liposomes. *Journal of Control Release*. 2006;110 (3): 514–521.
- Kawakami S, Opanasopit P, Yokoyama M, Chansri N, Yamamoto T, Okano T, Yamashita F. Biodistribution characteristics of all-trans retinoic acid incorporated in liposome and polymeric micelles following intravenous administration. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2005; 94 (12): 2606–2615.
- Kentish S, Wooster TJ, Ashokkumar A, Balachandran S, Mawson R, Simons L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2008; 9(2): 170–175.
- Kerwin BA. Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: Structure and degradation pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 97: 2924–2935.
- Kishore RS, Pappenberger A, Dauphin IB, Ross A, Buergi B, Staempfli A, Mahler HC. Degradation of polysorbates 20 and 80: studies on thermal autoxidation and hydrolysis. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;100(2): 721–31.
- Klang V, Matsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterization and stability assessment. *Micron*. 2012; 43 (2-3): 85–103.
- Kumar M, Sharma G, Singla D, Singh S, Kakkar V, Gulati JS, Kaur IP. enhanced oral absorption of *all-trans* retinoic acid upon encapsulation in solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical Nanotechnology*. 2020; 8(6): 495-510.
- Lambert O, Rigaud J.L. Phage DNA Transfer into liposomes. *Methods in Enzymology*, Academic Press, 2003:465–482.
- Lee J, Jeong D, Seo S, Na K. Biodegradable nanogel based on *all-trans* retinoic acid/pullulan conjugate for anti-cancer drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2013; 43: 63–69.

- Leong TSH, Wooster TJ, Kentish SE, Ashokkumar M. Minimizing oil droplet size using ultrasonic emulsification. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2009; 16(6): 718–720.
- Li B, Gao MH, Chu XM, Teng L, Lv CY, Yang P, Yin QF The synergistic antitumor effects of all-trans retinoic acid and C-phycocyanin on the lung cancer A549 cells *in vitro* and *in vivo* *European Journal of Pharmacology*. 2015; 749: 107–114.
- Li Y, Zhang Z, Yuan Q, Liang H, Vriesekoop F. Process optimization and stability of d-limonene nanoemulsions prepared by catastrophic phase inversion method. *Journal of Food Engineering*. 2013; 119(3): 419–424.
- Liang H, Yang Q, Deng L, Lu J, Chen J. Phospholipid-Tween 80 mixed micelles as an intravenous delivery carrier for paclitaxel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2011; 37(5): 597–605.
- Lim SB, Bee S, Banerjee A. *Med Cutan Iber Lat Am Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana*. Önyüksel, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. *Journal of Controlled Release*. 2012; 63 (1): 34–45.
- Lim SJ, Lee MK, Kim CK. Altered chemical and biological activities of all-trans retinoic acid incorporated in solid lipid nanoparticles powders. *Journal of Control Release*. 2004; 100(1): 53–61.
- Liu Z, Xiao Y, Yuan Y, Zhang X, Qin C, Xie J, Hao Y, Xu T, Wang X. Effects of oleic acid on cell proliferation through an integrin-linked kinase signaling pathway in 786-O renal cell carcinoma cells. *Oncology Letters*. 2013; 5(4):1395–1399.
- López GA, Lezama EM. Nanoemulsiones O/W de aceite esencial de naranja y tween 80. *Revista de la Sociedad Química de Perú*. 2019; 85 (2): 189-205.
- López I, Balderas-Rentería I, Gómez I, González-Santiago O, González-Barranco P, Garza-Ocañas L, Ramírez-Cabrera M. MTT Vs WST-1, efficiency, cost, time, and waste generation: evaluating the silver nanoparticles cytotoxicity. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina*. 2020; 3(1): 3-12.
- Maestro A, Solè I, González C, Solans C, Gutiérrez JM. Influence of the phase behaviour on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2008; (327): 433–439.
- Maibaum L, Dinner AR, Chandler D. Micelle formation and the hydrophobic effect. *Journal of Physical Chemistry B*. 2004; 108(21): 6778–6781.
- Mao L, Duoxia X, Yang J, Yuan F, Gao Y, Zhao J. Effects of small and large molecule emulsifiers on the characteristics of b-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization. *Food Technology and Biotechnology*. 2009; 47 (3): 336–342.
- Marill J, Idres N, Capron CC, Nguyen E, Chabot GG. Retinoic acid metabolism and mechanism of action: a review. *Current Drug Metabolism*. 2003; 4(1): 1–10.
- Mason, TG. Emulsification and the Emergence of Nanoemulsions. *Matter*. 2019; 1(3): 542-546.

Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang CB, Graves SM. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics-Condensed Matter*. 2007; 19(7): R635.

Mason TG, Graves SM, Wilking JN, Lin MY. Effective Structure Factor of Osmotically Deformed Nanoemulsions. *Journal of Physical Chemistry B*. 2006; 110: 22097–22102.

McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012; 8: 1719–1729.

Meleson K, Graves S, Mason TG. Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear. *Soft Matter*. 2004; 2 (2&3): 109–123.

Menard N, Tsapis N, Poirier C, Arnauld T, Moine L, Lefoulon F, Pean JM, Fattal E. Physicochemical characterization and toxicity evaluation of steroid-based surfactants designed for solubilization of poorly soluble drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 44(5): 595–601 C.

Mendoza-Muñoz N, Piñón-Segundo E, Ganem-Quintanar A, Quintanar-Guerrero D. Preparación y evaluación *in Vitro* de nanopartículas poliméricas biodegradables como agente de contraste para ultrasonido. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2007; (10) 14–20.

Méndez RI, Namihira GN, Moreno AL, Sosa MC. Protocolo de investigación: lineamientos para su elaboración y análisis. México. Editorial Trillas. 2 Ed.1990. 230.

Menendez JA, Vellon L, Colomer R, Lupu R. Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erb B-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin TM) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification. *Annals of Oncology*. 2005;16(3): 359–371.

Miers D. Surfactant Science and Technology. Editorial Wiley-Interprice. 4ª Edición. 2020; Cap. 2, 3, 5, 6: 69, 104, 151, 169, 195.

Moreira DMJ, Henrique DSO, Delicato T, Alves DRFP characterization and evaluation of electrolyte influence on canola oil/water nano-emulsion. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2006; 27: 1009–1014.

Muller RH, Ruhl D, Runge S, Schulzeforster K, Mehnert W. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant. *Pharmaceutical Research*. 1997; 14(4): 458–462.

Muñiz-Hernández S, Hernández-Pedro N, Macedo-Pérez O, Arrieta O. alterations in retinoic acid receptors in non-small cell lung cancer and their clinical implications. *Journal of Cancer Therapy*. 2015; 6: 648-664.

Nandan R. Promising results achieved with a combination of chemotherapy and two retinoids in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2006; 51: 387–388.

Nielsen CK, Kjems J, Mygind T, Snabe T, Meyer RL. Effects of Tween 80 on Growth and Biofilm Formation in Laboratory Media. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 7: 1878.

NOM-073. NORMA Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2015. Estabilidad de fármacos y medicamentos, así como de remedios herbolarios. Diario Oficial de la Federación, México.

Ozpolat B, López-Berestein G, Adamson P, Fu CJ, Williams AH. Pharmacokinetics of intravenously administered liposomal *all-trans-retinoic acid* (ATRA) and orally administered ATRA in healthy volunteers. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2003; 6(2): 292–301.

Patil RR, Guhagarkar SA, Devarajan PV. Engineered nanocarriers of doxorubicin: a current update. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*. 2008; 25(1): 1–61.

Pereira FG, Marquete R, Oliveira-Cruz L, Quintanilha-Falcão D, Mansur E, De lima Moreira. D. Cytotoxic effects of the essential oil from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. (Salicaceae) and its nanoemulsion on A549 tumor cell line. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2017; 16(5): 506–512.

Pérez MM, García ME, Armas MK, Álvarez I, Oliva JA, Pérez E. Cáncer de pulmón de células no pequeñas: presentación de caso. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2017;21(2): 258-263.

Pérez-González MLL, González-De la Rosa CH, Pérez-Hernández G, Beltrán HI. Nanostructured oleic acid/polysorbate 80 emulsions with diminished toxicity in NL20 cell line: Insights of potential drug carriers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Journals*. 2019; 187: 110758

Peshkovsky AS, Peshkovsky SL, Bystryak S. Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions. *Chemical Engineering and Processing*. 2013; 69:77–82.

Petersen S, Steiniger F, Fischer D, Fahr A, Bunje H. The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on *in vitro* cell viability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2011; 79(1): 150–161.

Pino-Lagos K, Guo Y, Noelle RJ. Retinoic acid: A key player in immunity. *Biofactors*. 2010; 36(6): 430–436.

Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. **Nanoencapsulation I**. Methods for preparation of drug-loaded polymeric Nanoparticle. Biology and Medicine. Elsevier **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. 2006^a; 2: 8–21.

Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. **Nanoencapsulation II**. Biomedical applications and current status of peptide and protein nanoparticulate delivery systems **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. 2006^b; 2: 53–65.

Quaglia F, Ostacolo L, De Rosa G, La Rotonda MI, Ammendola M, Nese G, Maglio G, Palumbo R, Vauthier C. Nanoscopic core-shell drug carriers made of amphiphilic triblock and star-diblock copolymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 324(1): 56–66.

- Rao SVR, Yajurvedi K, Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs I. Formulation development. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 362 (1-2): 16–19.
- Rege BD, Kao JPY, Polli J. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002; 16(4-5): 237–246.
- Richard S, Larson M, Tallman S. Retinoic acid syndrome: manifestations, pathogenesis, and treatment. *Best Practice & Research Clinical Hematology*. 2003; 16(3): 453–461.
- Rojas-Aguirre Y, Aguado-Castrejón, González-Méndez KI. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la revolución de la terapia contra el cáncer?. *Educación Química*. 2016; 27(4): 286-291.
- Romero-Morelos P, Peralta-Rodríguez R, Mendoza-Rodríguez M, Valdivia A, Marrero-Rodríguez D, Paniagua-García L, Rodríguez J, Parra-Melquiádez M, Salcedo-Vargas M. La nanotecnología en apoyo a la investigación del cáncer. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 2011; 49 (6): 621-630.
- Ryan R. Nanodisks: hydrophobic drug delivery vehicles. *Expert Opinion of Drug Delivery*. 2008; 5(3): 343–351.
- Ruktanonchai U, Bejrapha Y, Sakulku U, Opanasopit P, Bunyaphatsara N, Junyaprasert V, Puttipipatkachorn S. Physicochemical characteristics, cytotoxicity, and antioxidant activity of three. *AAPS: American Association of Pharmaceutical Scientists*. 2009; 10(1): 227–234.
- Sadurni N, Solans C, Azemar N, Garcia-Celma, MJ. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*: 2006; 26: 438–445.
- Sajjad S. Effect of mixing protocol on formation of fine emulsion. *Chemical Engineering*. 2006^a; 61: 3009–3017.
- Sajjadi S. Nanoemulsion Formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. *Langmuir*. 2006^b; 22 (13): 5597–5603.
- Salager S, Tyrode E, Celis M, Salager J. Influence of the stirrer initial position on emulsion morphology. making use of the local water-to-oil ratio concept for formulation engineering purpose. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2001; 40: 4808-4814.
- Salager JL, Antón R, Bullón J, Forgiarini A, Marquez R. How to use the normalized hydrophilic-lipophilic deviation (hldn) concept for the formulation of equilibrated and emulsified surfactant-oil-water systems for cosmetics and pharmaceutical products. *Cosmetics*. 2020; 7(3):57.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, A., Soliva-Fortuny, R. Y Martín-Belloso, O. Physicochemical Characterization of Lemongrass Essential Oil–Alginate Nanoemulsions: Effect of Ultrasound Processing Parameters. *Food and Bioprocess Technology*. 2013; 6 (9): 2439–2446.

Samitier J. Nanomedicina en España: hacia un envejecimiento activo y saludable. XI Conferencia Anual de las plataformas tecnológicas de investigación biomédica. 5 y 6 de marzo de 2018. Acceso: 20 marzo 2019 en <http://www.medicamentos-innovadores.org>.

Sánchez-Ríos CP, Flores SMA, Rodríguez CJR, Martínez BLM, Santillán-DP, Alatorre-AJA. Perfil molecular tumoral del cáncer pulmonar medido por secuenciación de nueva generación. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 2020; 79 (1): 17–25.

Schäffer B, Schäffer B, Lőrinczy D. Decomposition of DSC curves of dairy products with Gaussian functions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2005; 82 (2): 531–535.

Schalbart P, KawajI M, Fumoto K. Formation of tetradecane nanoemulsion by low energy emulsification methods. *International Journal of Refrigeration*. 2010; 33(8): 1612–1624.

Schwartzberg LS, Navari RM. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting. *Advances in Therapy*. 2018;35(6):754-767.

Sercombe L, Veerati T, MoheimanI F, Wu SY, Sood AK, Hua S. Advances and Challenges of Liposome Assisted Drug Delivery. *Frontiers in Pharmacology*.2015; 6: 286: 3-13.

Shadab M, Alhakamy NA, Aldawsari HM, Husain M, Kotta S, Abdullah ST, FAHMY AU, Alfaleh, MA, Asfour HZ. Formulation Design, Statistical Optimization, and In Vitro Evaluation of a Naringenin Nanoemulsion to Enhance Apoptotic Activity in A549 Lung Cancer Cells. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020; (13) 7: 152.

Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A, Khar RK, Ali M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*. 2007^a; 8 (2): E12-E17.

Shafiq S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ahmad FJ, Khar RK, Ali M. Development and bioavailability assessment of ramipril nanoemulsion formulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007^b; 66 (2): 227–243.

Shah P, Bhalodia D, ShelaT P. Nanoemulsion: a pharmaceutical review. *Systematic Review in Pharmacy*. 2010; (1): 24–32.

Shakeel F, Ramadan W, Shafiq S. Solubility and Dissolution improvement of aceclofenac using different nanocarriers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. 2009; (1) 2: 039–043.

Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, Ali J, Aqil M, Shafiq S. Accelerated stability testing of celecoxib nanoemulsion containing *Cremophor-EL*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2008^a; (28): 179–183.

Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, Ali J, Fasai MS, Shafiq S. Stability evaluation of celecoxib nanoemulsion containing Tween 80. *Thai Journal of Pharmaceutical Science*. 2008^b; 32: 4–9.

- Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, Ali J, Aqil M, Shafiq S. Nanoemulsions as vehicles for transdermal delivery of aceclofenac. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*. 2007; 8(4): 191.
- Shimizu. K, Tamagawa K, Takahashi N, Takayama K, Maitani Y. Stability and antitumor effects of all-trans retinoic acid-loaded liposomes contained sterylglucoside mixture. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003; 258(1-2): 45–53.
- Shiraishi K, Yokoyama M. Polymeric micelles possessing polyethyleneglycol as outer shell and their unique behaviors in accelerated blood clearance phenomenon. *Biological and Pharmaceutocal Bulletin*. 2013; 36 (6): 878-882.
- Simoes SI, Tapadas JM, Marques CM, Cruz MEM, Martins MBF, Cevc G. Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 26(3-4): 307–317.
- Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, García MJ. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 2005; 10(3-4): 102–110.
- Solè I, Maestro A, Pey CM, González C, Solans C, Gutiérrez JM. Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006; 288 (1-3):138–143.
- Sonneville-Aubrum O, Simonnet JT, L'alloret F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. *Advances in colloid and interface science*, 2004; (108-109): 145–149.
- Sonoda T, Takata Y, Ueno S, Sato K. Effects of emulsifiers on crystallization behaviour of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. *Cristal Growth & Design*. 2006; 6(1): 306–312.
- Spinelli LS, Mansur CRE, González G, Lucas EF. Evaluation of process conditions and characterization of particle size and stability of oil-in-water nanoemulsions. *Colloid Journal*. 2010; 72 (1): 56–65.
- Srivastava VK, Kini BG, Rout D. Detergency in spontaneously formed emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2006; 304: 214–221.
- Sugumar S, Ghosh V, Nirmala MJ, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: Antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2014; 21(3): 1044–1049.
- Sun R, Zhao G, Ni S, Xia Q. Lipid based nanocarriers with different lipid compositions for topical delivery of resveratrol: Comparative analysis of characteristics and performance. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2014; 24: 591–600.
- Tadros TA. General introduction. In: Emulsion science and technology. Plaza Edición Weinheim. 2006; Capítulo 1: 1–56.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2004; 108-109: 303–318.

Talegaonkar S, Azeem A, Ahmad FJ, Khar RK, Pathan SA, Khan ZI. Microemulsions: A novel approach to enhanced drug delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2008; 2: 238–257.

Talegaonkar S, Rai M. Nanoformulations in Human Health: Challenges and Approaches. Vol 1. ed. 2020. Springer; 2020.

Tang SY, Shridharan P, Sivakumar M. Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions-comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013; 20(1): 485-497.

Taylor P. Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2003; 106: 261–285.

Tekade RK, Dutta T, Tyagi A, Bharti AC, Das BC, Jain NK. Surface-engineered dendrimers for dual drug delivery: A receptor up-regulation and enhanced cancer targeting strategy. *Journal of Drug Targeting*. 2008; 16(10): 758–772.

Thompson, K.L., Derry, M.J. Long-term stability of n-alkane-in-water pickering nanoemulsions: effect of aqueous solubility of droplet phase on ostwald ripening. *Langmuir*. 2018; 34 (31):9289-9297.

Tinoco LMS, Da Silva FLO, Ferreira LAM, Leite EA, Carneiro G. Hyaluronic acid-coated nanoemulsions loaded with a hydrophobic ion pair of all-trans retinoic acid for improving the anticancer activity. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018; 54(4): 17361.

Tsujino I, Yamazaki T, Masutani M, Sawada U, Horie T. Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1999; 43(1): 29–34.

UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura - ética y política de la nanotecnología. Francia. 2007 acceso: 20 de enero 2010, en <http://unesdoc.unesco.org>.

Urbina-Villalba G. El Fenómeno de maduración de Ostwald. Predicciones de las simulaciones de estabilidad de emulsiones sobre la evolución del radio cúbico promedio de una dispersión. *Revista del Centro de Estudios Interdisciplinarios de la Física*. 2014; (3): 2-21.

Vauthier C, Couvreur P. Nanomedicines: A new approach for the treatment of serious diseases. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 2007; 3: 223–234.

Varenne F, Makky A, Gaucher-Delmas M, Violleau F, Vauthier, C. Multimodal Dispersions of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. *Pharmaceutical Research*. 2016; 33(5), 1220–1234.

Villareal CAM. Formulación de una nanoemulsión dermocosmética, nutritiva y regeneradora de la piel. Tesis de maestría. UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE CIENCIAS. Venezuela 2004.

Wriedt, T. The Mie theory. 2012. Springer, 53-71.

- Wooster TJ, Golding M, Sangunasri P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. *Langmuir*. 2008; 24: 12758–12765.
- Wulff M, Torcello A, Gálvez MJ, Martín A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloids*. 2009; 23 (4): 1096–1102.
- Xi J, Chang Q, Chan CK, Meng ZY, Wang GN, Sun JB, Wang YT, Tong HY, Zheng Y. Formulation development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic. *AAPS Pharmaceutical Science and Technology*. 2009; 10(1): 172–18.
- Xu XC. Tumor suppressive activity of retinoic receptor-beta in cancer. *Cancer Letters*. 2007; 253: 14–24.
- Yang SH, Heo D, Park J, Na S, Suh JS, Haam S, Park SW, Huh YM, Yang J. Role of surface charge in cytotoxicity of charged manganese ferrite nanoparticles towards macrophages. *Nanotechnology*. 2012; 23(50): 8.
- Yao W, Wang L, Huang H, Li X, Wang P, Mi K, Cheng J, Liu H, Gu C, Huang L, Huang J. All-trans retinoic acid reduces cancer stem cell-like cell-mediated resistance to gefitinib in NSCLC adenocarcinoma cells. *BMC Cancer*. 2020; 20 (1): 315.
- Yin H, Too HP, Chow GM. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite. *Biomaterials*. 2005; 26: 5818–5826.
- Yordanov G, Skrobanska R, Evangelatov A. Entrapment of epirubicin in poly(butyl cyanoacrylate) colloidal nanospheres by nanoprecipitation: Formulation development and *in vitro* studies on cancer cell lines. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2012; 92:98–105.
- You JO, Liu YC, Peng CA. Efficient gene transfection using chitosan–alginate core-shell nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1(2): 173–180.
- Yuan Y, Gao Y, Zhao J, Mao L. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. *Food Research International*. 2008; 41(1): 61–68.
- Yurgel V, Collares T, Seixas F. Developments in the use of nanocapsules in oncology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2013; 46(6), 486–501.
- Zhang X, Xia Q, Gu N. Preparation of *all-trans* retinoic acid nanosuspensions using a modified precipitation method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2006; 32(7): 857–63.
- Zheng Y. Formulation Development and bioavailability evaluation of a self-nanoemulsified drug delivery system of oleanolic acid. *AAPS PharmSciTech Journal*. 2009; 10(1): 1–315.
- Zhou W, Zhu L. Solubilization of pyrene by anionic-nonionic mixed surfactants. *Journal of Hazardous Materials*. 2004; 109(1-3): 213–20.

Ziamajidi N, KhaghanI S, Hassanzadeh G, Vardasbi S, Ahmadian S, Nowrouzi A, Ghaffari SM, Abdirad A. Amelioration by chicory seed extract of diabetes- and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPARa and SREBP-1. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 58: 198–209.



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Nanostructured oleic acid/polysorbate 80 emulsions with diminished toxicity in NL-20 cell line: Insights of potential drug carriers

María Luisa de Lourdes Pérez-González^a, Claudia Haydée González-de la Rosa^b, Gerardo Pérez-Hernández^b, Hiram Isaac Beltrán^{b,c,*}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM, Ciudad de México, México

^b Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, UAM Cuajimalpa, 05300, Ciudad de México, México

^c Departamento de Ciencias Básicas, DCBI, UAM Azcapotzalco, 02200, Ciudad de México, México



ARTICLE INFO

Keywords:

O/W nanoemulsion
Oleic acid
Polysorbate 80
Dynamic light scattering (DLS)
Differential scanning calorimetry (DSC)
NL-20
Cytotoxicity
Nanocarrier

ABSTRACT

Nanoemulsions (NE) are nowadays required drug nanocarriers. We have selected i) oleic acid (OA) as oil (O), ii) polysorbate 80 (PS₈₀) as surfactant (S), and iii) water (W) in a prototype NE. Our best formulation had O:S ratio [OA]/[PS₈₀] = 0.0708/0.0382 = 1.85 [mol·L⁻¹], implying 1.85 parts of OA covered/stabilized by 1 part of PS₈₀, giving 71.86 nm and 0.42 polydispersity index (PDI) in NE, determined by DLS and TEM. These nano-systems stored at room temperature/darkness stabilized up to 12 months (measured by DLS and TEM) maintaining very similar particle sizes and sometimes decreasing PDI. NE stability was determined by DSC, evidencing reversibility upon heating from 25 to 100 °C, increasing to 125 °C (sealed systems) produced more attenuated heating profiles in second and third cycles, compared with first, indicating partial but enough stability for storage means. NE cytotoxicity tests were conducted on immortalized normal lung epithelial cells (NL-20), as reference. The results show 50 % inhibitory concentrations (IC₅₀(μM)) of 1100, OA, and 2.6, PS₈₀. The IC₅₀ was 20.5, PS₈₀ (PS₈₀@NE) and 37.9, OA (OA@NE) clearly indicating that components changed their toxicities upon nanostructuring, OA exhibited 30-fold increase (IC₅₀(OA) 1100.0→37.9) while PS₈₀, decreased 7.9-fold (IC₅₀(PS₈₀) 2.6→20.5). PS₈₀ is the most toxic component but when is included in PS₈₀@NE, less toxic nanocarriers were generated.

1. Introduction

Nanotechnology involves research, technological development and the application of matter at the nanometer level with emerging properties. In this line, nanomedicine is the area of healthcare in which there is a manipulation of matter at the nanometer scale, generating structures able to successfully deliver drugs in the needed form, at the precise time and desired site of action for an optimum therapeutic purpose. The components of pharmaceutical formulations, the active ingredient and excipients, are variables manipulated to obtain, characterize and assess the nanostructured system and thus uncover their potential. One important and efficient way of nanostructuring formulations is by preparing nanoscale emulsions, also known as nanoemulsions (NE). The NE are liquid dispersions that are insoluble with each other and are stabilized by a surfactant (S) [1,2], which, in particular, have a (sub)nanometric size [3,4]. The research related to NE development has been lately enhanced due to the beneficial effects with

medicinal applications such as improvement of oral, parenteral and transdermal therapies [5], when they are employed as carriers of active ingredients [6]. Also minimizing dangerous side effects such as nephrotoxicity [7], since these nanosystems are well known to enhance bioavailability, as well as pharmacokinetic and pharmacodynamic features [8,9]. Even the Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect in NE has been observed, this because as ensembles they aid in the improvement of bioavailability and cell penetration of poorly aqueous soluble drugs, along with passive targeting. Macroscopically, NE have a characteristic bluish-red color (transmitted-refracted light), due to the effect of light scattering (Rayleigh effect) that is a function of having nanometer particle sizes in the system [10]. The design of NE allows researchers to select the components, as intrinsic factors (IF) [11], to obtain the needed energy barrier to stabilize the system (with the desired sizes and physicochemical characteristics) during prolonged storage periods before their eventual use [12]. This also avoids Ostwald ripening [13], reducing the solubility of the oil phase (O) in the

* Corresponding author at: Departamento de Ciencias Naturales, DCNI, UAM Cuajimalpa, 05300, and Departamento de Ciencias Básicas, DCBI, UAM Azcapotzalco, 02200, Ciudad de México, México.

E-mail address: hirc@azc.uam.mx (H.I. Beltrán).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110758>

Received 1 April 2019; Received in revised form 4 December 2019; Accepted 23 December 2019

Available online 30 December 2019

0927-7765/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

aqueous phase (W) to promote stability of the system [14]. Both the S and the internal phase, O or W, must have good fluidity [15] by decreasing the surface tension, favoring rupture, and avoiding the fusion of new W or O droplets formed during stirring. A key design feature is the system interface, which is a thin heterogeneous region separating the dispersed phases W or O, and this region is stabilized employing particular chemical structures, such as S [16], being W/S/O or O/S/W systems. The S must rapidly and efficiently coat the internal phase (O) droplets to reach the stabilization well, as explained by the Gibbs-Marangoni effect [17], increasing mass transfer of internal phase to the interface, leading to the formation of a film between the phases, stabilizing the emulsion [18]. At this point, repulsive forces become higher, jointly particle sizes are reduced, allowing the inclusion of more S moieties. Additionally, extrinsic factors (EF) are all external mechanisms that affect manufacturing of NE, such as the process of size reduction in internal phase mixing [19], mixing and addition order of components [20,21], stirring and droplet remain time in the dispersion [22], stirring type/shear energy [23] and the cooling rate, which reduces the possibility of particle melting [24].

Development of NE is important as they may be employed as a means of transport *in vivo*. The NE offer some advantages to the transported drug over conventional methods of transport, one of which is to overcome the biological barriers and defenses in the body, due to both the size and the NE solubility in biological fluids [2]. For example, by obtaining NE with sizes of less than 100 nm, phagocytosis in the liver can be avoided [25]. Additionally, allergic reactions are avoided when highly hydrophobic NE are obtained [26], and these NE, together with a high surface load, favor permeability in blood vessels and facilitate drug transport across cell membranes.

With a double bond in the *cis* configuration in the middle of the 18-carbon chain, oleic acid (OA) displays a very inefficient packaging effect in bulk solution, and, therefore, in its pure form, OA is not too much viscous, nor dense, instead it is very fluid, even at room temperature. These structural properties result in a very high fluidity, generating liquid droplets that would function as cores in nanosystems. Based on the physicochemical features of OA, polysorbate 80 (PS₈₀) which is an OA derivative, was selected as the perfect complementary S to achieve the NE structure.

In particular, PS₈₀ was used as a phase transfer agent (a certain type of S) to allow active antitumor substances to cross normal cell membranes with pores smaller than 4 nm [27] and highly vascularized neoplastic systems [28] with pores between 200 nm and 1.2 μm or 200–700 nm [27]. Subsequently, PS₈₀ has been replaced because it was found that the release of OA from PS₈₀ favors competition with the drug for binding sites of plasma proteins, increasing the rate of drug elimination and affecting its efficacy [29]. For these reasons, research of NE as active drug transport systems in cancer and the underlying principles has increased [30] to optimize the pharmacological effects due to: NE selectivity for the target tissues; increased bioavailability; decreased side effects of the active components; reduced doses; the incremental pharmacological effects and the possibility of reducing the toxicity of the components by nanostructuring.

Therefore, the purposes of this study are to select the appropriate O:S:W concentrations, develop and characterize a NE system, with OA as the O component and PS₈₀ as the S component, both with very similar chemical structures achieving compatibility and stability for this means [31]. This NE confers a lower cytotoxicity than cationic surfactants [32], a low CMC_{PS80} ratio ($1.2 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $14 \mu\text{g mL}^{-1}$), and a high HLB of 15 due to PS₈₀, which favors self-assembly and stability during storage [33]. Finally, the NE would serve as potential biological transport vehicles for active agents that could be safer, more stable, and thus more effective and, as proposed in this work, reducing the toxicity of the components upon the nanostructuring of the carrying system.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Oleic acid (OA) with 90 % purity (Sigma-Aldrich) (Sigma-Aldrich) was used as the oil phase (O) in the formulations. Polysorbate 80* (PS₈₀, Polyoxyethylenesorbitan monooleate (80) (Croda)) was used as the surfactant (S), and ethyl alcohol (Merck) was used as the OA solvent to determine cytotoxicity.

2.2. Development of the nanoemulsions (NE)

2.2.1. Components ratio in NE

The experimental design was based on the factorial method of Box and Hunter [34] and had three initial independent variables, O:S:W. The proportion of S was maintained at 5 % to simplify the degrees of freedom of the system because of the high kinetic stability with insoluble oil phases [35], also due to safety reasons, since increased toxicity has been observed at doses greater than 10 % [36]. In this way, the system was simplified to a single variable, O, using only three percentage variations: the high proportion of 2.5 % oil phase (O) (1.0:2.0 O:S), the average proportion of 2.0 % (1.0:2.5 O:S) and the low proportion 1.5 % (1.0:3.3 O:S).

