



Producción y caracterización de nanoemulsiones con distintos componentes activos.

PROYECTO FIN DE Grado

presentado para optar

al Título de Graduado en Ingeniería Biomédica por

Manuel Gomez

bajo la supervisión de

Ane Miren Imaz

Donostia-San Sebastián, Septiembre, 2024



tecnun
Universidad
de Navarra

Índice

1-Objetivos	1
2-Resumen.....	2
3-Introducción	3
4-Estado del arte.....	5
4.1-Nanoemulsiones	5
4.2-Farmacos y Componentes activos	6
5-Metodos y resultados	7
5.1-Seccion experimental	7
5.1.1-HPLC	7
5.1.2-DLS	8
5.1.3-Difracción Laser	10
5.2-Medición de retinol mediante la utilización del HPLC	20
5.3-Curva calibración estándar de retinol.....	22
5.4-Cromatogramas del retinol, el retinol oxidado y proveedores del retinol	23
5.5-Estudio de la liberación de fármacos mediante el HPLC	28
6-Conclusiones.....	36
7-Líneas futuras	38
8-Referencias.....	39

Índice de figuras, tablas y ecuaciones

Figuras

Figura 1 Diagrama de principios de funcionamiento de la técnica del HPLC (A) y ejemplo de un dispositivo HPLC.....	8
Figura 2: Ejemplo del dispositivo DLS ZEN3600 (A) y una breve explicación de su principio de funcionamiento (B)	9
Figura 3: Mastersizer 3000 MAZ 6140 (B) y diagrama explicativo de su funcionamiento (A)	11
Figura 4: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la nano emulsión que contenía mupirocina ... ¡Error! Marcador no definido.	
Figura 5: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la nano emulsión que contenía mupirocina, batimastat e ibuprofeno	¡Error! Marcador no definido.
Figura 6: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la emulsión vacía	¡Error! Marcador no definido.
Figura 7: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de la emulsión con mupirocina.....	16
Figura 8: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de las nanopartículas vacías	17
Figura 9: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de la emulsión tricombinatoria.....	17
Figura 10: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión con mupirocina.....	18
Figura 11: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión vacía	19

Figura 12: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión tricombinatoria.....	19
Figura 13: Diagrama explicativo del protocolo seguido para realizar la medición del retinol en las muestras	20
Figura 14: Respuestas de señal de los componentes de la emulsión y la fase móvil utilizada en el HPLC.....	21
Figura 15: curva de ajuste del retinol obtenida tras aplicar el protocolo de medición	23
Figura 16:Cromatograma de los tiempos de retención del retinol y el retinol oxidado	24
Figura 17: Cromatograma normalizado para observar la diferencia de picos	24
Figura 18: Picos de absorción de longitud de onda para muestras de retinol y retinol oxidado.....	25
Figura 19: Picos de absorción de longitud de onda para muestras de retinol y retinol oxidado.....	27
Figura 20: : cromatograma del tiempo de retención de la muestra donde el CT50 era el origen del retinol.....	28
Figura 21: cromatogramas de los tiempos de retención del Batimastat	32
Figura 22: cromatogramas de los tiempos de retención de la Mupirocina.....	32
Figura 23: cromatogramas de los tiempos de retención del ibuprofeno	33
Figura 24: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de batimastat	34
Figura 25: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de Ibuprofeno.....	34
Figura 26: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de Mupirocina	35
Tabla 1:Encierra un resumen de las medidas más significativas obtenidas en el Masterizar y Zetasizer 12	
Tabla 2:respuesta de señal de las diluciones de la solución de retinol.....	22
Tabla 3: respuesta de señal de las diluciones de la solución de CT50.....	26
Tabla 4:: respuesta de señal obtenida en el HPLC de la mupirocina.....	29
Tabla 5: respuesta de señal obtenida en el HPLC del batimastat.....	30
Tabla 6: respuesta de señal obtenida en el HPLC del Ibuprofeno.....	31
Ecuación 1: Stokes-Einstein	9

1-Objetivos

Los objetivos expuestos previo a la incorporación a CIDETEC eran:

- Síntesis de hidrogeles dinámicos.
- Producción de capsulas de aceite en agua estabilizadas con el ácido hialurónico metacrilato (HA-MA).
- Incorporación de diferentes fármacos en la fase oleosa de las capsulas.
- Incorporación de las capsulas en el hidrogel dinámico (HD), así mismo, estudiar diferentes vías de incorporación de las capsulas en el HD. Durante la producción o postproducción del hidrogel.
- Calcular la eficiencia de incorporación de las capsulas en el HD.
- Estudiar la difusión y liberación de las capsulas a diferentes temperaturas (4, 25 y 35 °C) en el HD.
- Estudiar el perfil de liberación de los fármacos a 35 °C en el HD.

Los objetivos que se terminaron por definir y enmarcaron mi trabajo durante mi estadía en CIDETEC fueron:

- Producción de capsulas de aceite en agua estabilizadas con dextrano metacrilato (DXT-MA).
- Estudio de estabilidad de las capsulas mediante difracción de laser (Laser Diffraction en inglés, siglas LD) y dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering en inglés, siglas, DLS)
- Incorporación de fármacos e ingredientes activos (IA) en la fase oleosa de las capsulas
- Optimización de los métodos de cuantificación de Cromatografía líquida de alto rendimiento (High-Performance Liquid Chromatography en inglés, siglas, HPLC) para la cuantificación de fármacos e ingredientes activos.
- Estudio de liberación de los fármacos e ingredientes activos.

2-Resumen

El proyecto ha consistido en dos fases: a) producción de nanoemulsiones (durante este trabajo, también nos referiremos a ellas como cápsulas) aceite en agua (O/W) cargadas con fármacos o con un ingrediente activo (Retinol en este caso) y b) optimización de métodos de cuantificación de los fármacos/retinol mediante el HPLC.

Una emulsión es una dispersión termodinámicamente inestable de dos o más líquidos inmiscibles o parcialmente miscibles. Aunque estas dispersiones sean termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden volverse cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensioactivos (en nuestro caso un polisacárido funcionalizado o un polipéptido) que tienen la capacidad de adsorberse en las superficies de las gotas. Un aumento de tamaño de cápsulas en el tiempo nos puede indicar la desestabilización de la emulsión, por ello, la primera fase consistió en estudiar la estabilidad de las nanoemulsiones en un periodo de siete días observando cómo variaba el tamaño de partículas mediante DLS y LD.

En la segunda fase, se elaboró un método de HPLC para la separación y cuantificación de retinol y los fármacos encapsulada en las nanoemulsiones. Para llevar a cabo la cuantificación se desarrollaron varias curvas de calibrado dependiendo del fármaco o componente activo.

3-Introducción

El desarrollo de este proyecto surge con la intención de aplicar la nueva y emergente tecnología de las nanoemulsiones, las cuales constituyen un vehículo altamente eficaz para la liberación de componentes activos en diversos productos, tales como cremas, apósitos y otros. En comparación con los métodos tradicionales, las nanoemulsiones ofrecen numerosas ventajas, como una mayor biodisponibilidad, una mejora en la absorción de los componentes activos y una dosificación más precisa. En el contexto de este trabajo, se aprovechan las propiedades de las nanoemulsiones para transportar fármacos o agentes hidrofóbicos, los cuales, por sí solos, suelen presentar una baja absorción y una efectividad reducida.

Para llevar a cabo este proyecto y producir emulsiones cargadas con fármacos, se ha utilizado como fase continua agua y aceite de girasol como fase dispersa. Para obtener emulsiones cinéticamente estables se ha incorporado en la fase acuosa a modo de estabilizante partículas de dextrano metacrilado de cadena única (DXT-SCPN-MA) [1]. Sin embargo, para producir emulsiones que contenían retinol se ha utilizado a modo de estabilizante un polipéptido con respuesta a pH previamente patentando [2] y aceite de soja como fase dispersa.

En el caso de las nanoemulsiones estabilizadas con polisacáridos se han producido tres tipos de capsulas: 1) nanoemulsiones que no contienen ningún tipo de fármaco a las cuales nos referiremos a ellas a lo largo del proyecto como “Unloaded emulsions” 2) nanoemulsiones cargadas únicamente con mupirocina en la fase dispersa, 3) “tricombinatorial” nanoemulsiones que contiene en su fase oleosa mupirocina y batimastat e Ibuprofeno en la fase acuosa.

Un incremento en el tamaño de las gotas de aceite a lo largo del tiempo indicaría que la nanoemulsión no es un sistema estable, lo que resultaría en la pérdida de las propiedades deseadas. Por esta razón, se llevan a cabo estudios de estabilidad para verificar si el tamaño de las gotas se mantiene dentro de los parámetros deseados. En caso contrario, se investigan las posibles causas de esta inestabilidad para encontrar alternativas adecuadas.

Por todo lo mencionado anteriormente, se ha medido tanto el tamaño como la distribución de tamaño de las capsulas cargadas con fármacos a diferentes tiempos mediante difracción de luz laser (LD, MasterSizer 3000 MAZ 6140) y dispersión de luz dinámica (DLS, ZetaSizer ZEN3600).

En el caso de las nanoemulsiones cargadas con retinol no se realizaron estudios de estabilidad ya que ya se habían realizado estos estudios previamente en CIDETEC.

Respecto a la optimización de los métodos de HPLC (Angilent 1100), se realizaron extensas pruebas en el HPLC. Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo principal era desarrollar métodos de cuantificación de fármacos para determinar los perfiles de liberación de cada fármaco tanto en las capsulas como en los sacaffolds (almadio en castellano) cargadas con capsulas.