2.2.2. NE preparation methods

2.2.2.1. Mixing (M1) method: Mechanical mixing (magnetic stirring) for 30 min. A 5 % amount of S was added completely to W phase at emulsification temperature ($T_{\text{emulsify}} = 15 \pm 5^\circ\text{C}$), without cooling for all trials, a) O of 1.5 % was added to this formulation, finishing thus with an O:S ratio of 1.5:5.0; b) O of 2.0 % was added to this formulation, finishing with O:S ratio of 2.0:5.0; and c) O of 2.5 % was added to this formulation, finishing with O:S ratio of 2.5:5.0. The rest to achieve 100 % for each formulation was completed with water (W).

2.2.2.2. Premixing, sonication (PS2) method: Mechanical premixing with ultrasonic homogenization. A 5 % amount of S was added completely to W phase, at $T_{\text{emulsify}} = 20 \pm 5^\circ\text{C}$, without cooling, a) O of 1.5 % was added to this formulation, finishing thus with an O:S ratio of 1.5:5.0; b) O of 2.0 % was added to this formulation, finishing with O:S ratio of 2.0:5.0; and c) O of 2.5 % was added to this formulation, finishing with O:S ratio of 2.5:5.0. The rest to achieve 100 % for each formulation was completed with water (W). After mechanical mixing as previously described, the mixture was stirred for 15 min using a 20-kHz Omni Ruptor 250 Ultrasonic Homogenizer, from Omni International Inc., operating at fixed 250 W, using a solid titanium tip of 9.5 mm.

Based on Method PS2, it was determined that an O:S ratio of 2.5:5.0 produced stable systems.

2.2.2.3. Premixing, sonication, rest (PSR) method: This technique was developed in the present study to prepare O/W-type NE using an ultrasonic cavitation processor operating at higher frequencies and tunable parameters in comparison with those stated in method PS2. The technique consisted of premixing a base 100 ratio (O:S:W) for a time (t) = 30 min. Later, the mixture was stirred with an acoustic amplitude (ζ) of 40 % for 15 min in periods of 2.5 min of stirring and 2.5 min of rest using a 20-kHz Vibracel processor, 750 W Sonics, a tip diameter of 13 mm, and a temperature set to $15 \pm 2^\circ\text{C}$.

This technique was used for all the methods described below, in which the variations were the concentrations of the initial O:S:W components in the formulation, the time and type of agitation (pre-mixing and sonication), the order of addition of the components to aqueous or oil phases respectively, the emulsification temperature, and the cooling rate (fast with an ice bath, or slow, let it cool to room temperature). The variations in the conditions are summarized in

Table 1

Experimental design to obtain O/W-type NE and their effects on the particle size (D [nm]) and polydispersity (% PD or PDI).

Method	Addition of S	T / ΔT [°C]	[O]:[S]	Particle size					
				t ₀	D (nm) [% PD/PDI]	t ₁	D (nm) [% PD/PDI]	t ₁₂	D (nm) [% PD/PDI]
M1a	W	15 ± 2	1.5:5.0	194.6/21.8 [15.5/33.8]		120.0 [29]		— [—]	
M1b			2.0:5.0	220/21.2 [18.8/40.5]		113.6 [28.4]		— [—]	
M1c			2.5:5.0	200/20.0 [17.2/40.1]		103.2 [25.8]		— [—]	
PS2a	W	20 ± 2	1.5:5.0	74.6/10.1 [15.8/39.9]		53.4 [26.7]		52.2 [0.2]	
PS2b			2.0:5.0	90/9.7 [20/53.5]		76.2 [38.1]		42.0 [0.31]	
PS2c			2.5:5.0	73.2/9.2 [13.6/29.4]		63.6 [31.8]		95.0 [0.29]	
PSR3	O	20 ± 2	2.5:5.0	60.3 [0.64]		— [—]		63.0 [0.27]	
PSR4a	W	70 a 25 _{slow}	2.5:5.0	124.0 [0.29]		— [—]		88.7 [0.76]	
PSR4b		70 a 25 _{quick}	2.5:5.0	138.8 [0.71]		— [—]		88.8 [0.50]	
PSR5a	O	70 a 25 _{slow}	2.5:5.0	119.0 [0.26]		— [—]		104.6 [0.89]	
PSR5b		70 a 25 _{quick}	2.5:5.0	119.7 [0.31]		— [—]		86.4 [0.49]	

For obtained systems by methods **M1**, **PS2** and **PSR3-5**, particle sizes were determined at the beginning, t₀, after one month, t₁, or after twelve months, t₁₂, of storage at room temperature in the absence of light. All trials resulted in multimodal emulsions.

Particle size measurements in methods **M1** and **PS2** were determined in DynaPro99 and for **PSR3-5** in Zetasizer NanoDS instruments.

Table 1 conjointly with **M1** and **PS2** methods. The **PSR** variations are described below:

2.2.2.4. Method PSR3: Mechanical premixing with ultrasonic homogenization. **S** was added to **O** at T_{emulsify} = 15 ± 2 °C, without cooling, with an **O:S** ratio of 2.5:5.0.

2.2.2.5. Method PSR4: Mechanical premixing with ultrasonic homogenization. **S** was added to **W** at T_{emulsify} = 70 ± 2 °C, with an **O:S** ratio of 2.5:5.0, cooling to T = 25 °C, **a)** slow; **b)** fast.

2.2.2.6. Method PSR5: Mechanical premixing with ultrasonic homogenization. **S** was added to **O** at T_{emulsify} = 70 ± 2 °C, with an **O:S** ratio of 2.5:5.0, cooling to T = 25 °C, **a)** slow; **b)** fast.

2.2.2.7. Method PSR6: Mechanical premixing with ultrasonic homogenization. Modifications in the order of addition of the aqueous phase **a)** **S** and **O** in 50 % **W** with mechanical premixing for 10 min. Subsequently, 100 % of the **W** was completed and agitation was continued for 30 min. Comparatively with the addition of **S** and **O** to the 100 % **W** with mechanical premixing and T_{emulsify} = 15 ± 2 °C in **O:S** variations of **b)** 1.5:5.0; **c)** 2.0:5.0; and **d)** 2.5:5.0.

2.2.2.8. Method PSRF: Repetition of the best method determined by the experimental evidences, in this case **PSR6c**.

2.3. NE characterization

2.3.1. Aspect

The initial selection criterion for the characterization of the prepared systems was a visual observation, and those systems that were translucent with the litmus effect but in this case is due by the Rayleigh scattering effect, and these systems were accepted and those systems that showed high turbidity were discarded. It is well known that the litmus effect is mostly applied to acid-base titrations showing reddish-blueish coloring changes, and a similar fashion occurs when particles are in such a size that they develop the Rayleigh scattering also with

this characteristic reddish-blueish coloring due to nanometric size matter. Another important characteristic is that the preselected systems that showed translucency were centrifuged for 30 min at 10,000 rpm, and those samples that did not show visible separation were ultimately characterized.

2.3.2. Particle size determination

The particle size of the systems that did not separate by centrifugation was determined, first with dynamic light scattering (DLS) using a DynaPro 99 (ProteinSolutions), obtaining diameters (D) in nanometers and the polydispersity index (PDI). In addition, the D and PDI were determined directly with a Zetasizer NanoDS (Malvern). The equipment is capable of measuring particle size in the 0.6 nm–6 μm range in backscatter mode with DTS-Nano software version 1.41. Moreover, for the best formulation **PR6c/PSRF** the sizing and morphology of the nanoemulsions were obtained by transmission electron microscopy (TEM) using microscope model 1010 JEOL with an acceleration voltage of 60 kv. The nanoemulsion samples were prepared for microscopic means by negative-staining techniques, since they normally appear as light droplets against a darker background, and the images were acquired using an Epson Perfection V700 photo, Dual Lens System.

2.3.3. Differential scanning calorimetry (DSC) and deconvolution technique

The stability of these NE was determined by DSC to study the thermal behavior of the dispersed systems utilizing a VP-DSC (MicroCal™) microcalorimeter, with a sample volume of 0.5 μL per run, a thermal interval from 20 to 120 °C, and a scan rate of 1 °C min⁻¹. All the data analyses were performed using Origin software, which allowed to determine the temperatures and enthalpies based on the obtained thermograms. The analyses were performed through the obtained thermograms that represent three heating-cooling cycles, and the experiments were performed in triplicate. The enthalpies are expressed in Kcal·mol⁻¹ of each sample after subtracting their baseline. Deconvolution of obtained thermograms was developed through a decomposition technique into the needed Gaussian curves to describe experimental envelopes in a very similar fashion to the method of

Schäffer³⁷. Thermograms normalized by the bulk mol components of the system were baseline corrected to minimize the complexity of the solution. The deconvolution thus could be performed for each of the analyzed samples i) fitting the individual Gaussian functions, ii) correction of the parameters of separate Gaussian functions, iii) all the latter to achieve the best fitting among calculated and experimental calorimetric envelopes through an iterative procedure in Origin Software. Some envelopes could be fitted through the employment of 5, 6 or even 7 Gaussian functions according to the proximity of calculated envelope to the experimental one as main criteria of deconvolution. In all tested cases experiments employing 3–10 Gaussian functions and iterative procedure were carried on, only correlating in the obtained results that would be explained in the current section.

2.4. Cell culture

NL-20 cells (ATCC, CRL-2503), an immortalized, non-tumorigenic human bronchial epithelial cell line, were routinely grown in Ham's F12 medium (Invitrogen, 21700-026) supplemented with 4 % fetal bovine serum, 1 % mammary epithelial growth supplement (Invitrogen S0155) at 37 °C in a fully humidified incubator with a 5 % CO₂ atmosphere.

2.5. Determination of IC₅₀ values

The MTT method [38] was used to evaluate cell viability, with minor modifications, using the WST-1 reagent (Roche, N° 11 644 807 001). 1 × 10⁴ NL-20 cells were seeded in 96-well tissue culture plates. After a 24-h incubation period, the medium was removed from each well, replenished with fresh serum-free medium containing different concentrations of OA (300, 500, 600, 800, 1000 and 1200 μM), PS₈₀ (2.5, 5.0, 7.5, 10.0 and 12.5 μM), and NE with the PS₈₀/OA proportions determined according to the formulation (20/37, 40/74, 60/111, 80/148 and 100/185) and incubated for 48 h. For the IC₅₀ determinations, the OA and PS₈₀ stocks were generated in alcohol and in water, respectively, before each experiment, both at a concentration of 10 mM. The initial concentration of the NE sample was 100 μM, taking into account the amount of PS₈₀ in the formulation and the dilution in culture medium. The final concentration of ethanol did not exceed 0.01 % of the culture medium. At the end of treatment, the WST-1 reagent was added directly to the medium, and after 2 h, the generation of the chromophore by the reaction was determined at 450 nm on an ELx800 plate reader (Bio Tek).

2.6. Statistical analysis

All the cell-based experiments were repeated at least three times. Statistically significant differences among the data were determined by analysis of variance using GraphPad Prism 5.0 software. P < 0.05 was considered statistically significant. The values are presented as the means ± SEM.

3. Results and discussion

3.1. Intrinsic factors: selection of the components used to obtain NE

The chemical nature, concentration, partition coefficient, order of addition of the components, as well as the emulsification and cooling temperatures are very important factors to achieve the nanometer sizes required in a NE-type transport system [39,40]. The minimum required components for NE production are the O, S and W. For an emulsion or NE to be stabilized, it is necessary to properly select the O:S:W components, their proportions in the system, as well as the preparation conditions to achieve required sizes. Based on the precedent in the literature [27–33], in this study: i) OA was selected as a candidate to form the O of the NE, ii) PS₈₀ was used as an S agent, due to its

molecular similarity and compatibility with OA, and iii) water (W) was used to form the continuum phase. Formulations with high concentrations of nonionic S, greater than its critical micelle concentration (CMC), can ensure a reserve of S micelles in the external phase, increasing the stability of the system due to dynamic equilibrium providing S moieties when needed [41]. However, the S may have a toxic effect because higher concentrations could increase the fluidity of the cellular lipid bilayer by changing the polarity of the membrane [42]. Therefore, a key design is the precise amount of S in order to stabilize the system but the less of it in order to avoid toxicity. The chemical structure and the molecular weight of the polymeric surfactant are important factors that must be considered when determining a molar ratio of S:O, such that the amount of required surfactant is determined experimentally to cover the particles of the newly formed oil phase droplets in an effective manner. The chemical structure of the components affects the solubility of the surfactant agent in the system phase relative to the solubility required to form micelles or the CMC. Aqueous solutions of PS₈₀ were prepared using CMC threshold (0.0015 g·mL⁻¹) [43], with concentrations increasing from 0.01 to 0.07 g·mL⁻¹, which correspond to 6.67·CMC_{PS80} to 46.67·CMC_{PS80}, respectively. Because the particle size decreases proportionally from 8.8 nm as the concentration increases from 0.01 to 0.06 g·mL⁻¹ but does not decrease further from 0.06 and up to 0.07 g·mL⁻¹, the particle size was uniformly stabilized reaching 8.3–8.8 nm (preliminary results not shown), such that smaller micellar agglomerates were formed at the expense of the presence of a large number of particles in the system as has been seen in related findings [33]. Similar studies with 0.002 g·mL⁻¹ of PS₈₀ (1.33·CMC_{PS80}) presented assemblies of 15.0 nm [44], with 0.005 g·mL⁻¹ PS₈₀ (3.33·CMC_{PS80}) presented assemblies of 10.1 nm [45], and with 0.012 g·mL⁻¹ PS₈₀ (8·CMC_{PS80}) the assemblies formed were 10.0 nm [46]. These trends indicate that at these intervals, much like those used in this study, there are equilibria that generate a greater number of particles in the system at higher concentrations, necessarily reducing the size of the assembly, as was determined in the present work.

The HLB, log P and CMC of each component, and interaction between them, are important to design systems able to stabilize. Therefore, in this way, the theoretical numerical value of HLB_{OA} = 1 and the HLB_{PS80} = 15.0 serve as parameters to indicate lipophilicity and hydrophilicity, respectively, which determine the affinities for some of the phases [31]. The log P_{OA} is 7.7 and the log P_{PS80} is 4.69, indicating that the OA was relatively more lipophilic and thus it would be structured in the internal phase. Whereas PS₈₀ is more hydrophilic and would be structured at the oil-water interface. The CMC_{OA} is 0.006 mM and the CMC_{PS80} is 0.012 mM, indicating that the OA tends to form micelles at half the concentration at which PS₈₀ forms them. Therefore, OA would nucleate first in the presence of water, becoming the core of the NE [33].

The experimental design was built on the minimal version of the multifactorial method of Box and Hunter [34]. The proportion of S was held constant at 5 % mainly by three considerations, less toxicity than other PS surfactants [47], proportions that were employed by other authors when PS₈₀ was used as the S to obtain O/W NE [1,35,48–50] and in order to simplify the experimental procedure taking into account that the variable should be the OA concentration.

A small comparative analysis was performed in order to notice O:S proportions employed to obtain O/W NE when PS₈₀ was used as the S in the formulation.

- Case 1: O:S (O, basil oil, S, PS₈₀) ratios of 1:4 (v/v) stabilized oil in the O/W NE at 29.3 nm [48].
- Case 2: The use of D-limonene (O) and PS₈₀ (S) in 1:1.5 O:S, at 4 % (w/w) of S and high pressure mechanical homogenization at 1300 rpm for 6 h, generated W/O → O/W 40.1–107.8 nm nano-emulsions lasting 12 days at 28 °C [35].
- Case 3: NE sizing 150 nm were ultrasonically produced using 15 %

(w/w) sunflower oil (O) and 9.7 % mixture of 5.3 % PS₈₀ and 4.4 % Span 80 (S), 1:1.5 O:S ratio [1].

- Case 4: NE ranging from 75 to 85 nm were obtained with a 1:1 O:S ratio, with 10 % soybean oil (O) and a 10 % (w/w) mixture of 8 % PS₈₀ and 2 % of Span 80 (S), taking into account HLB and sonication factors for different sizing [49].
- Case 5: NE of 3.8 nm were developed using a 1:1 O:S ratio with 16.7 % (w/w) eucalyptus oil (O) and 16.7 % PS₈₀ (S) stable for 3 months [50].

Thus, by maintaining S at values ca. 5 % should be enough to cover oil drops, and in this line the system could be simplified to a single variable of O using only three percentage variations, the high proportion of 2.5 % (w/w) O (1:2 O:S), the average proportion of 2.0 % (1:2.5 O:S) and the low proportion of O at 1.5 % (1:3.3 O:S). This design was aimed in order to find small particle sizes in the systems, it was also considered a little bit high proportion of S in order to achieve long lasting stability.

3.2. Extrinsic factors: selection of the conditions used to obtain NE

Based on the above conditions, variations in the extrinsic factors were implemented, such as the time and type of mixing, the order of dissolution of S in the O or W phases, and the emulsification temperature, to evaluate the ability of the intrinsic properties to preserve/diminish the particle size and develop emulsion stability, which are summarized in Tables 1 & 2. Both low and high energy mixing are based on the premise that the entropy of mixing can lead to a chemical potential that initially opposes Ostwald ripening [40]. This feature, coupled with the incorporation of oil into micelles of nonionic surfactants in the continuous aqueous phase, generates emulsion droplets as well as surfactant micelles that lack O in the core. This mixture of emulsion droplets and surfactant micelles particles in the system is finally what generates a special stabilization because it has been experimentally determined that the transport of oil from emulsion droplets and NE particles is a near zero or even zero (due to chemical potential) energy-barrier process to finally obtain NE particles of an average size in which all assemblies contain oil [51]. Because the total free energy required to create NE is positive, a high external energy should be applied because the process is not spontaneous, allowing the S to minimize the free energy required, reducing the surface tension at the oil-water interface [40].

For the NE systems obtained by M1, PS2 and PSR3-5 methods, Table 1, macroscopic separation was observed in some of them, and therefore were modified from M1, to PS2, until PSR-5 to achieve the stability and particle size diminishment. Therefore they were characterized by particle size using optical techniques by indirectly

determining the light refraction of these particles with DLS [52] and between measurements they were aged and stored at room temperature in the absence of light. The particle sizes for systems obtained using methods M1 and PS2 were determined at the beginning, t₀, and at the end of the initial storage period of one month (t₁). Particle sizes of systems obtained using methods PSR3-5, because of experimental findings as will be seen forthcoming, were determined at the beginning (instantaneous), t₀, and after twelve months, t₁₂, mainly due to stability enhancement. The samples produced using method M1a-c with mechanical mixing (magnetic stirring) for 30 min (t₀) presented bimodal particle sizes of 194.6/21.8, 220/21.2 and 200/20.0. These samples evolved to smaller sizes, ranging 120.0 (M1a), 113.6 (M1b) and 103.0 (M1c) nm at one month of storage (t₁). And these sizes were larger than the sizes of the samples produced using method PS2a-c, which used mechanical premixing (30 min) and followed by ultrasonic homogenization during 15 min generating also bimodal nanosystems of 74.6/10.1 (PS2a), 90/9.7 (PS2b) and 73.2/9.2 (PS2c) nm. The sizes of the latter samples were decreased by ca. 50%–53.4, 76.2 and 63.6 nm, with O:S ratios for 2.5 % O (2.5: 5.0) = 0.5, 2.0 % O (2.0: 5.0) = 0.4, and 1.5 % O (1.5: 5.0) = 0.3, respectively after one month of storage (t₁), and finally they were even smaller with twelve months of storage ranging sizes (nm) of 52.2 (PS2a), 42 (PS2b) and an exception of size enhancement to 95 for PS2c at t₁₂. A similar effect was obtained by Tang et al., who determined an effect of particle size and PDI reduction on NE with 30 min. of premixing [53].

The difference between premixing of the first formulation, M1a-c, and mechanical mixing of the second formulation, PS2, prior to cavitation with the ultrasonicator for O/W-type NE [49], and setting the emulsification temperature to 20 ± 2 °C, instantaneously (t₀) favors the reduction of particle size in bimodal populations (Table 1). Subsequently, in samples obtained by M1 method, a physical separation was observed after twelve months of storage, with an increase in particle size in the NE and thus discarded. The DLS analysis has shown that the samples initially presented bimodal behavior, later on, with the aging effect (30 days of storage at room temperature), both systems restructured to be monomodal and thus with small PDI, but prevailing the smaller size in the PS2 method due to mechanical premixing followed by sonication, see Table 1. The PSR methods are the variation of PS2 in which small intervals of rest (stabilization) time were introduced between sonication periods. The effect in the addition order variations was evaluated among PSR3-5. For PSR3, PS₈₀ was added to O at room temperature. For PSR4, PS₈₀ was added to W at 70 °C with a) slow and b) quick cooling; for PSR5, PS₈₀ was added to O at 70 °C with a) slow and b) quick cooling.

The addition order changed along these methods, since in PS2, PS₈₀ is included in W, comparatively with method PSR3, where PS₈₀ is included in O, the effect of this variation could be seen by comparing the

Table 2

Experimental design to obtain O/W-type NE and their effects on the particle size (D [nm]) and polydispersity (% PD or PDI).

Method	Addition of S	T / ΔT [°C]	[O]:[S]	Particle size		
				P ₁	P ₂	P ₃
PSR6a	O:W _{50%}	15 ± 2	2.0:5.0	D (nm)	D (nm)	D (nm)
				[0.68]	[0.43]	[---]
PSR6b	O:W _{100%}	15 ± 2	1.5:5.0	529.0	13.41	---
				[0.83]	[0.37]	[0.19]
PSR6c	O:W _{100%}	15 ± 2	2.0:5.0	528.0	11.86	4554
				[0.51]	[---]	[---]
PSR6d	O:W _{100%}	15 ± 2	2.5:5.0	61.37	---	---
				[0.59]	[0.44]	[---]
PSRF	O:W _{100%}	15 ± 2	2.0:5.0	140.2	15.82	---
				71.86	---	---
				[0.42]	[---]	[---]

Particle size PSR6 - PSRF were measured in a Zetasizer NanoDS instrument.

For obtained systems by methods PSR6 and PSRF, particle sizes were determined of storage at room temperature in the absence of light.

In PSRF: "F" means final formulation and is a repetition of PSR6c methodology. Gray shaded rows are those with monomodal distributions.

decrease in particle size from 95.0 nm, **PS2c**, to 63.0 nm, **PSR3**, with the same proportion of **O:S:W** (2.5:5.0:92.5), as shown in Table 1. This result may be because the $\log P$ value of 7.73 of **OA** (more lipophilic) favors a reduction in the size of the small droplets that form the **O**, when **PS₈₀** was added to the **O** phase, hence **PSR3** produced smaller particles, favoring the rapid formation of a microemulsion with very low energy [54]. Unlike, the $\log P$ of 4.69 of **PS₈₀** (more hydrophilic) favors **S** solubility in the **W** phase, preferring the increase in micellar forms that are related to a higher affinity of **O** to **S**, when **S** is partially scavenged by **W**. However, the application of high energy helps to reduce the particle size to form nanoemulsions, no matter the addition order of **S**. Samples maintained their stability for 12 months (t_{12}), without physical nor particle size changes in **PSR3-5** methods, affirming the stabilization premise.

For **PSR4** and **PSR5**, two variables were tracked, addition order of **S** as well as an increase in emulsification temperature to reach 70 °C. For the former, **S** was added to **W**, and for the latter, **S** was added to **O**. In both, there were tested two cooling rates, one quick with an ice bath, and the other slow, cooling environmentally to reach room temperature. The increase in emulsification temperature was justified looking forward to favor emulsification, trying to break big oil droplets, producing many small droplets. Besides, reaching the point of rupture of droplets, a fast cooling rate should preserve smaller drops, instead of a slow cooling rate, that would lead to ripening, as was solely observed for method **PSR5a** with 104.6 nm particles, which is the bigger size in this comparison. The most important result herein is that both, **PSR4b** and **PSR5b** (quick cooling methods) produced particles with lower PDI, a narrowing effect, with 0.50 and 0.49, in comparison to **PSR4a**, **PSR5a** of 0.76 and 0.89. Again, the dissolution of **PS₈₀** in **O** produced a gain in size reduction, in this case in **PSR5b**, see Table 1 and Fig. 1. No matter of all the designed variations, explored trails resulted in multimodal emulsions.

Since just multimodal emulsions were obtained, the premise for **PSR6** methods is the finding of monomodal structures, see Table 2 and Fig. 2. For these, all manipulations were performed avoiding heating above 15 °C with an ice bath; for a) **PS₈₀** was added to 50 % of **W** and then diluted to 100 % **W**; instead, **PS₈₀** was added to 100 % of **W** in **O:S**

proportions of **PSR6b**) 1.5:5.0; **PSR6c**) 2.0:5.0; and **PSR6d**) 2.5:5.0. Finally, the **PSRF** method is the repetition of **PSR6c** because this system was the best option to prepare stable and monomodal NE, as will be seen forthcoming. Is worth to mention that starting with **PS2** method, the obtained systems resulted stable for 12 months of storage period.

The **PSR6a** method intended to diminish by half the amount of available **W** phase to dissolve **PS₈₀**, and then include **O** to this pre-formulation. Later on, the other half of needed water to achieve proportions was added to the system. This resulted in a bimodal system, which particle sizes ranged (D (nm))[% PD/PDI] in 529 [0.68] and 13.41 [0.43], see Table 2 and Fig. 2.

For methods **PSR6b-d** all **O:S:W** components were premixed at the same time and later on sonicated at 15 °C as emulsification temperature, having different **O** concentrations, b) 1.5; c) 2.0; and d) 2.5, respectively. These methods provided the needed premixing, as well as the required energy, through sonication, to generate seeds of all components, and at the same time retained cooling of the system to generate small sizes and narrower distributions of the particles. The **PSR6b** method developed multimodal systems, with three particle sizes ranging (D (nm))[% PD/PDI] 4554 [0.19], 528 [0.83] and 11.86 [0.37]. The **PSR6d** method developed again a bimodal system (analogously to **PSR6a**), with particle sizes ranging (D (nm))[% PD/PDI] 140.2 [0.59] and 15.82 [0.44]. Finally, the **PSR6c** method developed a monomodal distribution and the measured parameters (D (nm))[% PD/PDI] were 61.37 [0.51]. The **PSR6c** method and formulation, with 2.0 % of **O** and 5 % **S**, and all premixed components followed by ultrasonication, resulted not only the monomodal, but in the smaller stabilized particle size with a very narrow PDI. This was repeated in **PSRF** method, again with 2.0 % of **O** and 5 % **S**, developing (D (nm))[% PD/PDI] 71.86 [0.42] measurements, having good reproducibility and monomodal distribution as required. These two results are placed gray shaded in Table 2 since they are the only two trials that developed monomodal distributions, see Fig. 2.

Since the weight fractions employed do not provide molar proportions, it was necessary to evaluate them to determine structural importance in such good stabilization. Therefore, molar concentrations for **OA** in 1.5 % was 53.1 mM, in 2.0 % was 70.8 mM, and in 2.5 % was

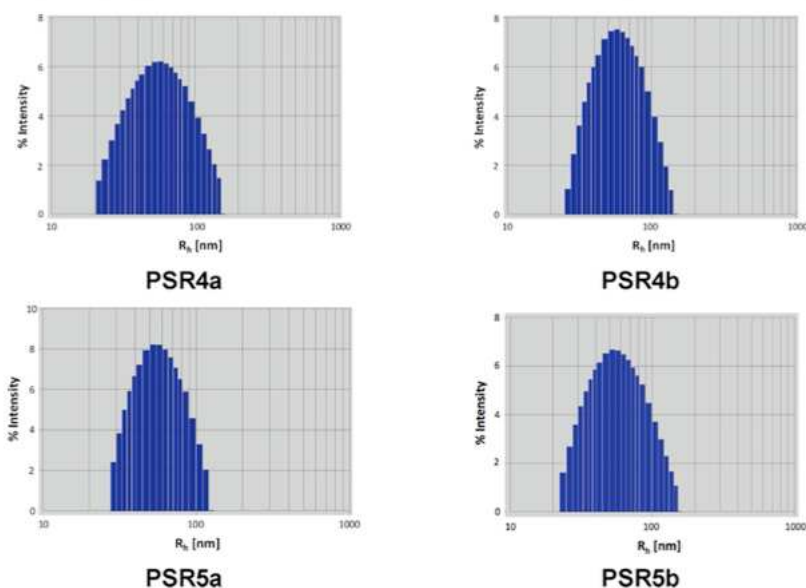


Fig. 1. Radii size distributions [nm] by DLS of the systems obtained by **PSR4a-b** and **PSR5a-b** methods.

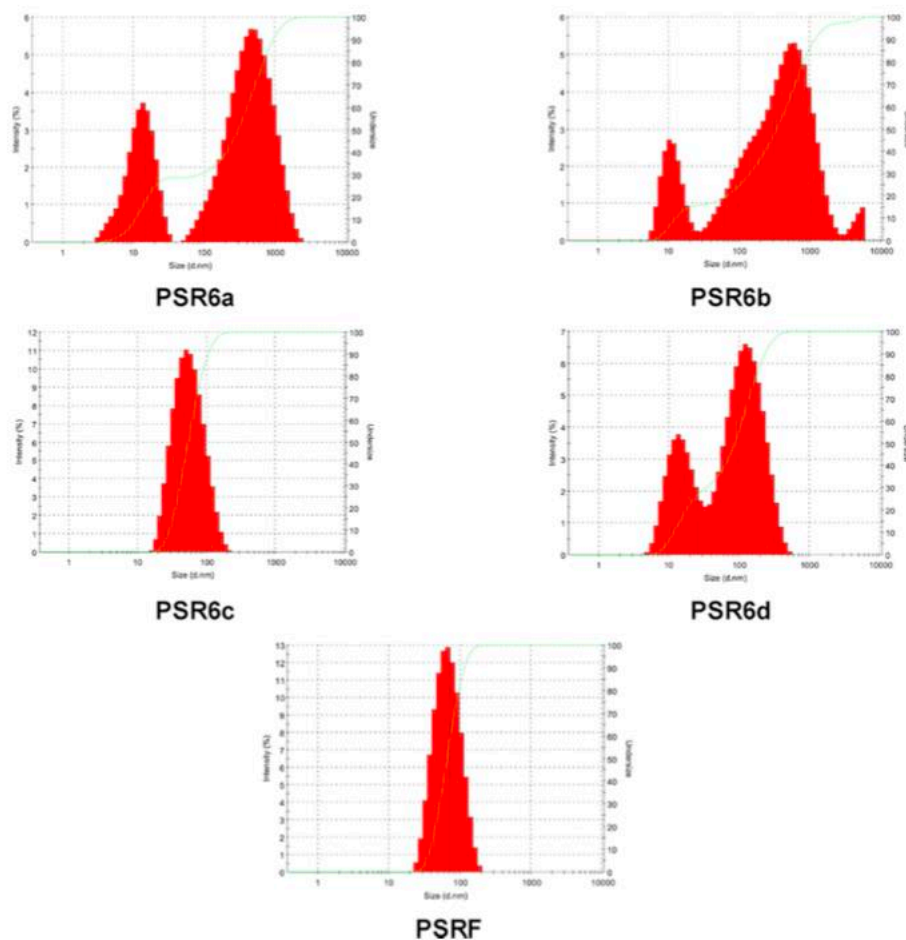


Fig. 2. Diameter size distributions [nm] by DLS of the systems obtained by PSR6a-d and PSRF methods.