En el caso del Retinol se buscaba desarrollar un método de cuantificación de HPLC para usarlo a modo de herramienta de control de calidad. Desde el 2009, el uso del Ácido retinoico está prohibido en productos cosméticos (REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL). Así mismo, se sabe por la literatura que el Retinol es un elemento fácilmente oxidable por varios factores como la presencia de oxígeno o radiación UV convirtiéndose en retinal o en ácido retinoico. Por lo que es de vital importancia desarrollar un método de cuantificación de Retinol y Ácido Retinoico para ver si el proceso de producción o el almacenamiento está afectando a la oxidación del Retinol.

4-Estado del arte

4.1-Nanoemulsiones

Las nanoemulsiones son sistemas emulsionados con gotas extremadamente pequeñas, generalmente entre 20 y 500 nm, estabilizadas por surfactantes. Estas emulsiones ofrecen ventajas significativas en cosmética y farmacéutica debido a su facilidad de fabricación, capacidad para controlar el tamaño de las partículas, alta estabilidad cinética y bajos niveles de tensioactivos necesarios. Su estructura permite incorporar eficazmente ingredientes activos lipofílicos e hidrofílicos, facilitando la entrega y absorción en la piel. Además, las nanoemulsiones son versátiles en formulación, pudiendo adaptarse a diversas aplicaciones como cremas, líquidos, espumas y aerosoles, lo que las hace atractivas para múltiples industrias.

Por su bajo diámetro de partícula no se producen drásticos cambios en las propiedades fisicoquímicas, por lo que generalmente en la literatura se utilizan métodos ópticos para caracterizarlas cosa que explicaremos más adelante.

Es importante destacar que una emulsión es una mezcla termodinámicamente inestable de dos o más líquidos no miscibles o parcialmente miscibles, que pueden estabilizarse con agentes tensioactivos. Estos agentes pueden hacer que la emulsión sea estable cinéticamente. Las emulsiones pueden ser de aceite en agua (o/w) o de agua en aceite (w/o), dependiendo de las propiedades del agente emulsificante y la fase continua [3].

Emulsionar líquidos para obtener el tamaño de gota deseado requiere una aplicación considerable de energía cinética, comúnmente realizada mediante un sonicador. Este proceso facilita la dispersión de la fase dispersa en pequeñas gotas dentro de la fase continua. Sin embargo, es crucial seleccionar un estabilizante adecuado para mantener el tamaño de gota deseado y evitar fenómenos de desestabilización no deseados como la floculación, sedimentación, coalescencia y engrosamiento de gotas. [4] La presencia de gotas no interactivas no constituye un estado estable, por lo que la elección del estabilizante es fundamental para asegurar que la nanoemulsión mantenga el tamaño de gota deseado.

4.2-Farmacos y Componentes activos

En una de las dos emulsiones producidas, “tricombinatorial”, se han incorporado tres fármacos; Ibuprofeno, Mupirocina y Batimastat. Dos de ellas en la fase dispersa y la tercera en la fase acuosa. El Ibuprofeno, reconocido por su capacidad para bloquear la formación de prostaglandinas al inhibir la enzima ciclooxigenasa, desempeña un papel crucial en la reducción de la inflamación y el alivio del dolor asociado a lesiones o enfermedades [5].

La Mupirocina, un antibiótico de aplicación tópica, normalmente utilizado para combatir infecciones bacterianas cutáneas [6]. Esta acción antibacteriana se espera contribuya a controlar el crecimiento de bacterias en el área de tratamiento.

Por último, el Batimastat, clasificado como un fármaco antimetastásico y perteneciente a la categoría de inhibidores de la angiogénesis, ejerce su efecto al imitar los péptidos inhibidores naturales de la metaloproteinasa de matriz (MMPI). Además, inhibe la actividad de otras metaloproteasas de matriz como ADAM17, que desencadenan respuestas inflamatorias [7]. Esta propiedad antiinflamatoria del Batimastat se aprovecha para reducir la inflamación tras intervenciones quirúrgicas.

El retinol es el componente activo utilizado en la otra emulsión, y posee una amplia gama de propiedades que lo hacen altamente beneficioso en el cuidado de la piel. Este compuesto es conocido por su capacidad para corregir la hiperpigmentación, reducir la aparición de finas líneas y arrugas, y tratar diversas afecciones dermatológicas.

Además de su efectividad en la corrección de la hiperpigmentación y las señales de envejecimiento, el retinol también ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del acné, la psoriasis, la ictiosis, la queratosis actínica y la dermatitis atópica. Estas propiedades hacen que el retinol sea un ingrediente altamente valorado en la cosmética y sus derivados son ampliamente utilizados en una variedad de productos para el cuidado de la piel [8].

El alto interés en el retinol se debe a su capacidad para mejorar significativamente la apariencia y la salud de la piel, ofreciendo una solución efectiva y versátil para una variedad de preocupaciones dermatológicas. Sin embargo, es importante utilizar productos que contengan retinol con precaución y seguir las recomendaciones de uso para evitar posibles irritaciones o sensibilidades cutáneas.

5-Metodos y resultados

5.1-Seccion experimental

5.1.1-HPLC

La cromatografía líquida de alto rendimiento es un método analítico que permite, separar, identificar y cuantificar los componentes en una mezcla.

El método consiste en separar los componentes de una mezcla, debido a los distintos grados de interacción de sus componentes con las partículas absorbentes de la columna, lo que provoca distintas velocidades de elución para cada componente de la mezcla, esto tiene como consecuencia la separación de estos a medida que fluyen a través de la columna. El tiempo de elución es también llamado tiempo de retención que es el tiempo que se toma el analito desde que entra a la columna hasta llegar al detector [9].

Para detectar y cuantificar los fármacos encapsulados (ibuprofeno, batimastat y mupirocina) en las emulsiones se utilizó como fase móvil del HPLC una mezcla a partes iguales de propanol y agua miliQ y se utilizó la columna Angilent, eclipse XDB-C18 – 4.6*150 mm, 5 μ m. El flujo fue ajustado gradualmente hasta llegar a 0.8 ml/min.

Las longitudes de onda de excitación UV dependían del fármaco que se estuviese midiendo, primero se utilizaron los hallados en la literatura los cuales para ciertos fármacos arrojaban bajas respuestas de señal por lo que se decidió determinar experimentalmente, utilizando el HPLC; la longitud de onda que arrojara la mejor respuesta de señal. A partir de esto se encontró que, para la mupirocina, el batimastat y el ibuprofeno las longitudes de onda de absorción óptima eran 221, 200 y 198 respectivamente.

En el caso de las emulsiones cargadas con Retinol, para llevar a cabo la cuantificación del retinol mediante el HPLC se utilizó como fase móvil 87.4% de hexano, 11.2% de etil acetato y 1.4% de octanol y la columna kromaphase 100 C18, 5 μ m, 250 \times 4.6 mm. El flujo fue ajustado gradualmente hasta llegar a 1 ml/min y la longitud de onda de excitación UV a la cual fue sometida la muestra fue a 325 nm. En la figura 1 se puede observar un diagrama del funcionamiento de este dispositivo.

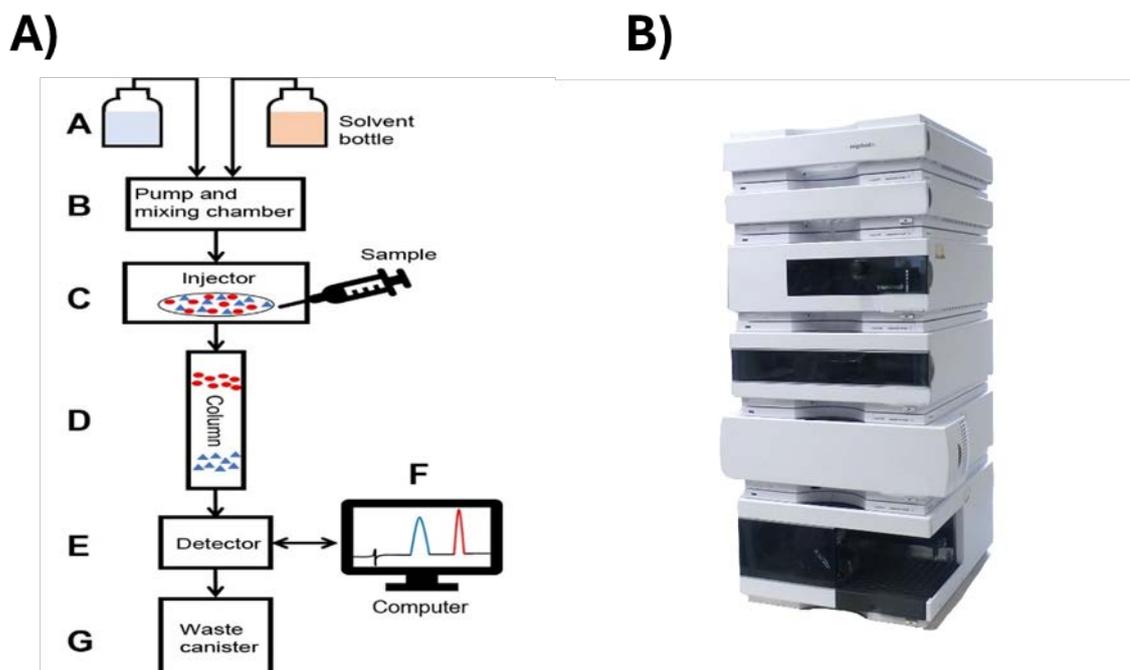


Figura 1 A) Diagrama de principios de funcionamiento de la técnica del HPLC (i) B) Imagen de un dispositivo HPLC (ii)

5.1.2-DLS

La dispersión dinámica de la luz o ingles dynamic lighth scattering (DLS) es el método más común para analizar el tamaño de partículas en el rango nanométrico y se puede observar su funcionamiento en la figura 2.

La DLS se basa en el movimiento browniano de las partículas dispersas. Cuando las partículas se dispersan en un líquido, se mueven aleatoriamente en todas direcciones debido a las colisiones con las moléculas del disolvente. Este fenómeno explica que las partículas colisionen constantemente con las moléculas del disolvente, lo que resulta en la transferencia de energía y, por ende, en el movimiento de las partículas [10].