88.5 mM, the molar concentration for PS₈₀ in 5.0 % was 38.16 mM. Thus, the smaller nanometric sizes were encountered for PSR6c with $[OA]/[PS_{80}] = 70.8/38.16 = 1.85$ (with 2.0 % of O and 5 % S) proportions in this work, in comparison, for other related works, the $[OA]/[PS_{80}] = 0.74$ proportions provided microemulsions with 500 nm even using cosurfactants such as polypropylene glycol [55]. For PSR6b, proportions were of $[OA]/[PS_{80}] = 53.1/38.16 = 1.39$ (with 1.5 % of O and 5 % S), meanwhile for PSR6d, proportions were of $[OA]/[PS_{80}] = 88.5/38.16 = 2.32$ (with 2.5 % of O and 5 % S) with sizes and PDIs described previously and placed in Table 2. A deeper analysis of this information and results evidenced that the $[OA]/[PS_{80}] = 1.85$ proportion is a good equilibrium point to encapsulate almost the double amount of O in comparison to S, prevailing nanometric sizes and narrower distributions, which are very good results in the design and preparation of nanoparticles for various application purposes. The ratio of the intrinsic factor composition and the extrinsic factor preparation determined the reduction and stability of the NE, similar to the results reported by Gutierrez et al. [56] and as will be seen forthcoming in the DSC analysis section.

Moreover, in order to ascertain sizing and polydispersity as well as

shaping of these obtained NE, transmission electron microscopy (TEM) was determined for the best formulation PR6c/PSRF, and resulting micrographs are placed in Fig. 3. Due to the lack of chromophoric or related contrast agent moieties in this formulation, negative-staining techniques were needed, since this type nanomotifs normally appear as light droplets against a darker background in this technique, as was revealed from staining of other nanomotifs as well [57,58]. Findings revealed that indeed the sizing of these nanoemulsions ranged ca. 72 nm (motifs measured 120–65 nm) in diameter, resulted almost isometric and of liposomal shaping. Some motifs were a little bit bigger than 100 nm, see right panel in Fig. 3, and the most of them resulted smaller than 100 nm, see both panels in Fig. 3, but all of them shaping the same circular liposomal structuring.

3.3. Thermal behavior of NE by DSC

Samples obtained through PSR6b-d methods were additionally characterized by microcalorimetry using DSC, thermograms analysis and statistical deconvolution of obtained envelopes for each sample to determine and understand their stabilities [37,59]. The thermograms

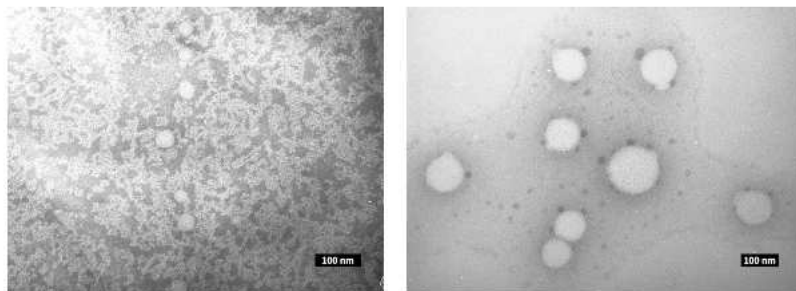


Fig. 3. TEM micrographs 100kx of **PSR6c**/PSRF NE (polysorbate 5.0 %, Oleic acid 2.0 % and water 93 %) clearly evidencing liposomal shaping and nanometric sizes ranging ca. 120–65 nm.

analysis revealed that at least two events are present, one starting at 30 °C that overlaps with a second event that started ca. 50–60 °C depending on sample, which is coincident with the cloud point of **PS₈₀** at 65 °C. This cloud point is known to occur due to decreased solubility in the aqueous phase and an increase in its affinity for the interface or the oil phase at that temperature [60,61]. Subsequently, in second and third heating cycles of the tested systems, slight changes in envelope shapes and enthalpy (Table 3) were noted due to molecular rearrangement in NE, a tendency was observed indicating that heating of the samples reaching ca. 120 °C and return to 30 °C in the sealed cell produced a slight destabilization effect. This is due to Ostwald ripening, and as was previously analyzed, the emulsification temperature was importantly controlled at 15 ± 2 °C to decrease ripening and promote stability [35], therefore the energy provided to the system was not of thermal nature but through vibrations by ultrasonication.

The thermograms were normalized with the **PS₈₀** concentration of 38.8 mM, 53.1 mM of OA (**PSR6b**) 70.8 mM of OA (**PSR6c**), and 88.5 mM of OA (**PSR6d**) in the first, second and third heating cycles to determine the ΔH of the system in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Table 3). The obtained normalized thermograms did not show a symmetrical distribution in the envelope of any of the three heating cycles of samples **PSR6b-d**, in contrast, as shown in 2a-c, envelopes with very complicated shapes were observed. These envelopes were largely preserved during the three heating-cooling cycles, allowing us to assert that the structure of the assemblies in the formulations should be very similar, even in the case of small ripening, as was explained. The ΔH ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) values for the systems were 2698.27 (38.8 mM_{PS80}, 53.1 mM_{OA}) for **PSR6b** and 4788.56 for **PSR6c** (38.8 mM_{PS80}, 70.8 mM_{OA}) and 2869.12 in **PSR6d** (38.8 mM_{PS80}, 88.5 mM_{OA}), in the first heating cycle, which should be the thermal behavior of NE in the employed methods, see Table 3. Moreover, the shape envelope analysis clearly evidenced various implicit processes that can be estimated using thermogram deconvolution process.

The normalized thermograms with a non-normal distribution of the 3 heating cycles of samples **PSR6b**, **PSR6c** and **PSR6d** underwent deconvolution to determine the curve area or ΔH in $\text{kcal}\cdot(\text{mol}\cdot^\circ\text{C})^{-1}$ of the system, and the results are summarized in Table 3 and Fig. 4. In all three cases statistical confidence between convoluted curves and envelope was achieved since all Chi^2 did not overpassed 1.06 and all adjusted R-square are above 0.99, see Table 3. In order to reproduce experimental envelopes, from 3 to 10 Gaussian functions were employed, using an iterative procedure that optimized height, width and position of each Gaussian curve minimizing the difference of observed and calculated heat capacity (Cp) in each point of the final curve.

For **PSR6b**, statistical deconvolution was reached with 7 Gaussian functions; for **PSR6c** with 5 functions; meanwhile for **PSR6d** it correlated with 6. Trials to obtain equivalent deconvolutions with 5–7 curves were further performed in order to compare all series, but this was not possible in any case. Therefore, one important conclusion is that each

sample should be efficiently described with its own but required number of thermal processes. Nevertheless, for the same sample but different heating cycle, this condition of same number of Gaussian functions was attained only for the same formulation. These differences also aim in the comprehension of the physicochemical characteristics of each formulation, as will be discussed further. A simple calorimetric comparison among samples obtained in methods **PSR6b-d** clearly indicate that **PSR6c** with $[\text{O}]/[\text{S}] = 1.85$ provided more stable systems with a thermal barrier of stabilization (ΔH) of $4788.56 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. This proportion resulted very stable, since the enthalpy difference for such sample is approximately $1919.44 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ more stable than **PSR6d**, with $[\text{O}]/[\text{S}] = 2.32$ ($\Delta H = 2869.12$), and $2090.29 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ more stable than **PSR6b**, with $[\text{O}]/[\text{S}] = 1.39$ ($\Delta H = 2698.27$). Being the second more stable sample that with $[\text{O}]/[\text{S}] = 2.32$. This analysis provided clear formulation criteria depending on $[\text{O}]/[\text{S}] > 1.85$ but < 2.32 to generate small sizes, narrower distributions and also thermal stability.

The thermograms of sample **PSR6b** in the first, second, and third heating cycle were normalized based on 1.5 % (w/w) O, with a molar concentration of 52.7 mM, 5.0 % (w/w) with molarity of 38.16 mM of S, and 93.5 % of W. The thermograms represent 91.16 mM (O + S), with ΔH ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) of 2698.27, 2676.47, and 2675.76, respectively. The **PSR6c** formulation, composed of 2.0 % O, 5.0 % S and 93 % W, was normalized to molar concentrations of 70.4 mM of O and 38.16 mM of S, which correspond to a 2.0:5.0 (O:S). The total concentration in **PSR6c** formulation resulted 108.57 mM (O + S), with ΔH ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) of 4788.56, 4239.1 and 3836.95, respectively. The thermograms of **PSR6d** formulation in the first, second, and third heating cycles were normalized based on 2.5 % (w/w) O and a molar concentration of 88.50 mM, 5.0 % (w/w) with a molarity of 38.16 mM of S, and 92.5 % of W. The **PSR6d** formulation, with a total concentration of 126.66 mM (O + S) resulted in ΔH ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) of 2869.12, 2495.03 and 2253.96, respectively.

Thermal behavior and stability of **PSR6c** sample presented a total diminishment, determined as $\Delta\Delta H$ ($\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) of 951.61, this as a result of the difference between ΔH of 4788.56 (cycle 1) and 3836.95 (cycle 3); **PSR6d** formulation diminished its stability due to thermal heating for a $\Delta\Delta H$ amount of $615.16 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, going down from ΔH of 2869.12 (cycle 1) to 2253.96 (cycle 3). Meanwhile **PSR6b** sample has shown a lowering of stability with $\Delta\Delta H$ of $22.51 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, resulting from ΔH of 2698.27 (cycle 1) to a 2675.76 (cycle 3). Nevertheless, that lowering $\Delta\Delta H$ is higher in magnitude for **PSR6c**, meaning a high thermal destabilization of the system, this sample exhibited a high residual ΔH of $3836.95 \text{ Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, major compared with initial ΔH values (belonging to cycle 1) in **PSR6b** and **PSR6d** formulations with $\Delta\Delta H$ of 1138.68 and 967 $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. This comparison clearly evidence that **PSR6c** formulation is the most stable in these trends, followed by **PSR6d** and finally **PSR6b**.

A deeper analysis on deconvolution results aims in the

Table 3
DSC Deconvolution peaks, T [°C], ΔH [Kcal·mol⁻¹], heat capacity Cp [Kcal·(mol·°C)⁻¹], and full width at half maximum (FWHM) [°C].

\ Peak Sample	1	2	3	4	5	6	7	Area _{total} Kcal·mol ⁻¹
PSR6b; Cycle 1; Chi² = 0.15368; Adj. R-Square = 0.99951; # points = 330; * Freedom = 309; SS = 47.488								
T	38.2	49.9	63.7	75.6	93.5	102.8	108.8	2698.27
ΔH	131.48	178.86	102.29	1356.79	632.34	248.53	47.98	
Cp	8.90	12.25	10.22	46.81	33.35	20.86	7.64	
FWHM	14.2	13.7	9.4	27.2	17.9	11.3	6.0	
PSR6b; Cycle 2; Chi² = 0.14423; Adj. R-Square = 0.99934; # points = 329; * Freedom = 308; SS = 44.423								
T	34.7	47.4	62.4	77.6	93.2	101.7	107.6	2676.47
ΔH	72.68	350.96	297.64	1070.44	518.04	247.73	118.95	
Cp	6.30	17.90	18.0	41.3	29.8	20.8	14.9	
FWHM	11.1	18.5	14.9	24.3	16.3	11.2	7.6	
PSR6b; Cycle 3; Chi² = 0.12009; Adj. R-Square = 0.99932; # points = 330; * Freedom = 309; SS = 37.109								
T	34.0	46.8	61.8	76.9	93.1	101.6	107.7	2675.76
ΔH	65.02	337.04	236.82	1027.01	472.11	237.75	121.14	
Cp	5.9	16.9	15.5	38.1	26.7	19.6	15.4	
FWHM	10.7	18.7	14.3	25.3	16.6	11.4	7.5	
PSR6c; Cycle 1; Chi² = 1.05187; Adj. R-Square = 0.99848; # points = 329; * Freedom = 314; SS = 330.870								
T	37.2	50.0	—	68.3	—	87.5	102.3	4788.56
ΔH	236.32	584.61	—	1883.19	—	1570.00	514.42	
Cp	16.6	27.1	—	64.8	—	67.8	38.0	
FWHM	13.8	20.3	—	27.3	—	21.8	15.0	
PSR6c; Cycle 2; Chi² = 0.80331; Adj. R-Square = 0.99851; # points = 329; * Freedom = 314; SS = 252.238								
T	36.4	48.0	—	70.3	—	90.6	103.8	4239.13
ΔH	111.48	504.49	—	2103.39	—	1190.66	329.09	
Cp	8.8	23.6	—	63.7	—	51.7	24.1	
FWHM	12.1	20.1	—	31.0	—	21.7	13.1	
PSR6c; Cycle 3; Chi² = 0.69929; Adj. R-Square = 0.99817; # points = 330; * Freedom = 315; SS = 220.276								
T	37.9	53.6	—	—	77.8	94.1	104.9	3836.95
ΔH	146.26	989.76	—	—	1714.88	720.49	265.55	
Cp	9.3	35.6	—	—	56.6	34.6	20.8	
FWHM	15.3	26.3	—	—	28.5	19.7	12.3	
PSR6d; Cycle 1; Chi² = 0.16178; Adj. R-Square = 0.99940; # points = 329; * Freedom = 308; SS = 49.827								
T	33.7	43.8	57.8	61.7	80.9	94.3	105.6	2869.12
ΔH	55.62	249.85	6.55	866.09	1031.50	532.55	126.94	
Cp	56.8	14.6	1.8	33.6	41.3	28.3	11.2	
FWHM	9.5	16.1	3.3	24.1	23.4	17.8	10.9	
PSR6d; Cycle 2; Chi² = 0.08126; Adj. R-Square = 0.99961; # points = 330; * Freedom = 312; SS = 25.352								
T	33.8	43.9	58.6	—	79.0	94.1	106.1	2495.03
ΔH	28.09	182.02	667.46	—	1001.90	516.29	99.0	
Cp	3.4	10.5	25.9	—	37.4	27.5	92.6	
FWHM	7.7	16.4	24.2	—	25.1	17.7	10.3	
PSR6d; Cycle 3; Chi² = 0.05622; Adj. R-Square = 0.999660; # points = 330; * Freedom = 312; SS = 17.541								
T	36.4	47.5	64.6	—	82.6	94.9	103.3	2253.96
ΔH	65.24	242.21	788.30	—	647.94	421.74	88.51	
Cp	5.1	12.2	28.0	—	27.9	24.3	8.4	
FWHM	12.2	18.6	26.4	—	21.7	16.3	10.0	

understanding of such processes needed to describe experimental envelopes in *PSR6b-d* samples. Independently of the heating cycles, formulation *PSR6b* was thoroughly described with 7 Gaussian functions, see Fig. 5; *PSR6c* with 5 functions, see Fig. 6; and *PSR6d* with 6 functions, see Fig. 7, as was previously stated.