Es importante destacar que esta transferencia de energía es más notable en partículas más pequeñas debido a su mayor sensibilidad, lo que se traduce en movimientos más rápidos en comparación con las partículas de mayor tamaño [11]. Esta relación entre el tamaño de partícula y su velocidad es explicada por la ecuación de Stokes-Einstein.

$$Rh = \frac{kT}{6\pi\eta D_T}$$

Ecuación 1: Stokes Einstein

Donde k es la constante de Boltzman , T es la temperatura de la muestra y η es la viscosidad del líquido donde se encuentran suspendidas las partículas. Los valores de estos parámetros son previamente conocidas. El zetasizer mide el coeficiente de difusión (D) a partir de los fenómenos descritos anteriormente. De esta forma teniendo todos los valores y la ecuación de Stokes-Einstein se vuelve trivial despejar el radio hidrodinámico de las partículas.

Dentro del contexto de este trabajo trabajaremos con dos medidas, el z-average que es la media del radio de las partículas en suspensión y el PDI (polidispersitivy index) que nos indica la uniformidad de los radios de partícula, donde 1 sería que todas las partículas comparten el mismo radio y 0 que todas tienen radios distintos.

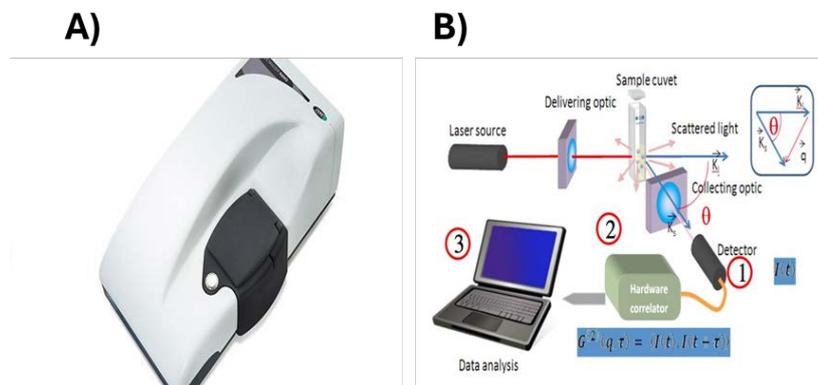


Figura 2:A) Imagen del dispositivo DLS ZEN3600 (iii) (A) B) breve explicación de su principio de funcionamiento (iv)

5.1.3-Difracción Laser

La difracción láser es una técnica empleada para determinar la distribución del tamaño de partículas al analizar cómo cambia la intensidad de la luz dispersada cuando un rayo láser atraviesa una muestra con partículas dispersas. En este proceso, las partículas más grandes tienden a dispersar la luz en ángulos más pequeños en comparación con el rayo láser, mientras que las partículas más pequeñas generan dispersión en ángulos más amplios. Los datos obtenidos de la intensidad de la dispersión angular se analizan utilizando la teoría de dispersión de la luz de Mie para calcular el tamaño de las partículas responsables del patrón observado, representando el tamaño como un diámetro de esfera equivalente en volumen. Esta técnica presenta varias ventajas significativas, como un amplio rango dinámico que abarca desde partículas microscópicas hasta milimétricas, la rapidez en las mediciones que permite obtener resultados en menos de un minuto, y la consistencia, gracias a que cada medición incluye un gran número de partículas, garantizando resultados repetibles y fiables. Además, proporciona retroalimentación instantánea que permite supervisar y ajustar el proceso de dispersión en tiempo real, facilitando la optimización de los procedimientos experimentales. Su alto rendimiento en el análisis de muestras permite realizar cientos de mediciones diarias, siendo ideal en contextos de producción o investigación intensiva. No requiere calibración, ya que su verificación se puede realizar fácilmente con materiales de referencia estándar, lo que simplifica el mantenimiento y asegura la precisión. Además, está respaldada por la norma ISO 13320 (2009), lo que asegura su confiabilidad y comparabilidad en distintos equipos y laboratorios.

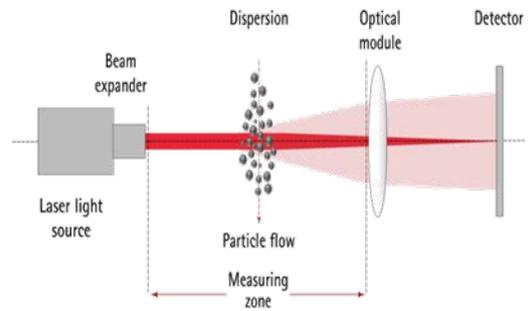
A)**B)**

Figura 3:A) Imagen del Mastersizer 3000 MAZ 614 0 (v) B) diagrama explicativo del funcionamiento del Mastersizer 3000 (vi).

5.2-Producción y caracterización de las nanoemulsiones

Para producir nanoemulsiones cargadas con fármacos se siguió el siguiente protocolo:

1. Pesar 50 mg de DXT-SCPN-MA en un vial de 10 mL.
2. Añadir 4.5 mL de H₂O mili Q al vial del polímero.
3. Disolver el polímero en el roller mixer 1 hora aproximadamente.
4. Filtrar la disolución del polímero por un filtro de PDVF de 0.22 μm
5. En el mismo vial pesar el aceite (Aceite de girasol) y el fármaco a utilizar el cual es encapsulado en esta fase.
6. Sónicar la emulsión durante 6 min con agitación magnética a 300 rpm. Máxima amplitud y frecuencia en un baño de hielo.

En la tabla 1 se presentan los valores de z-average, PDI, D [4;3] y uniformidad obtenidos mediante DLS y LD a 0 y 3 días de las emulsiones cargadas con Mupirocina, “tricombinatorial” y la emulsión control (sin cargar, unloaded emulsion).

Zetasizer (DLS)				Mastersizer (LD)	
Emulsión estudiada	Tiempo	z-average (nm)	PDI	D [4,3] (nm)	uniformidad
Mupirocina (0.06 mg)	0 horas	404 ± 10	0.39 ± 0.09	818	0.633
	3 días	343 ± 2	0.25 ± 0.01	771	0.634
Tricombinatoria(mupirocina (0.06 mg), batimastat (1.9 µg), ibuprofeno(3 mg))	0 horas	180 ± 1	0.20 ± 0.01	408	0.155
	3 días	166 ± 2	0.17 ± 0.02	82000	0.361
Unloaded emulsion	0 días	331 ± 5	0.42 ± 0.02	N/A	N/A
	3 días	278 ± 2	0.30 ± 0.03	N/A	N/A
	7 días	311 ± 7	0.36 ± 0.07	720	0.562
	15 días	230 ± 2	0.26 ± 0.01	741	0.559

Tabla 1: Resumen y caracterización (DLS y LD) de las emulsiones (O/W) producidas con el sonicador al 10% de fase dispersa (aceite de girasol) con 1 wt% de estabilizante (DXT-SCPN-MA).

Según los datos obtenidos mediante el zetasizer (DLS) observamos una tendencia general de que el diámetro de las partículas disminuya a lo largo que pasa el tiempo y de que de que la emulsión es estable ya que no se observan cambios significativos de PDI. Respecto a los datos obtenidos mediante el mastersizer (LD) observamos que las emulsiones cargadas con Mupirocina y unloaded emulsión mantienen su tamaño de gota de aceite y uniformidad a 0 y 3 días. A diferencia de las otras dos emulsiones la tricombinatoria emulsión presenta un cambio muy drástico de D [4,3] y uniformidad lo que en una primera instancia nos indicaría que la emulsión producida no es estable. Sin embargo, al aumento de estos valores se ha asociado con la susceptibilidad del LD ya que el mastersizer sufre alteraciones en las medidas debido a la manera en la que se depositan las muestras. Hay una probabilidad alta de que se

contaminen con partículas de muestras anteriores afectando el resultado de las medidas de manera drástica. En el caso de este experimento se llegó a la conclusión de que el cambio tan drástico se debía a una contaminación o una mala medida de la muestra, ya que posteriormente se realizaron pruebas adicionales con otro lote de tricombinatorial emulsion y no se observaron cambios en los valores de D [4,3] y uniformidad a tiempo 0 y 3 días.

Como bien se ha mencionado anteriormente, el DLS mide el tamaño hidrodinámico (D_h) de partículas que experimentan un movimiento browniano. Se limita generalmente a medir tamaños de partículas en la región submicrométrica. Además, las medidas realizadas mediante el DLS resultan problemáticas para las muestras polidispersas debido a que su capacidad de resolución es relativamente baja. Por lo tanto, para las muestras polidispersas, el valor primario Z-average (media ponderada de intensidad armónica) puede inducir a error, ya que la media Z-average asume una distribución de tamaños monodispersa. Por otro lado, el LD se utiliza habitualmente para medir distribuciones de tamaño de partículas en el rango de micrométrico y puede ser menos adecuado para la caracterización de (nano)emulsiones con tamaños de partícula inferiores a 100 nm. Además, a diferencia del DLS, el LD utiliza la teoría de Mie para calcular el tamaño de las partículas, por lo que uno de los parámetros más críticos en LD es el índice de refracción tanto de las partículas medidas como del medio de dispersión. Además, a diferencia del parámetro Z-Average del DLS, el tamaño de partícula de LD se ve afectado por el algoritmo de análisis de datos utilizado por el software específico. Por todo ello y teniendo en cuenta las características de nuestras muestras, capsulas monodispersas en el rango de los nanómetros, nos fiaremos más en los datos obtenidos mediante el DLS.

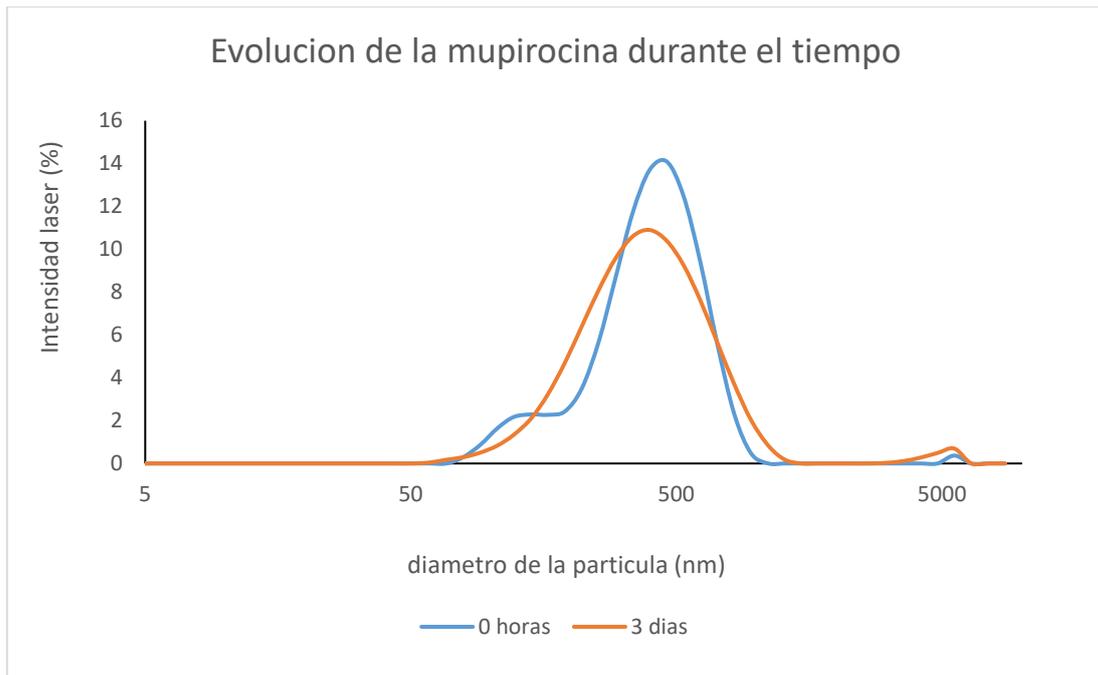


Figura 4: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la nano emulsión que contenía mupirocina

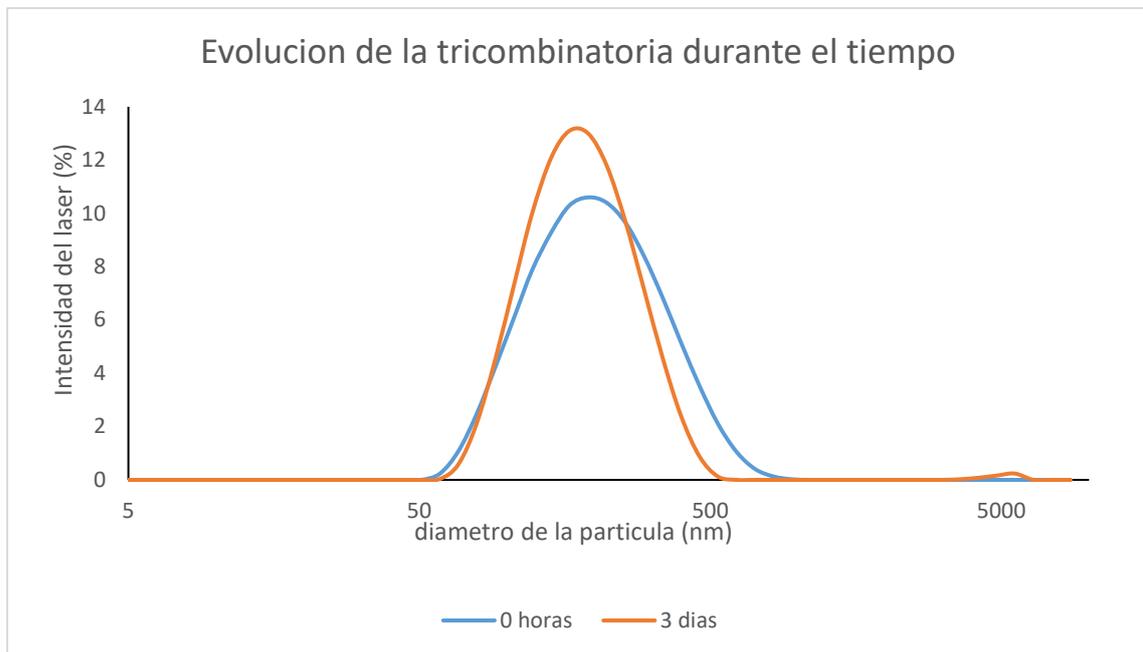


Figura 5: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la nano emulsión que contenía mupirocina, batimastat e ibuprofeno

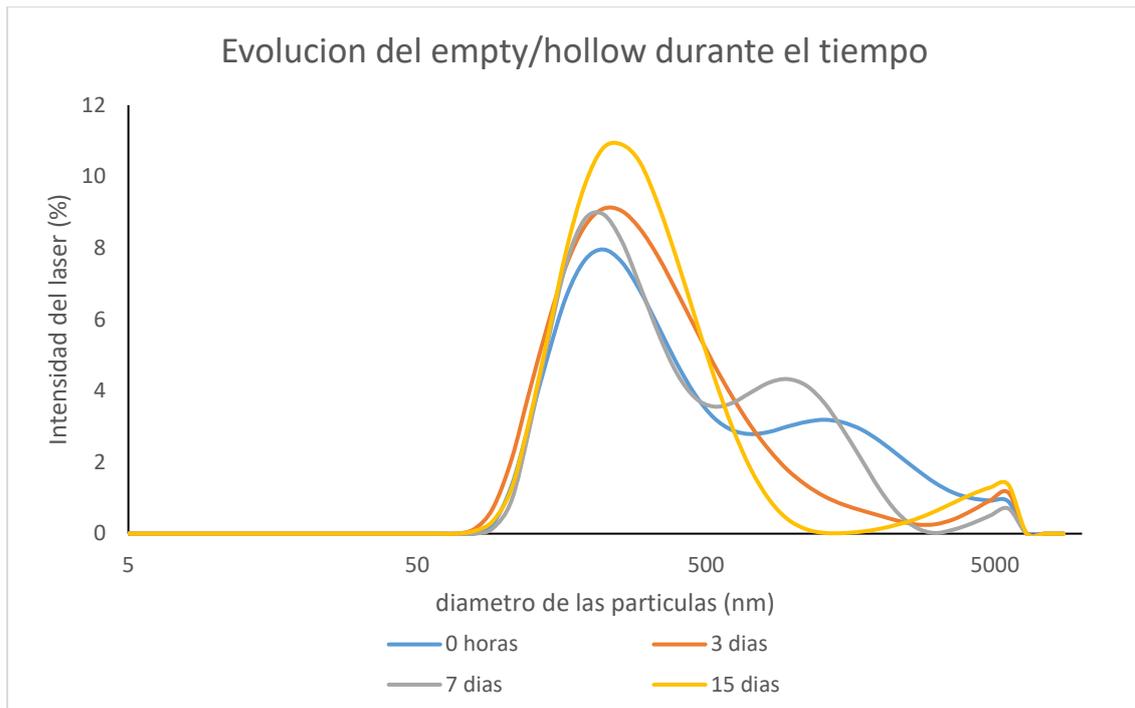


Figura 6: Análisis y distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer de la emulsión vacía

En estos gráficos se observa como las capsulas se estabilizan con el tiempo (de tiempo 0 a 3 días) ya que, con el paso de los días, las curvas de las emulsiones cargadas con mupirocina y unloaded emulsion evolucionan pasado de tener dos o más picos a tener un único pico más estrecho y alto. Esto nos indica que los tamaños de partícula tienden a seguir una distribución de tipo normal.

Dependiendo de la cantidad de fármacos que tiene introducida la emulsión nos percatamos de que el diámetro de las nanopartículas cambia, llama la atención que las partículas con menor tamaño son las que llevan los tres fármacos, esto se debe a que quizás la formación de las nanopartículas más pequeñas se ve favorecida por la presencia de fármacos en la fase continua que es el ibuprofeno, ya que en el caso de la mupirocina y la vacía comparten tamaños de nanopartícula bastante parecidos hasta los tres días, además las concentraciones de mupirocina en las nanoemulsiones de tricombinatoria y mupirocina se mantienen igual por lo que no sería un factor influyente.

La estabilidad según estas graficas también se ve favorecida por la presencia de fármacos ya que los cambios de distribución de poblaciones son menos bruscos en comparación con los que podemos observar en la emulsión de nanopartículas Unloaded emulsion que a pesar de tener la misma tendencia de aumentar su estabilidad con el tiempo presenta variaciones más significativas que las demás.

Observando tal comportamiento creemos que los fármacos pueden actuar como de co-estabilizantes, mejorando la estabilidad de las emulsiones. Para comprobar este efecto lo mejor sería producir una emulsión sin DXT-SCPN_MA con los fármacos a modo de control. De esta forma se valoraría la capacidad de estabilización de los fármacos. Sin embargo, por falta de tiempo no se han realizados estos ensayos.