For the *PSR6b* formulation, the first 4 Gaussian functions provided an energetic barrier of 1769.42 Kcal·mol⁻¹ at 75.6 °C; for *PSR6c* formulation, the first 3 Gaussian functions provided 2704.12 Kcal·mol⁻¹ at 68.3 °C; meanwhile the *PSR6d* formulation, the first 4 Gaussian functions provided only 1178.11 Kcal·mol⁻¹ at 61.7 °C, and with 5 Gaussian functions provided just 2209.61 Kcal·mol⁻¹ at 80.9 °C.

This comparison evidently states that *PSR6c* formulation provided the best energetic barrier to achieve stability. This is maintained even though that the system could be thermally destabilized, since the third heating cycle for this sample still provides a 2850 Kcal·mol⁻¹ barrier at 77.8 °C. This analysis is sufficient to determine that this formulation is the best to attain not only stabilization over time but also thermal stabilization. Therefore, it represents the first step to obtain more complex formulations for pharmaceutical, cosmetic or general industrial applications. And this stabilization happens with sizes as small as 61.37 nm for aging periods lasting a year. This result was

reproducible since the *PSRF* formulation is the repetition of *PSR6c* and behaved very similar, with 71.86 nm sizes and a one year aging stability, see Table 2.

3.4. Physicochemical understanding of NE to achieve stability

The obtained NE, using a surfactant concentration above its CMC, initially have shown bimodal behavior during the first 72 h and then changed to a monomodal behavior at 30 days of storage at room temperature. A similar behavior was documented by Mason et al. in 2007 [41], who evidenced that the development of a NE requires seeds of S and therefore a surfactant concentration higher than the CMC, but not as higher as it was experimentally determined and explained in following lines. Thereby ensuring the deposition of an optimal shell of surfactant in the external phase of the samples that allowed over 1 year of storing period after they were manufactured. In this case, the NE is a monomodal system and it maintained its physical appearance as a result of a particle size of less than 100 nm, confirming the stability of the system, consistent with the DSC and light scattering results.

The analysis of these systems and their deconvolutions clearly determined different relaxation times due to cooperative conformational

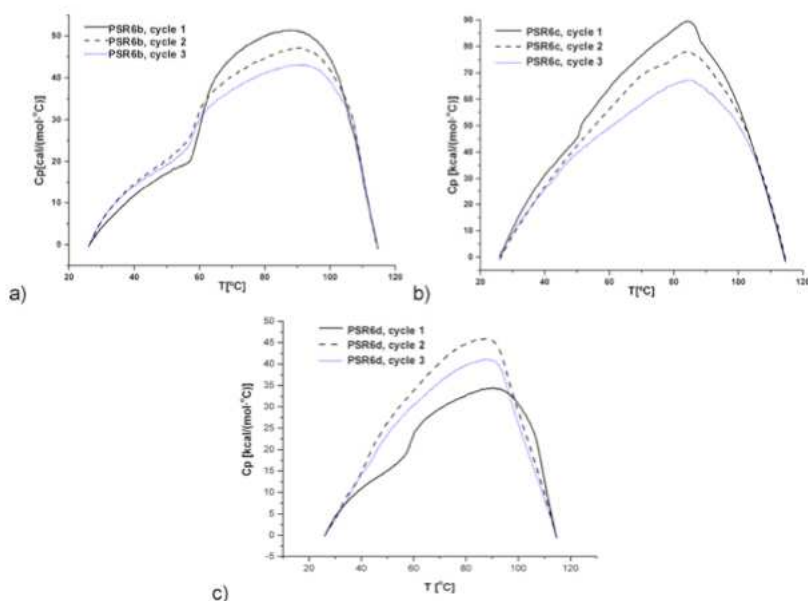


Fig. 4. Standardized thermograms obtained from 3 heating cycles of the a) PSR6b (1.5:5.0, O:S), b) PSR6c (2.0:5.0, O:S), and c) PSR6d (2.5:5.0, O:S) samples.

rearrangements among amorphous/crystalline phases in these NE as has been observed for semi-crystalline polymers [62].

The results have shown that the chemical nature and the concentration of surfactant and oil determined solubility of S between the O and W phases, providing a direct relationship between the total diameter of S:O assemblies, the particle size of the internal phase and also the stability of the system and thus aging [31]. Constant 5 % concentration of S, allowed simplification in experimental design just aiming the variation of O, from 1.5, 2.0 and 2.5 %, to further analyze resulting properties.

When O is at low concentration, 1.5 % (PSR6b), S shell covering is thicker in $[OA]/[PS_{80}] = 1.39$ proportion, and theoretically it should provide more wrapping power. Experimental evidence oppositely indicates the latter due to the formation of bigger drops and trimodal statistics, $D = 4554, 528$ and 11.86 nm, which indeed behave as the less stable in these three systems, with $\Delta H = 2698.27$ Kcal·mol⁻¹. A small augment in the concentration of O to 2 % (PSR6c), the smaller drops and monomodal system is generated, $D = 61.37$ nm, and also the most stable with $\Delta H = 4788.56$ Kcal·mol⁻¹, no matter that the shell of PS₈₀ is thinner in $[OA]/[PS_{80}] = 1.85$ proportion. In this line, Li and colleagues found that higher proportions of 1.5 % (S/O) favor a reduction in the particle size and obtained O/W NE [35]; in comparison, the NE obtained herein had an S/O ratio of 5.0/2.0 = 2.5, beyond the 1.85 proportion defined by Li. Besides, the hydrophilic-lipophilic balance (HLB value) of 10.34 of this NE also favored a reduction in the particle size to 61.37 nm, this through sonication energy source. HLB values of 8–18 favor the O/W-type emulsions [63] that, according to the Bancroft rule, move away from concentrations of phase inversion, thereby preventing changes in the direction of the emulsion, which has been known to favor system stability [64]. Finally, for the increment of O concentration to 2.5 % (PSR6d), middle sized drops bimodal system, $D = 140.2$ and 15.82 nm, was generated, also achieving an intermediate stability, with $\Delta H = 2869.12$ Kcal·mol⁻¹. In this case the PS₈₀ shell is the thinnest, with $[OA]/[PS_{80}] = 2.32$ proportion.

With these results is feasible to evidence that an optimum covering value of O using PS₈₀ as S was obtained, since, when more S is included

in the formulation then more W soluble NE systems were obtained, therefore less stable and presumably equilibrating to a microemulsion state.

There are some relations of thermograms that are important to highlight for these formulations. After 30 °C the arrangements become to destabilize. Regardless of the structural arrangement they have, which could influence how to store and make recommendations for storage and their use as molecular vehicles. These behaviors were not formally reversible, they have small variations in shape or envelopes, nevertheless the deviations are very small, reaching the level that after having 3 heating cycles until 120 °C or 1-year storage periods, nanoemulsions remain being this procedure a very good aging test for future developments. Although the DLS data show monomodal or bimodal behavior, they were obtained at $T = 15$ °C, hence a low temperature of processing. The 5 or 7 transitions obtained from the deconvolution would hypothesize that the arrangement is complex and that in each transition just a part of that component could be disassembled, but this happens in a cooperative way. In this line is feasible to state the formation and interconversion of microstructures of cubo/hepta-some and maybe this important feature could be considered for a more extensive study including microscopic characterizations.

Additionally, it is well known that surface charge in nanostructures also provides electrosteric stabilization as well, nonetheless of the usage of neutral components, since these formulations in contact with water provided negative charged surfaces, sufficient to achieve long last stabilizations as has been observed herein [65,66]. This is because water-hydrophobic interface spontaneously acquires a significant negative charge, and presumably this negative charge is one of the principal factors of stabilization if the preparation methodology produces such surface effect as is the case.

3.5. Inhibition of cell proliferation

The effects of the developed system at the biological level were evaluated via a modified MTT assay to determine the cytotoxicity (IC₅₀) of each component separately and of the nanostructure in the NL-20 cell

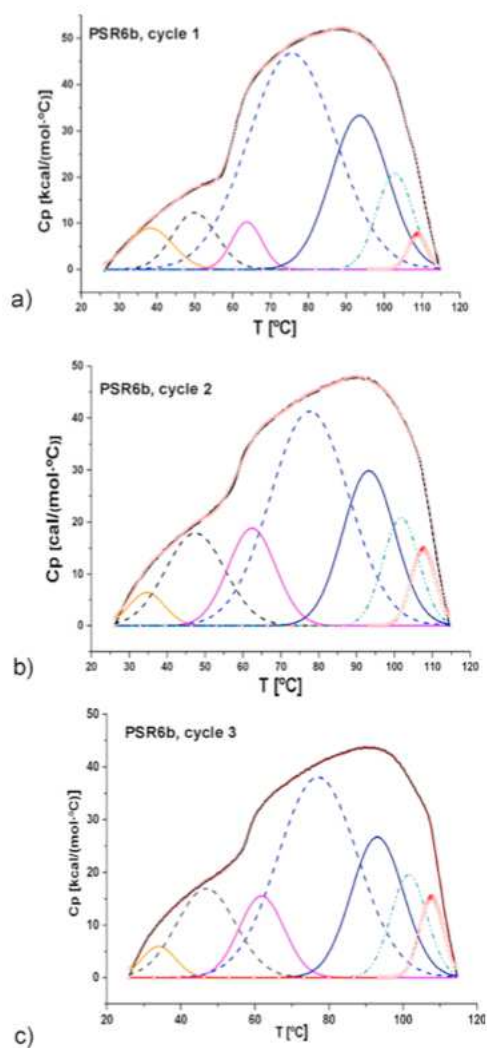


Fig. 5. Thermograms were normalized by deconvoluting 3 heating cycles of sample **PSR6b** to determine the ΔH $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ of the system: a) cycle 1, b) cycle 2 and c) cycle 3; deconvolution optimization was achieved with 7 curves to statistically describe the envelope.

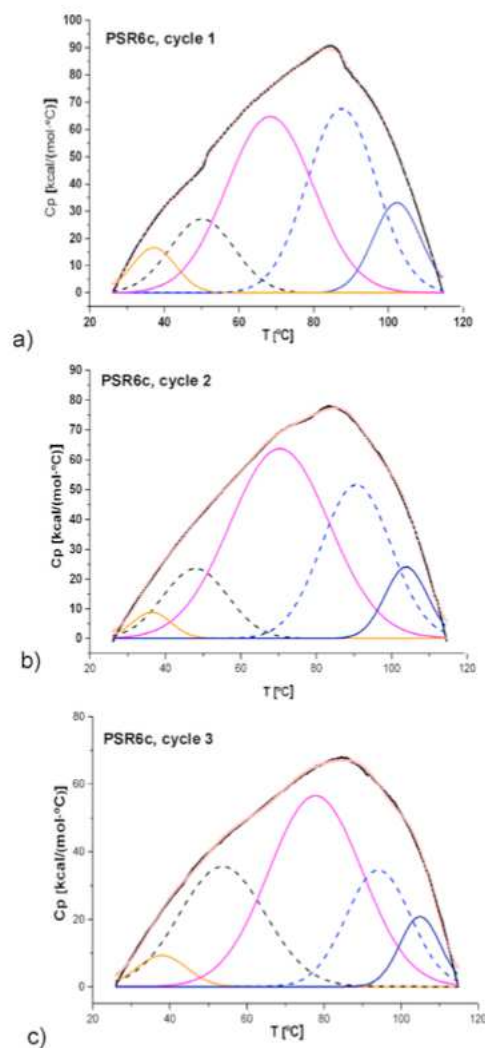


Fig. 6. Thermograms were normalized by deconvoluting 3 heating cycles of sample **PSR6c** to determine the ΔH $\text{Kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ of the system: a) cycle 1, b) cycle 2 and c) cycle 3; deconvolution optimization was achieved with 5 curves to statistically describe the envelope.

line. As we can observe in Fig. 8a, the IC_{50} for OA in NL-20 cells was $1100\ \mu\text{M}$; similarly, Yin and colleagues observed a 54.3 % decrease in the proliferation of a mouse neuroblastoma cell line with $1770\ \mu\text{M}$ OA and twice the incubation time [67]. Another consistent result was the observed 30 % decrease in the proliferation of the HepG2 liver tumor cell line at a concentration of approximately $1100\ \mu\text{M}$ [68] and another research group observed a significant decrease in the proliferation of the same cells at concentrations of albumin-conjugated OA $\geq 1500\ \mu\text{M}$ [69].

The OA concentration in normal serum is approximately $0.05\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [70], but the concentration increases according to the ingested diet, which has been attributed to a stimulatory effect on breast cancer cells. However, *in vitro* studies have shown that

exogenous OA potentiates the action of trastuzumab, promoting apoptosis in a breast cancer cell line [71]. PS_{80} is used as solubilizer of liposoluble drugs; some deleterious effects have been attributed to PS_{80} , which are mainly credited to the use of ethanol as a cosolvent [72]. However, increased toxicity has been observed at doses greater than 10 % [36], which is why 5 % PS_{80} was used in the formulation developed in this project.

The results indicate that the cytotoxicity of OA increased 29-fold upon nanostructuring. Guo and colleagues identified a similar effect, where OA exhibited a 29 % increase in toxicity when it was nanoencapsulated in the internal phase formed by an alkaloid complex (OA: Ly) with licene (Ly) [73]. Studies with OA based on the normal blood concentrations of $50\ \mu\text{M}$ – $200\ \mu\text{M}$ found cell stimulatory effects of

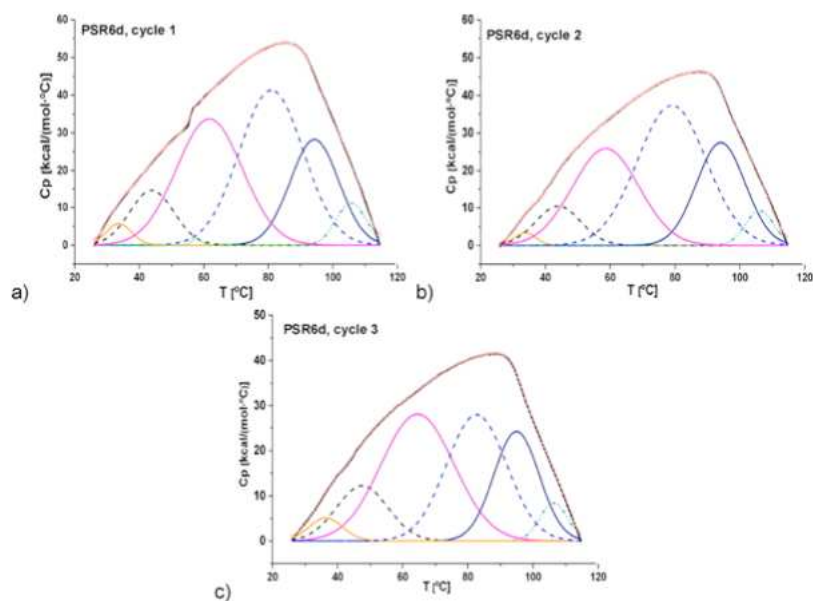


Fig. 7. Thermograms were normalized by deconvoluting 3 heating cycles of sample PSR6d to determine the ΔH Kcal·mol⁻¹ of the system: a) cycle 1, b) cycle 2 and c) cycle 3; deconvolution optimization was achieved with 6 curves to statistically describe the envelope.