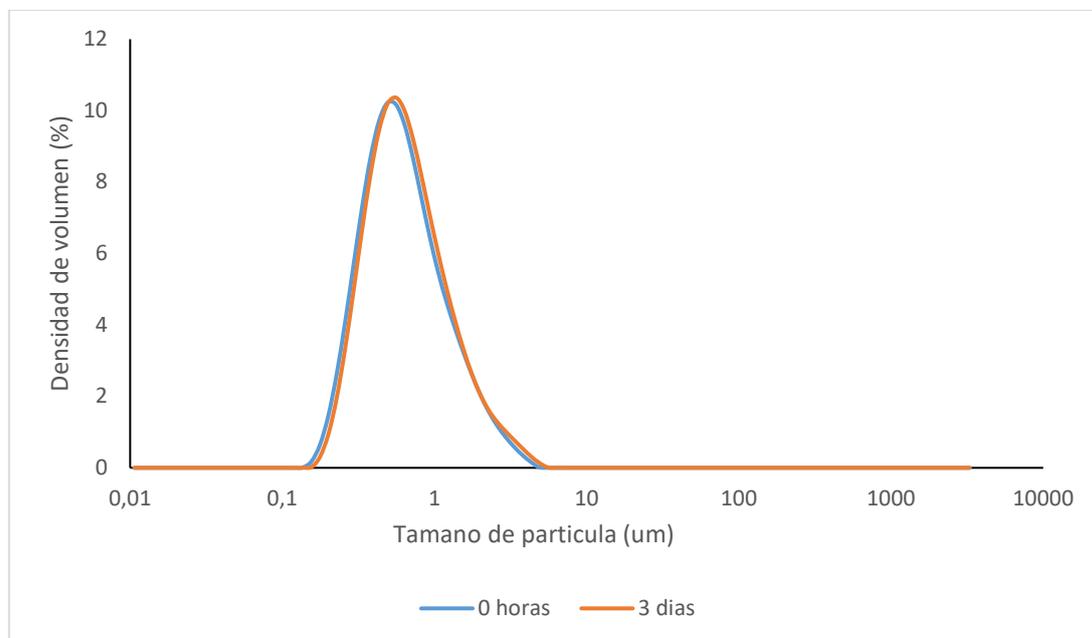


Figura 4: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de la emulsión con mupirocina

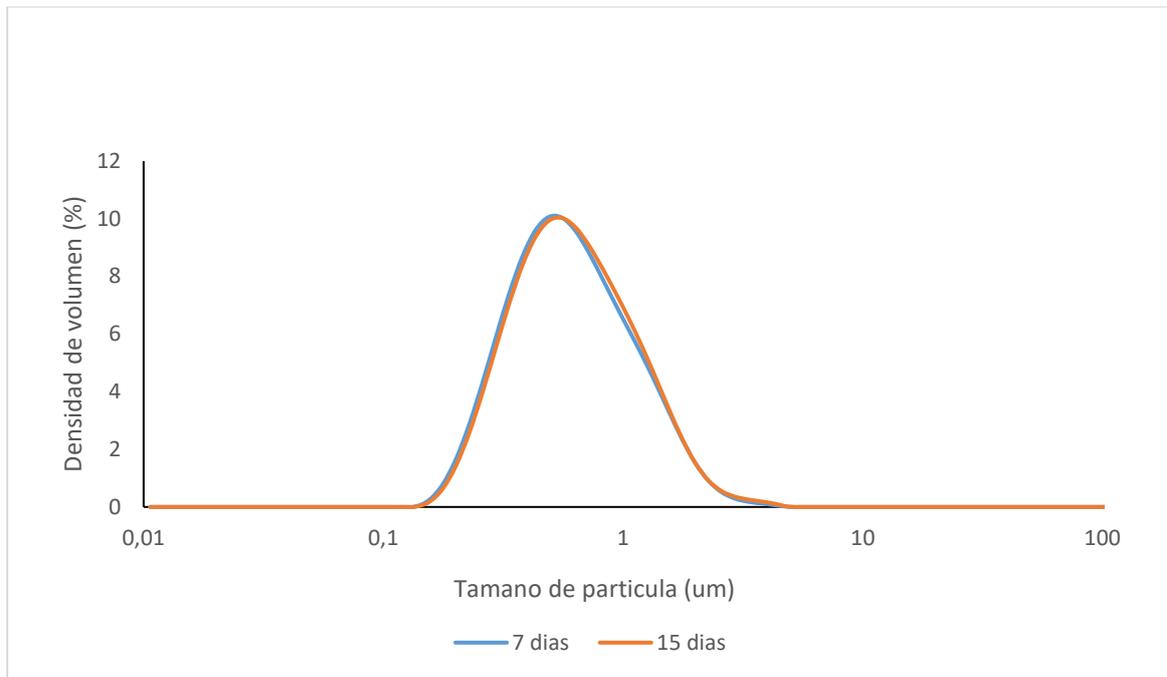


Figura 5: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de las nanopartículas vacías

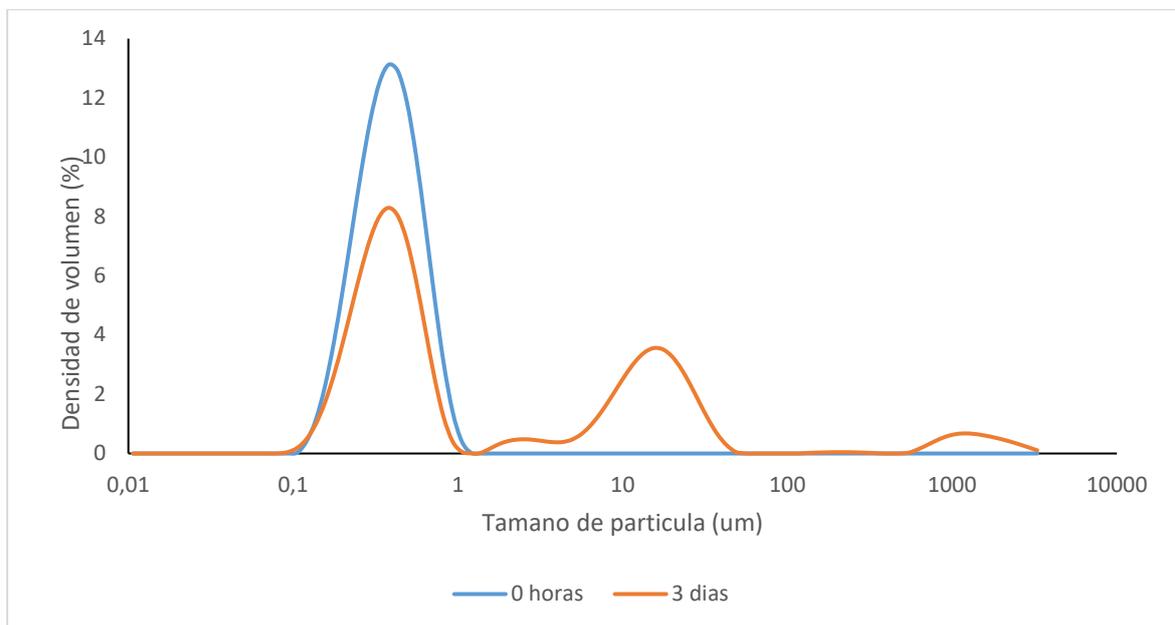


Figura 6: distribución de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Mastersizer de la emulsión tricombinatoria

Como mencionábamos anteriormente las medidas realizadas mediante LD a las emulsiones tricombinatorias no se han obtenido los resultados esperados debido a una contaminación en la medición.

Para las otras emulsiones (unloaded y mupirocina emulsión) vemos que a pesar del cambio de la distribución de tamaño de gotas aceite determinado por el LD se solapan casi completamente las gráficas de distribución de tamaño, por lo que se puede concluir que las capsulas de distintos tamaños no ha sufrido un cambio significativo a los tres días de producirlos.

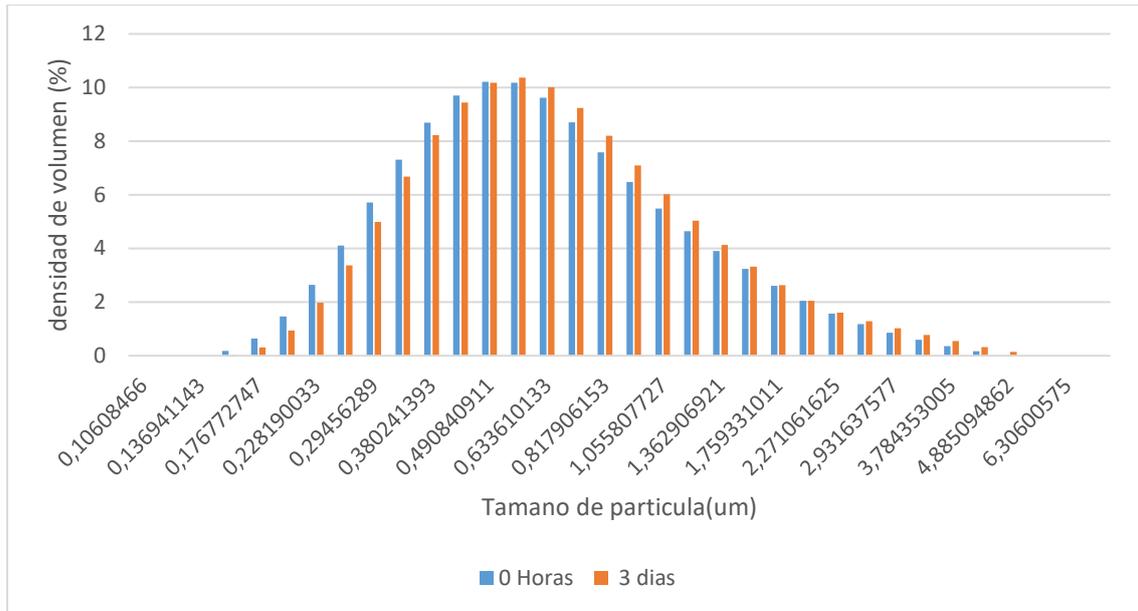


Figura 7: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión con mupirocina

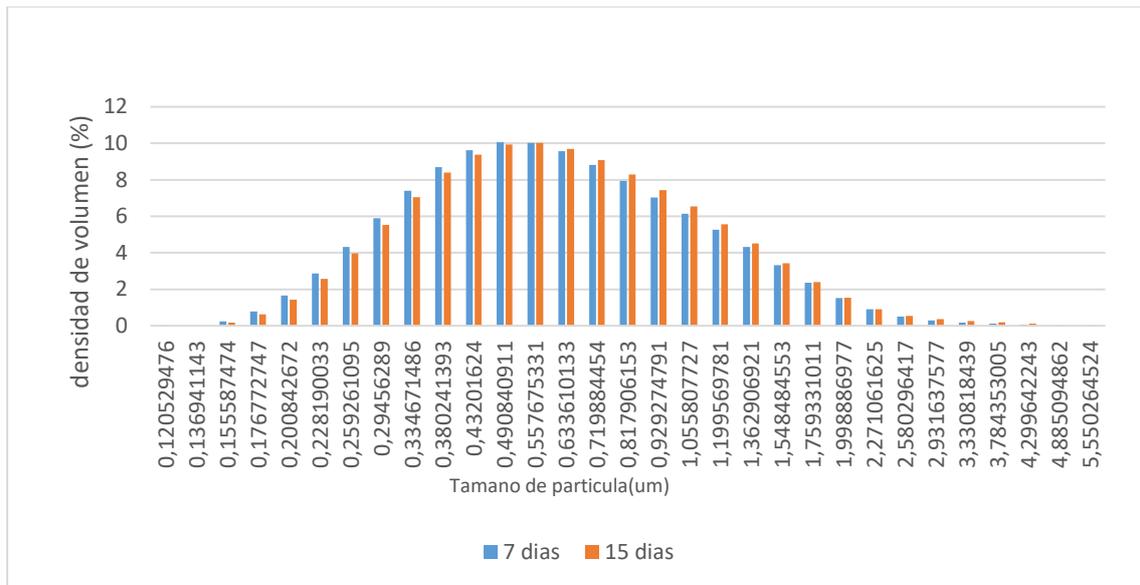


Figura 8: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión vacía

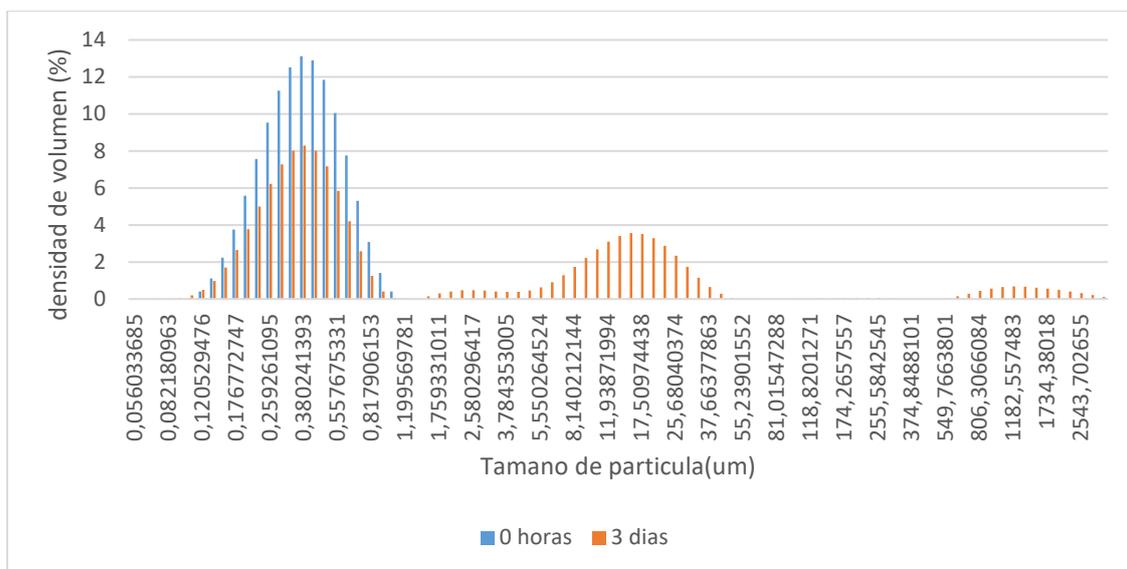


Figura 9: Análisis de los tamaños de partícula en la emulsión medidos por el Zetasizer a lo largo de del tiempo de la emulsión tricombinatoria

Con la ayuda de las figuras 9 hasta la 12 nos percatamos de que nuestras observaciones anteriores son correctas ya que las poblaciones de capsulas de mayor tamaño aumentan con el paso del tiempo, sin embargo, la distribución de las poblaciones no se ve afectada de manera significativa.

5.2-Medición de retinol mediante la utilización del HPLC

Antes de realizar la curva de calibrado se llevaron a cabo varias pruebas para encontrar las condiciones óptimas de caracterización del retinol mediante el HPLC, Se observó que utilizando como fase móvil una solución de hexano, nitrilo acetato y octanol (las concentraciones se pueden observar en la figura 13), columna kromaphase 100 C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm donde el retinol presentaba una señal bien definida a los 2.42 min. Finalmente, como bien se refleja en la figura 13, para obtener una buena curva de calibrado se prepararon 10 muestras a diferentes concentraciones conocidas de retinol en viales de cristal de topacio, ya que el retinol es fotosensible, partiendo de una disolución madre de retinol a 0.1 mg/mL. Una vez realizadas estas diluciones se analizaron las diez muestras preparadas mediante el HPLC.

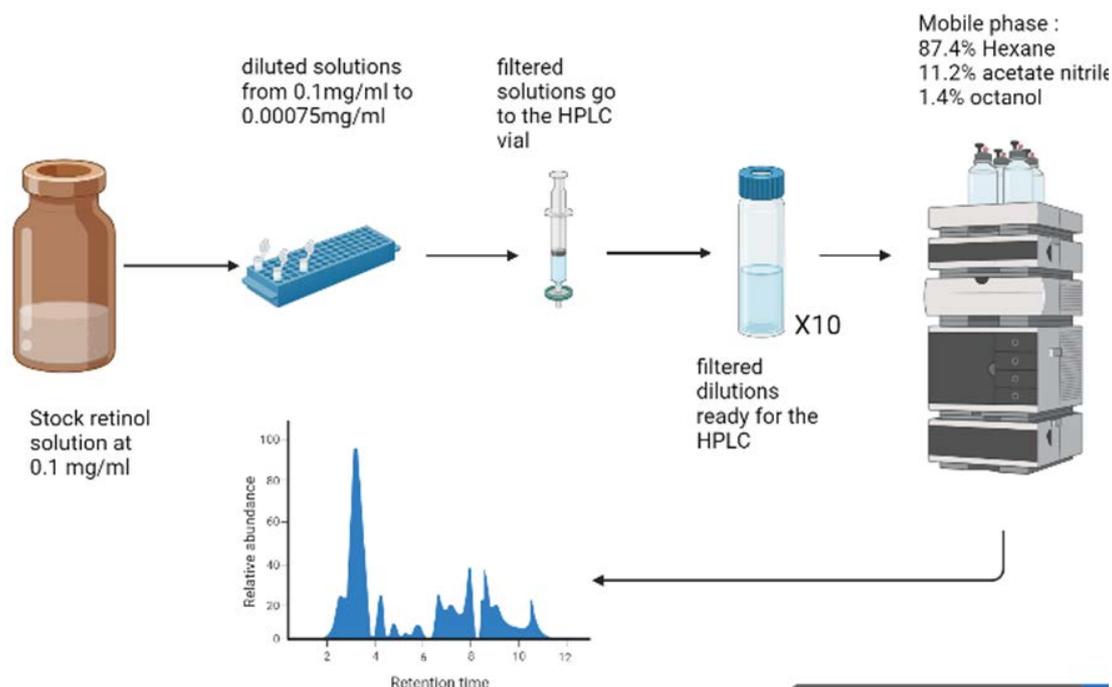


Figura 10: Diagrama explicativo del protocolo seguido para realizar la medición del retinol en las muestras

Sin embargo, antes de realizar la curva de calibrado del retinol, se verificó que ninguno de los compuestos de la emulsión cargada con retinol, a parte del retinol, así como también la fase móvil presentaban señal en el HPLC (en las condiciones reflejadas en la figura 14) que pudiese interferir con la correcta identificación del retinol.

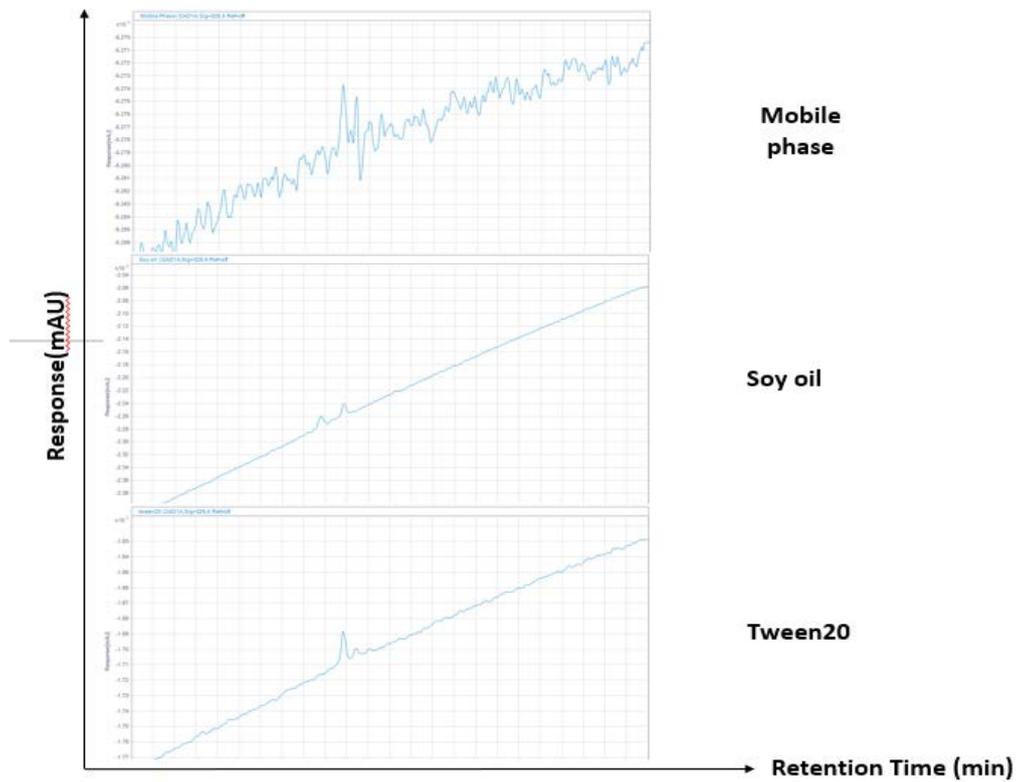


Figura 11: Respuestas de señal de los componentes de la emulsión y la fase móvil utilizada en el HPLC

Como se puede observar en los cromatogramas obtenidos mediante el HPLC en la figura 14 ni los componentes de la emulsión ni la fase móvil presentaban señal en los cromatogramas, por lo que se procedió a realizar la curva de calibrado del retinol siguiendo el protocolo previamente mencionado.