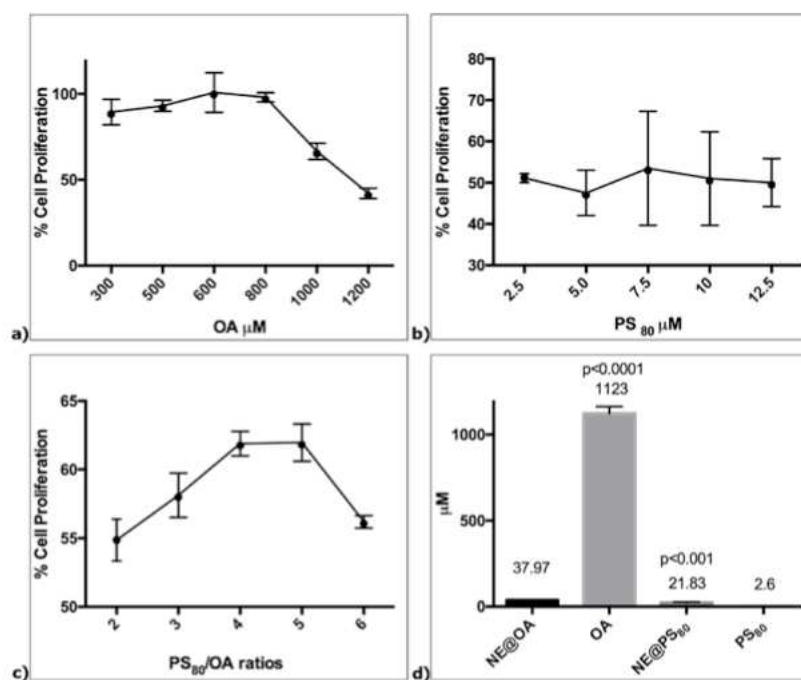


Fig. 8. Percentage inhibition of NL-20 cell proliferation by different concentrations of solutions of a) OA in alcohol, b) PS₈₀ in water, and c) NE in culture medium at different PS₈₀/OA ratios (2 = 20/37; 3 = 40/74; 4 = 60/111; 5 = 80/148, and 6 = 100/185), corresponding to IC₅₀ values of 1100 μM OA, 2.6 μM PS₈₀, and 37.9/20.5 μM OA/PS₈₀ in the NE. d) Statistical analysis of the IC₅₀ of OA and PS₈₀ alone and in the NE (means ± SEM, *P < 0.001; **P < 0.0001).

30 and 45 %, respectively, in 786-0 renal cancer cells [70]. In other *in vitro* studies, the researchers simulated the blood concentrations of free OA and OA bound to plasma proteins through α -lacto-albumin (α -LA protein complex) at a ratio of OA: α -LA of 10:1 and found that 600 μ M OA (170 μ g mL⁻¹) displayed 50 % of the hemolytic effect of 1000 μ M OA (284 μ g mL⁻¹), which affected 100 % of the cells [74].

Moreover, the IC₅₀ of PS₈₀ was 2.6 μ M (Fig. 8b). In another study with fibroblasts, an IC₅₀ of 160 μ M was obtained with 4 h of treatment [75], and PS₈₀ showed an IC₅₀ of 380 μ M in a Caco-2 cell line with 72 h of treatment. Fig. 8c, shows the experimentally determined IC₅₀ of the NE, which corresponds to a theoretical proportion of 20.5 μ M nanostructured PS₈₀ and 37.9 μ M OA. In comparison, the cytotoxicity of PS₈₀ increases at 2.6 μ M OA and decreases at 1100 μ M OA when it is not incorporated into the nanostructures.

Some studies agree with our findings in relation to the decreased cytotoxicity of nanostructured PS₈₀. For example, Caon and colleagues used Vero cells to obtain a IC₅₀ of 249.2 μ M for PS₈₀ in the absence of nanostructuring and an IC₅₀ of 378.6 μ M for nanostructured PS₈₀, which represents a 34 % reduction in cytotoxicity. In addition, in MA 104 cells, the authors determined an IC₅₀ of 204.3 μ M for PS₈₀ alone and an IC₅₀ of 249.2 μ M for nanostructured PS₈₀, corresponding to a 19 % reduction in cytotoxicity [76]. Another example of the reduced cytotoxicity of nanostructured PS₈₀ was reported in 3T3 fibroblasts using nanostructured lipid carriers (NLC), in which an IC₅₀ of 0.4 % was observed for 1 % PS₈₀ and an IC₅₀ of 0.129 % was observed for the same concentration of PS₈₀ in a 72 h treatment; thus, when PS₈₀ is nanostructured, its cytotoxicity is decreased [77]. These reports support our findings, showing that the non-structured PS₈₀ is more toxic (IC₅₀ of 2.6 μ M) to the NL-20 cells compared with nanostructured PS₈₀ with OA in the PSR6c. The toxicity of PS₈₀ was decreased 7.9-fold, thus, more PS₈₀ was required for the new surface to be covered by the surfactant molecules of the external phase.

The toxicity of PS₈₀ is decreased 7.9 fold when it is nanostructured with OA in the NE prepared with PSR6c method, possibly by increasing the available surface area of the internal phase such that a greater amount of PS₈₀ is covering the OA nanodroplets and fewer free PS₈₀ micelles are present in the external phase [78]. Therefore, the toxicity is decreased to 20.5 μ M when PS₈₀ is included in the PSR6c method. A similar effect was observed in solid lipid nanoparticles (SLN) containing PS₈₀, which exhibited less toxicity toward human promyelocytic HL60 cells than free PS₈₀ [79].

4. Conclusions

The best NE obtained in this work have particle sizes of 71.86 nm, with a polydispersity index of 0.42 and a 2.5:93 wt ratio of O:S:W components, determined by DLS and confirmed by TEM. Particle size was maintained the same after twelve months storage period and the obtained procedure is reproducible. The careful selection of chemical components as well as preparation conditions permitted to reach surface area increment, reduction of the internal oil phase to get nano-sizing, homogeneity and stability for quite long periods, as initially desired for this means. Important results, for those systems which shown long stabilization periods, state that 1.5 % O system, with thicker S shells ([OA]/[PS₈₀] = 53.1 mM/38.16 mM = 1.39), formed bigger drops, with three different sizes, ranging D = 4554, 528, 11.86 nm, being the less stable system according to calorimetric evidences. The O phase in 2 %, as intermediate thicker S shells ([OA]/[PS₈₀] = 70.8 mM/38.16 mM = 1.85), generated a system with the smaller drops and of monomodal character, D = 61.37 nm, and also became the most stable one in this series calorimetrically. At this concentration ratio of 70.8 mM [OA] for 38.16 mM [PS₈₀], the OA fraction represents almost double the molecular proportion compared with PS₈₀, hence the coverage resulted more efficient in this condition. Therefore, in this structure, two OA equivalents were efficiently, stably and nanostructurally covered by one equivalent of PS₈₀. Meanwhile,

the 2.5 % O system, with the thinnest S shells ([OA]/[PS₈₀] = 2.32), generated a middle sized bimodal system, which contained drops ranging D = 140.2, 15.82 nm, and also intermediate calorimetric stability. Optimum covering value was obtained at [OA]/[PS₈₀] = 1.85 since, when more S is included in the formulation, then more W soluble NE systems were obtained, therefore less stable as a nanostructuring and presumably equilibrating to a microemulsion state. Toxicity studies of these NE were developed in NL-20 cell line. Free OA has shown inhibitory concentration at 50 % (IC₅₀) of 1100 μ M, and when it is nanostructured, diminished to 37 μ M. Free PS₈₀ has IC₅₀ of 2.6 μ M, and nanostructured augmented to 20.0 μ M. Thus, a very important finding in these experiments is that the most toxic constituent in NE, which is the PS₈₀, decreased its toxicity 7.9-fold. Meanwhile OA increased its toxicity 29-fold, both when going from free to nanostructured states, providing general diminishment of toxicity for the nanostructured system in the NL-20 cell line. The thorough development and deep analysis of OA:PS₈₀ NE would have turned these systems into important candidates for drug vehicle studies of lipophilic pharmaceuticals that are potentially toxic, with the goal of obtaining the desired effect of reducing cytotoxicity of employed carriers and potentiating the therapeutic effect.

CRedit authorship contribution statement

María Luisa de Lourdes Pérez González: Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Data curation, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Claudia Haydée González-de la Rosa:** Conceptualization, Supervision, Funding acquisition, Data curation. **Gerardo Pérez Hernández:** Formal analysis, Software, Methodology, Data curation, Investigation. **Hiram Isaac Beltrán:** Conceptualization, Supervision, Software, Formal analysis, Methodology, Funding acquisition, Writing - original draft, Writing - review & editing, Project administration, Resources, Investigation.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We acknowledge CONACyT projects 181534 (C.H. González-De la Rosa) and 222872 (H.I. Beltrán), UAM and SEP-PROMEP for financial support. M.L.L. Pérez González acknowledge Ph.D. scholarship from CONACyT.




References

- [1] T.S.H. Leong, T.J. Wooster, S.E. Kentish, M. Ashokkumar, Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification, *Ultrason. Sonochem.* 16 (6) (2009) 721–727.
- [2] O. Sonnevile-Aubrun, J.T. Simonnet, F. L'Alloret, Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108–109 (2004) 145–149.
- [3] P. Shah, D. Bhalodia, P. Shelat, Nanoemulsion: a pharmaceutical review, *Syst. Rev. Pharm.* 1 (1) (2010) 24.
- [4] F. Shakeel, S. Baboota, A. Ahuja, J. Ali, S. Shafiq, Accelerated stability testing of celecoxib nanoemulsion containing Cremophor-EL, *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2 (8) (2008) 179–183.
- [5] M. Pandey, H. Choudhury, O.C. Yeun, H.M. Yin, T.W. Lynn, C.L.Y. Tine, N.S. Wi, K.C.C. Yen, C.S. Phing, P. Kesharwani, S.K. Bhattamisra, B. Gorain, Perspectives of nanoemulsion strategies in the improvement of oral, parenteral and transdermal chemotherapy, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 19 (4) (2018) 276–292.
- [6] S. Pimentel-Moral, M.C. Teixeira, A.R. Fernandes, D. Arraez-Roman, A. Martinez-Ferez, A. Segura-Carretero, E.B. Souto, Lipid nanocarriers for the loading of polyphenols – a comprehensive review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 260 (2018) 85–94.
- [7] H. Choudhury, B. Gorain, R.K. Tekade, M. Pandey, S. Karmakar, T.K. Pal, Safety against nephrotoxicity in paclitaxel treatment: oral nanocarrier as an effective tool in preclinical evaluation with marked *in vivo* antitumor activity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 91 (2017) 179–189.
- [8] B. Chatterjee, B. Gorain, K. Mohananaidu, P. Sengupta, U.K. Mandal, H. Choudhury, Targeted drug delivery to the brain via intranasal nanoemulsion: available proof of