5.3-Curva calibración estándar de retinol

Para las mediciones del estándar de retinol se realizaron tres inyecciones para cada una de las diluciones para luego obtener la media de la respuesta de señal. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos después de realizar las medidas del área de la señal característica de retinol XXXX min.

Concentración retinol (mg/ml)	Área inyección 1 (mAU ²)	Área inyección 2 (mAU ²)	Área inyección 3 (mAU ²)	Área media (mAU ²)	Desviación estándar (mAU ²)
0.1	3200	3201	3201	3201	0.6
0.075	2534	2541	2540	2538	3.8
0.05	1649	1644	1646	1646	2.5
0.025	816	815	817	816	1
0.01	384	385	386	385	1
0.075	201	201	201	201	0
0.005	158	158	157	158	0.6
0.0025	70	70	70	70	0
0.001	31	32	31	31	0.6
0.0075	25	26	25	25	0.6

Tabla 2: Resumen de las áreas obtenidas de la señal característica del retinol diferentes concentraciones.

Como se puede observar en la tabla, la tendencia es que a medida que disminuye la concentración de retinol en las muestras la respuesta de señal también baja y a medida que la concentración va disminuyendo las diferencias en respuestas de señal se van haciendo más pequeñas, siendo el límite superior 0.2 mg/ml y el límite inferior la concentración 0.001 mg/ml valores por encima o por debajo de estas concentraciones tendrán una respuesta de señal similar y poco diferenciable por lo que medir la concentración de retinol en muestras donde su concentración sobrepase estos límites no es recomendable con este método ya que puede dar lecturas erróneas.

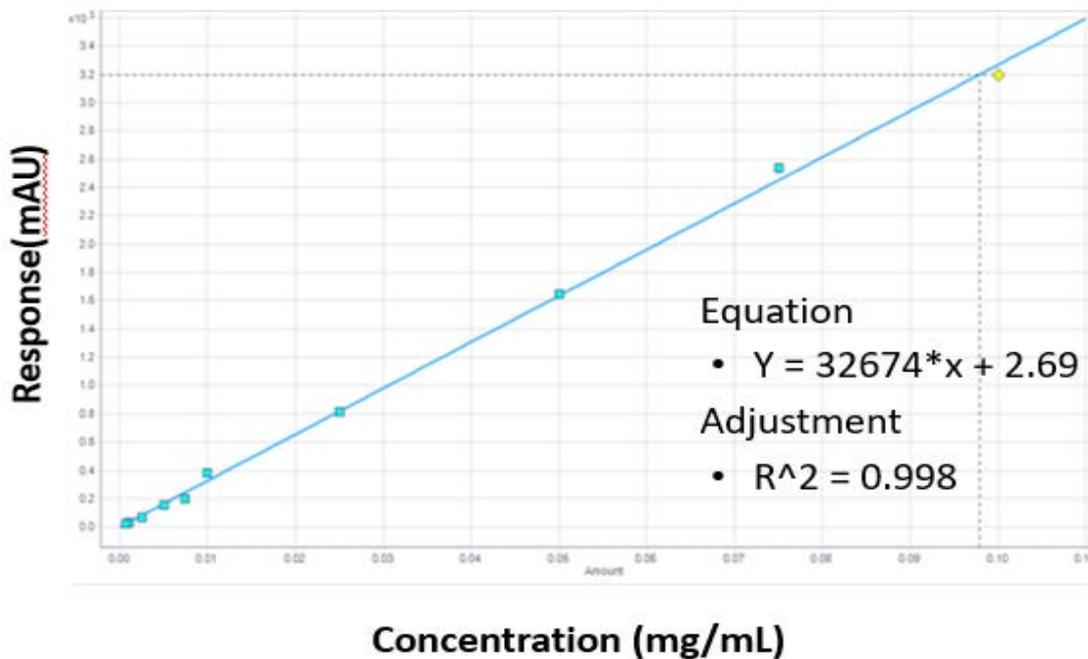


Figura 12: Recta de calibrado del retinol en el rango 0.1-0.0075 mg/mL.

Representando los valores de área obtenidos a diferentes concentraciones de retinol se ha realizado la recta de calibrado del retinol. La recta de ajuste obtenida como se ve en la figura tiene un ajuste bastante alto lo que nos indica que las mediciones realizadas fueron muy buenas. De esta forma se ha establecido un método de HPLC que nos permite conocer la concentración de retinol que tenemos en diferentes muestras simplemente inyectando la muestra a una concentración conocida en el HPLC.

5.4-Cromatogramas del retinol, el retinol oxidado y proveedores del retinol

Como se dijo previamente se quería observar si había alguna diferencia en la respuesta de señal ente el retinol y sus derivados por oxidación, por lo que se realizó una dilución de 0.1 mg/ml donde el retinol había sido oxidado exponiéndolo a oxígeno y a luz ultravioleta que luego fue medida en el HPLC y comparada con una solución de la misma concentración de retinol.

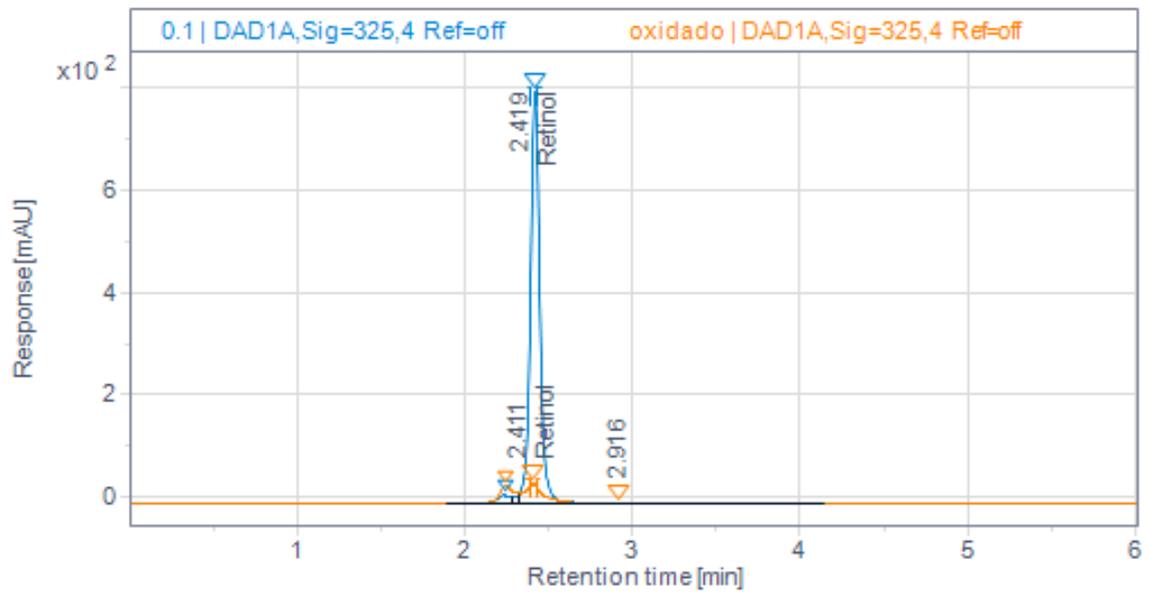


Figura 13: Cromatograma de los tiempos de retención del retinol y el retinol oxidado

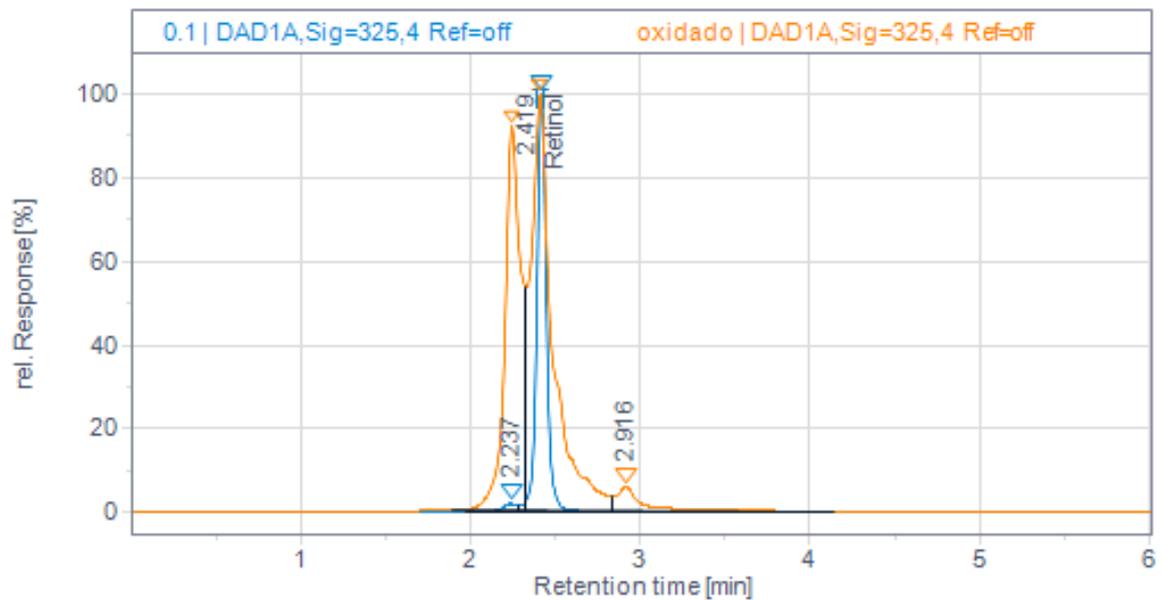


Figura 14: Cromatograma normalizado para observar la diferencia de picos

Como se puede observar en la figura 16 el retinol tiene un pico marcado de señal donde el tiempo de retención es 2,419 minutos lo que nos indica que se ha detectado correctamente

la sustancia en el HPLC en las condiciones optimizadas. Sin embargo, en el caso del retinol oxidado observamos tres picos con una respuesta de señal muy baja que pudiesen ser distintos productos derivados de la oxidación del retinol.