- concept and existing challenges, *Int. J. Pharm.* 565 (2019) 258–268.
- [9] H. Choudhury, B. Gorain, B. Chatterjee, U.K. Mandal, P. Sengupta, R.K. Tekade, Pharmacokinetic and pharmacodynamic features of nanoemulsion following oral, intravenous, topical and nasal route, *Curr. Pharm. Des.* 23 (17) (2017) 2504–2531.
- [10] S. Shafiq-un-Nabi, F. Shakeel, S. Talegaonkar, J. Ali, S. Baboota, A. Ahuja, R. Khar, M. Ali, Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note, *AAPS PharmSciTech* 8 (2) (2007) E12–E17.
- [11] A. Azem, M. Rizwan, F.J. Ahmad, Z. Iqbal, R.K. Khar, M. Aqil, S. Talegaonkar, Nanoemulsion components screening and selection: a technical note, *AAPS PharmSciTech* 10 (1) (2009) 69–76.
- [12] S. Graves, K. Meleson, J. Wilking, M.Y. Lin, T.G. Mason, Structure of concentrated nanoemulsions, *J. Chem. Phys.* 122 (13) (2005) 134703–134706.
- [13] T.J. Wooster, M. Golding, P. Sangsuanri, Impact of oil type on nanoemulsion formation and ostwald ripening stability, *Langmuir* 24 (22) (2008) 12758–12765.
- [14] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties, *J. Phys. Condens. Matter* 18 (41) (2006) R635–R666.
- [15] J. Rao, D.J. McClements, Formation of flavor oil microemulsions, nanoemulsions and emulsions: influence of composition and preparation method, *J. Agric. Food Chem.* 59 (9) (2011) 5026–5035.
- [16] M. Wulff-Perez, A. Torcello-Gomez, M.J. Galvez-Ruiz, A. Martin-Rodriguez, Stability of emulsions for parenteral feeding: preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic 68 as surfactant, *Food Hydrocolloids* 23 (4) (2009) 1096–1102.
- [17] D.T. Wasan, A.D. Nikolov, L.A. Lobo, K. Koczko, D.A. Edwards, Foams, thin films and surface rheological properties, *Prog. Surf. Sci.* 39 (2) (1992) 119–154.
- [18] V.K. Srivastava, G. Kini, D. Rout, Detergency in spontaneously formed emulsions, *J. Colloid Interface Sci.* 304 (1) (2006) 214–221.
- [19] Y. Yuan, Y.X. Gao, J. Zhao, L. Mao, Characterization and stability evaluation of beta-carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions, *Food Res. Int.* 41 (1) (2008) 61–68.
- [20] I.S. Spinelli, C.R.E. Mansur, G. Gonzalez, E.F. Lucas, Evaluation of process conditions and characterization of particle size and stability of oil-in-water nanoemulsions, *Colloid J.* 72 (1) (2010) 56–65.
- [21] S. Sajjadi, Effect of mixing protocol on formation of fine emulsions, *Chem. Eng. Sci.* 61 (9) (2006) 3009–3017.
- [22] S.M. Jafari, E. Assadpoor, Y.H. He, B. Bhandari, Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification, *Food Hydrocolloids* 22 (7) (2008) 1191–1202.
- [23] S. Kentish, T.J. Wooster, A. Ashokkumar, S. Balachandran, R. Mawson, L. Simons, The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9 (2) (2008) 170–175.
- [24] P. Schalbart, M. Kawaji, K. Fumoto, Formation of tetradecane nanoemulsion by low-energy emulsification methods, *Int. J. Refrig.-Revue Internationale Du Froid* 33 (8) (2010) 1612–1624.
- [25] S.M. Graves, T.G. Mason, Transmission of visible and ultraviolet light through charge-stabilized nanoemulsions, *J. Phys. Chem. C* 112 (33) (2008) 12669–12676.
- [26] W.E. Bawarski, E. Chidlowsky, D.J. Bharali, S.A. Mousa, Emerging nanopharmaceuticals, *Nanomed.-Nanotechnol. Biol. Med.* 4 (4) (2008) 273–282.
- [27] S.B. Lim, A. Banerjee, H. Onyuksek, Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers, *J. Control. Release* 163 (1) (2012) 34–45.
- [28] I. Tsujino, T. Yamazaki, M. Masutani, U. Sawada, T. Horie, Effect of Tween-80 on cell killing by etoposide in human lung adenocarcinoma cells, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43 (1) (1999) 29–34.
- [29] W.J. Loos, S.D. Baker, J. Verweij, J.G. Boonstra, A. Sparreboom, Clinical pharmacokinetics of unbound docetaxel: role of polysorbate 80 and serum proteins, *Clin. Pharmacol. Ther.* 74 (4) (2003) 364–371.
- [30] B. Ozpolat, M.N. Harris, K. Mwuonyeya, X. Chen, G. Lopez-Berstein, All-trans-retinoic acid-induced inhibition of the initiation and elongation phase of protein synthesis in acute promyelocytic leukemia, *Blood* 102 (11) (2003) 594A–594A.
- [31] S.J. Simoes, J.M. Tapadas, C.M. Marques, M.E.M. Cruz, M.B.F. Martins, G. Cevc, Permeabilisation and solubilisation of soybean phosphatidylcholine bilayer vesicles, as membrane models, by polysorbate, Tween 80, *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (3–4) (2005) 307–317.
- [32] S.H. Yang, D. Heo, J. Park, S. Na, J.S. Suh, S. Haam, S.W. Park, Y.M. Huh, J. Yang, Role of surface charge in cytotoxicity of charged manganese ferrite nanoparticles towards macrophages, *Nanotechnology* 23 (50) (2012) 8.
- [33] N. Menard, N. Tsapis, C. Poirier, T. Arnauld, L. Moine, F. Lefoulon, J.M. Pean, E. Fattal, Physicochemical characterization and toxicity evaluation of steroid-based surfactants designed for solubilization of poorly soluble drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* 44 (5) (2011) 595–601.
- [34] **Box 1957.**
- [35] Y. Li, Z. Zhang, Q. Yuan, H. Liang, F. Vriesekoop, Process optimization and stability of d-limonene nanoemulsions prepared by catastrophic phase inversion method, *J. Food Eng.* 119 (3) (2013) 419–424.
- [36] Y. Sun, Z. Xing, Y. Xue, K. Mustafa, A. Finne-Wistrand, A.C. Albertsson, Surfactant as a critical factor when tuning the hydrophilicity in three-dimensional polyester-based scaffolds: impact of hydrophilicity on their mechanical properties and the cellular response of human osteoblast-like cells, *Biomacromolecules* 15 (4) (2014) 1259–1268.
- [37] B. Schäffer, B. Schäffer, D. Löhrinczy, Decomposition of DSC curves of dairy products with Gaussian functions, *J. Therm. Anal. Calorim.* 82 (2) (2005) 531–535.
- [38] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival – application to proliferation and cyto-toxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1–2) (1983) 55–63.
- [39] K. Meleson, S. Graves, T.G. Mason, Formation of concentrated nanoemulsions by extreme shear, *Soft Mater.* 2 (2–3) (2004) 109–123.
- [40] T. Tadros, R. Izquierdo, J. Esquena, C. Solans, Formation and stability of nanoemulsions, *Adv. Colloid Interface Sci.* 108 (2004) 303–318.
- [41] T.G. Mason, J.N. Wilking, K. Meleson, C.B. Chang, S.M. Graves, Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties (vol 19, pg 079001, 2007), *J. Phys.-Condensed Matter* 19 (7) (2007).
- [42] B.D. Rege, J.P.Y. Kao, J.E. Polli, Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers, *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (4–5) (2002) 237–246.
- [43] M.H. Amaral, J. das Neves, A.Z. Oliveira, M.F. Bahia, Foamability of detergent solutions prepared with different types of surfactants and waters, *J. Surfactants Deterg.* 11 (4) (2008) 275–278.
- [44] R. Khonkarn, S. Mankhetkorn, M. Talelli, W.E. Hennink, S. Okonogi, Cytostatic effect of xanthone-loaded mPEG-b-p(HPMAm-Lac(2)) micelles towards doxorubicin sensitive and resistant cancer cells, *Colloids Surf. B-Biointerfaces* 94 (2012) 266–273.
- [45] Z. Weiszhar, J. Czucz, C. Révész, L. Rosivall, J. Szebeni, Z. Rozsnyay, Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20, *Eur. J. Pharm. Sci.* 45 (4) (2012) 492–498.
- [46] H. Liang, Q. Yang, L. Deng, J. Lu, J. Chen, Phospholipid-Tween 80 mixed micelles as an intravenous delivery carrier for paclitaxel, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 37 (5) (2011) 597–605.
- [47] C.W. How, A. Rasedee, R. Abbasalpourkabar, Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80, *IEEE Trans. Nanobioscience* 12 (2) (2013) 72–78.
- [48] V. Ghosh, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity, *Ultrason. Sonochem.* 20 (1) (2013) 338–344.
- [49] A.S. Peshkovsky, S.L. Peshkovsky, S. Bystryak, Scalable high-power ultrasonic technology for the production of translucent nanoemulsions, *Chem. Eng. Process.* 69 (2013) 77–82.
- [50] S. Sugumar, V. Ghosh, M.J. Nirmala, A. Mukherjee, N. Chandrasekaran, Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats, *Ultrason. Sonochem.* 21 (3) (2014) 1044–1049.
- [51] B.P. Binks, J.H. Clint, P.D.I. Fletcher, S. Rippon, S.D. Lubetkin, P.J. Mulqueen, Kinetics of swelling of oil-in-water emulsions stabilized by different surfactants, *Langmuir* 15 (13) (1999) 4495–4501.
- [52] A.J.F. Sing, A. Gracia, J. Lachaise, P. Brochette, J.L. Salager, Interactions and coalescence of nanodroplets in translucent O/W emulsions, *Colloids Surf. A-Physicochem. Eng. Aspects* 152 (1–2) (1999) 31–39.
- [53] S.Y. Tang, P. Shridharan, M. Sivakumar, Impact of process parameters in the generation of novel aspirin nanoemulsions – comparative studies between ultrasound cavitation and microfluidizer, *Ultrason. Sonochem.* 20 (1) (2013) 485–497.
- [54] L. Maibaum, A.R. Dincer, D. Chandler, Micelle formation and the hydrophobic effect, *J. Phys. Chem. B* 108 (21) (2004) 6778–6781.
- [55] F.I. Abd-Allah, H.M. Dawaba, A.M. Ahmed, Development of a microemulsion-based formulation to improve the availability of poorly water-soluble drug, *Drug Discov. Ther.* 4 (4) (2010) 257–266.
- [56] J.M. Gutierrez, C. Gonzalez, A. Maestro, I. Sole, C.M. Pey, J. Nolla, Nano-emulsions: new applications and optimization of their preparation, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13 (4) (2008) 245–251.
- [57] O. Lambert, J.-L. Rigaud, Phage DNA Transfer Into Liposomes. Methods in Enzymology, Academic Press, 2003, pp. 465–482.
- [58] R.M.L. Buller, 170 - poxviruses, in: J. Cohen, W.G. Powderly, S.M. Opal (Eds.), *Infectious Diseases*, fourth edition, Elsevier, 2017, pp. 1452–1457 e1451.
- [59] J.M. Dettler, R. Buscaglia, V.H. Le, E.A. Lewis, DSC deconvolution of the structural complexity of c-MYC P1 promoter G-quadruplexes, *Biophys. J.* 100 (6) (2011) 1517–1525.
- [60] B.A. Kerwin, Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways, *J. Pharm. Sci.* 97 (8) (2008) 2924–2935.
- [61] E.D. Goddard, K.P. Ananthapadmanabhan, Interactions of Surfactants with Polymers and Proteins, CRC Press, Boca Raton, 1993.
- [62] N.M. Alves, J.F. Mano, E. Balaguer, J.M. Meseguer Dueñas, J.L. Gómez Ribelles, Glass transition and structural relaxation in semi-crystalline poly(ethylene terephthalate): a DSC study, *Polymer* 43 (15) (2002) 4111–4122.
- [63] J. Bullon, J. Molina, R. Marquez, F. Vejar, C. Scorzza, A. Forgiarini, Nano-emulsification of triglyceride oils for parenteral use by mean of a low-energy emulsification method, *Revista Tecnica De La Facultad De Ingenieria Universidad Del Zulia* 30 (2007) 428–436.
- [64] S. Sajjadi, Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion, *Langmuir* 22 (13) (2006) 5597–5603.
- [65] A.P. Carpenter, E. Tran, R.M. Altman, G.L. Richmond, Formation and surface-stabilizing contributions to bare nanoemulsions created with negligible surface charge, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (19) (2019) 9214.
- [66] L. Bai, D.J. McClements, Formation and stabilization of nanoemulsions using bio-surfactants: rhamnolipids, *J. Colloid Interface Sci.* 479 (2016) 71–79.
- [67] H. Yin, H.P. Too, G.M. Chow, The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite, *Biomaterials* 26 (29) (2005) 5818–5826.
- [68] W. Cui, S.L. Chen, K.Q. Hu, Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells, *Am. J. Transl. Res.* 2 (1) (2010) 95–104.
- [69] N. Ziamajidi, S. Khaghani, G. Hassanzadeh, S. Vardasbi, S. Ahmadian, A. Nowrouzi, S.M. Ghaffari, A. Abdirad, Amelioration by chicory seed extract of diabetes- and oleic acid-induced non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)/non-alcoholic steatohepatitis (NASH) via modulation of PPAR alpha and SREBP-1, *Food Chem. Toxicol.*

- 58 (2013) 198–209.
- [70] Z.H. Liu, Y.B. Xiao, Y.Q. Yuan, X.W. Zhang, C.P. Qin, J. Xie, Y.C. Hao, T. Xu, X.F. Wang, Effects of oleic acid on cell proliferation through an integrin-linked kinase signaling pathway in 786-O renal cell carcinoma cells, *Oncol. Lett.* 5 (4) (2013) 1395–1399.
- [71] J.A. Menendez, L. Vellon, R. Colomer, R. Lupu, Oleic acid, the main mono-unsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/neu (erb B-2) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin (TM)) in breast cancer cells with Her-2/neu oncogene amplification, *Ann. Oncol.* 16 (3) (2005) 359–371.
- [72] X. Li, L. Du, C.Y. Wang, Y. Liu, X.G. Mei, Y.G. Jin, Highly efficient and lowly toxic docetaxel nanoemulsions for intravenous injection to animals, *Pharmazie* 66 (7) (2011) 479–483.
- [73] Y.M. Guo, X. Liu, X. Sun, Q. Zhang, T. Gong, Z.R. Zhang, Mannosylated lipid nanoemulsions loaded with lycorine-oleic acid ionic complex for tumor cell-specific delivery, *Theranostics* 2 (11) (2012) 1104–1114.
- [74] M. Hoque, S. Dave, P. Gupta, M. Saleemuddin, Oleic acid may be the key contributor in the BAMLET-induced erythrocyte hemolysis and tumoricidal action, *PLoS One* 8 (9) (2013).
- [75] B. Arechabala, C. Coiffard, P. Rivalland, L.J.M. Coiffard, Y. de Roeck-Holtzhauser, Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MITT assay and LDH release, *J. Appl. Toxicol.* 19 (3) (1999) 163–165.
- [76] T. Caon, B.G. Zanetti-Ramos, E. Lemos-Senna, E. Cloutet, H. Cramail, R. Borsali, V. Soldi, C.M.O. Simoes, Evaluation of DNA damage and cytotoxicity of poly-urethane-based nano- and microparticles as promising biomaterials for drug delivery systems, *J. Nanoparticle Res.* 12 (5) (2010) 1655–1665.
- [77] C.W. How, A. Rasedee, R. Abbaslipourkabar, Characterization and cytotoxicity of nanostructured lipid carriers formulated with olive oil, hydrogenated palm oil, and polysorbate 80, *IEEE Trans. Nanobioscience* 12 (2) (2013) 72–78.
- [78] S. Petersen, F. Steiniger, D. Fischer, A. Fahr, H. Bunjes, The physical state of lipid nanoparticles influences their effect on in vitro cell viability, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 79 (1) (2011) 150–161.
- [79] R.H. Muller, D. Ruhl, S. Runge, K. SchulzeForster, W. Mehnert, Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles as a function of the lipid matrix and the surfactant, *Pharm. Res.* 14 (4) (1997) 458–462.

ANEXOS: 2.- PATENTE EN TRÁMITE

	
Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial	
Solicitud de Patente de Invención o de Registro de Modelo de Utilidad o de Registro de Diseño Industrial	
Homoclave del formato: IMPI-00-009 Fecha de publicación del formato en el DOF: 18 / 11 / 20	Folio y Fecha de Recepción 
Datos generales de la solicitud Marcar con una X sólo una opción: <input checked="" type="radio"/> Solicitud de Patente de Invención <input type="radio"/> PCT <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="radio"/> PCT <input type="radio"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique: <input type="radio"/> Modelo Industrial <input type="radio"/> Dibujo Industrial	
Datos generales del o de los solicitante(s)	
Personas físicas CURP: Nombre(s): Primer apellido: Segundo apellido: Nacionalidad: Teléfono (número, extensión): Correo electrónico: <input type="radio"/> El solicitante es el inventor/diseñador <input type="radio"/> Continúa en anexo	Personas morales RFC: UAM740101AR1 Denominación o razón social: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA Nacionalidad: MEXICANA Teléfono (número, extensión): 5554834000 Ext.1234 Correo electrónico: pintel@correo.uam.mx <input type="radio"/> Continúa en anexo
Domicilio del o de los solicitante(s)	
Código postal: 14387 Calle: PROLONGACIÓN CANAL DE MIRAMONTES <small>(Por ejemplo: Avenida Insurgentes Sur, Boulevard Adolfo López Mateos, Calles, etc.)</small> Número exterior: 3855 Número interior: Colonia: EX-HACIENDA SAN JUAN DE DIOS <small>(Por ejemplo: Anclación Juárez, Residencial Hidalgo, Poblado Nuevo, Sección, etc.)</small> Municipio o demarcación territorial: ALCALDÍA EN TLALPAN Entidad Federativa: CIUDAD DE MÉXICO País: MÉXICO	
Datos generales del o de los inventor(es) o diseñador(es)	
CURP: Nombre(s): MARÍA LUISA DE LOURDES Primer apellido: PÉREZ Segundo apellido: GONZÁLEZ Nacionalidad: MEXICANA Teléfono (número, extensión): 5522712897 Correo electrónico: mlperez@correo.xoc.uam.mx <input checked="" type="radio"/> Continúa en anexo	
	
<small> Contacto: Avda. 4 150, Puntos Santa María Tapan, Tlaximilco, C.F. 46020, Ciudad de México. Teléfono: 55-53-34-07-00 en la Ciudad de México y área metropolitana, del interior de la República sin costo para el usuario 800-070-00-00, extensiones 10098, 10030 y 10024. Correo electrónico: apimpi@gob.mx </small>	
Creatividad para el Bienestar	Página 1 de 4