Así mismo se aprovechó las capacidades de medición del HPLC para comprobar que la longitud de onda de absorción teórica del retinol era la óptima.

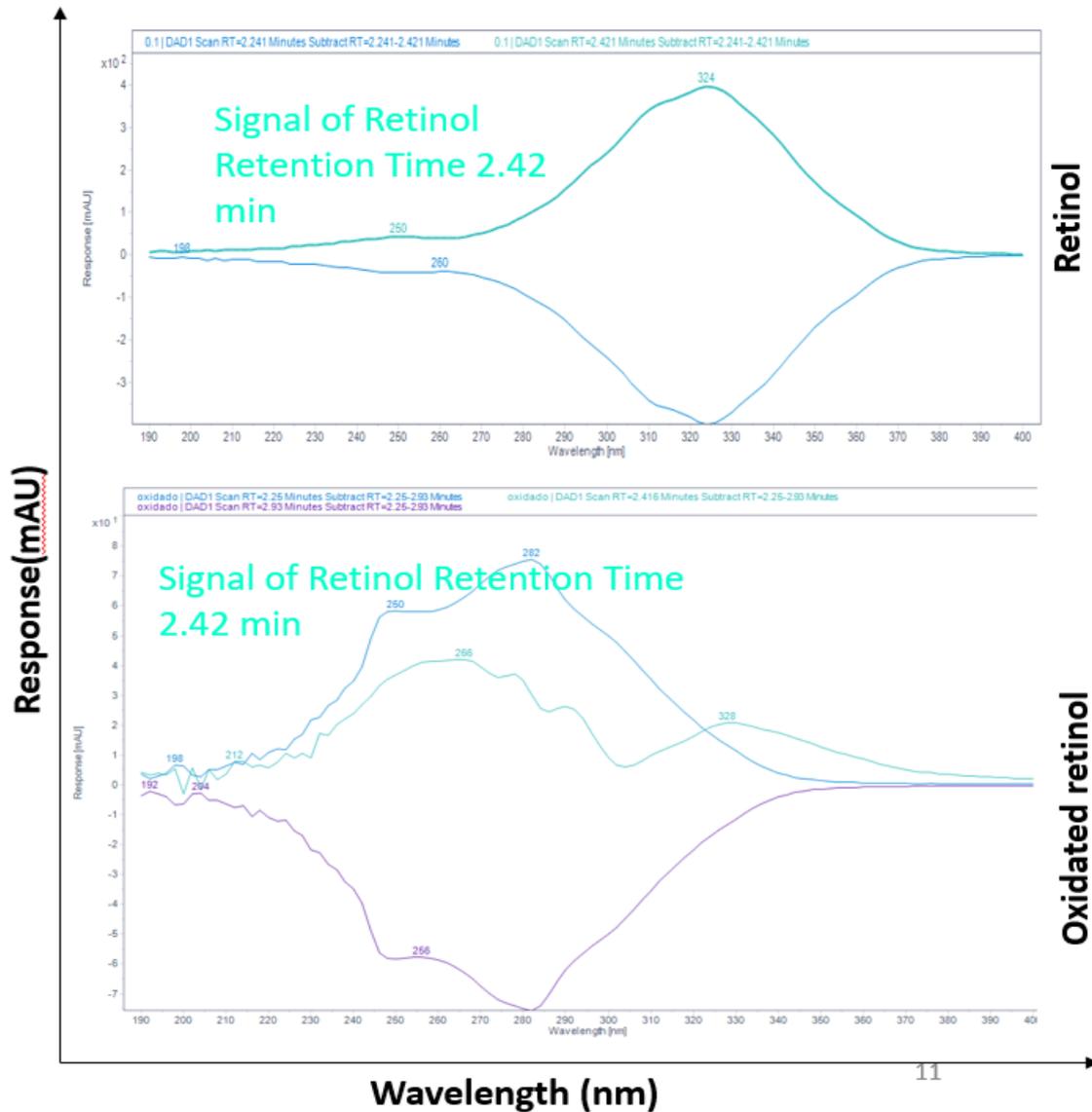


Figura 15: Picos de absorción de longitud de onda para muestras de retinol y retinol oxidado

Como se ve en la figura 18 en el grafico superior, la línea azul dibuja el grado de absorción del compuesto en un barrido de longitudes de onda donde observamos que la longitud de onda

de absorción teórica y la real coinciden siendo 324 nm en ambos casos. además podemos observar las longitudes de onda a las cuales los componentes procedentes de la oxidación absorben la luz siendo 284 y 266 nm dibujadas por las líneas azules del grafico inferior de la figura 18 donde estos producen una respuesta de señal más baja en comparación al retinol.

Finalmente, con todas estas mediciones procedimos a analizar el retinol suministrado por el proveedor para observar si había alguna diferencia respecto al estándar de retinol, ya que el producto que ofrecía el proveedor a diferencia de los retinoles previamente analizados no era 100% retinol si no una mezcla de polisorbato, retinol y tocoferol. Por lo tanto se quería ver si el tiempo de retención del estándar y del retinol de proveedor concedían por lo que se inyectó una concentración conocida del retinol del proveedor para ver si concedía con la ficha de especificaciones del retinol y por ultimo hacer una curva o recta de calibrado para cuantificar el retinol.

Concentración retinol (mg/ml)	Área inyección 1 (mAU²)	Área inyección 2 (mAU²)	Área inyección 3 (mAU²)	Área media (mAU²)	Desviación estandar (mAU²)
0.1	3353	3353	3354	3353	0.58
0.075	2361	2364	2365	2363	2.08
0.05	1491	1491	1494	1492	1.7
0.025	574	576	576	575	1.15
0.01	309	308	309	308.6	0.58
0.075	209	210	216	211.7	3.79
0.005	157	153	153	154.3	2.31
0.0025	74	74	74	74	0
0.001	32	32	33	32.3	0.58
0.0075	23	24	24	23.7	0.58

Tabla 3: respuesta de señal de las diluciones de la solución de CT50

De manera interesante los datos obtenidos al medir el CT50 siguen un patrón muy parecido al retinol, lo que nos que confirma que sin importar el origen del retinol seremos capaces de medirlo.

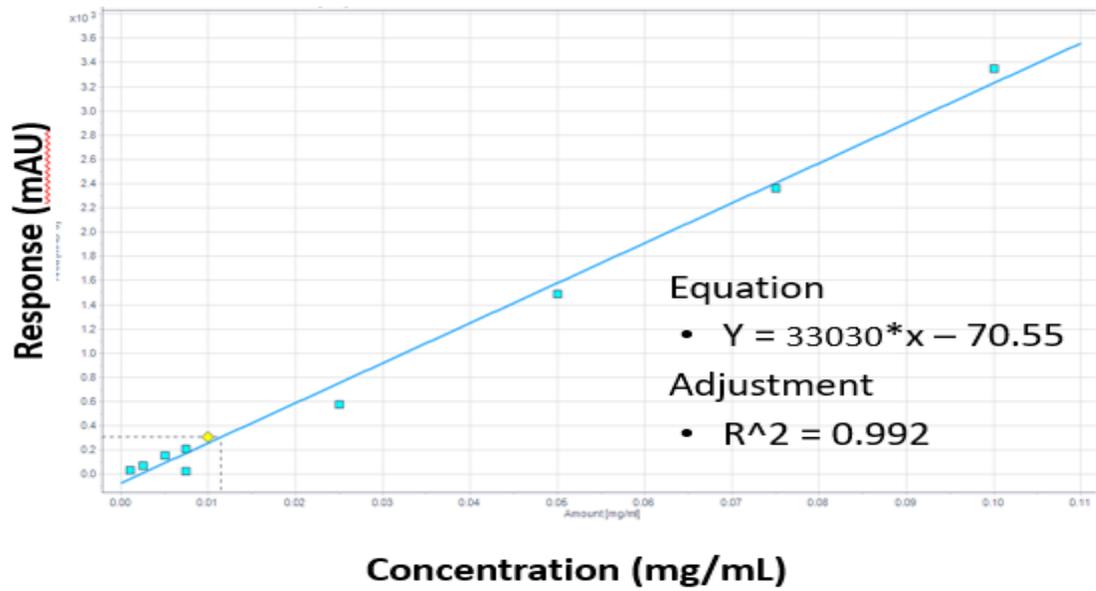


Figura 16: Recta de calibrado del retinol suministrado por el proveedor (Retinol CT50) en el rango 0.1-0.0075 mg/mL.

Con respecto a la recta de calibrado en la figura 19 se obtuvo un ajuste menor que la anterior (retinol estándar) pero no deja de ser una herramienta adecuada para mediciones de concentración en las emulsiones donde la concentración de retinol es desconocida.

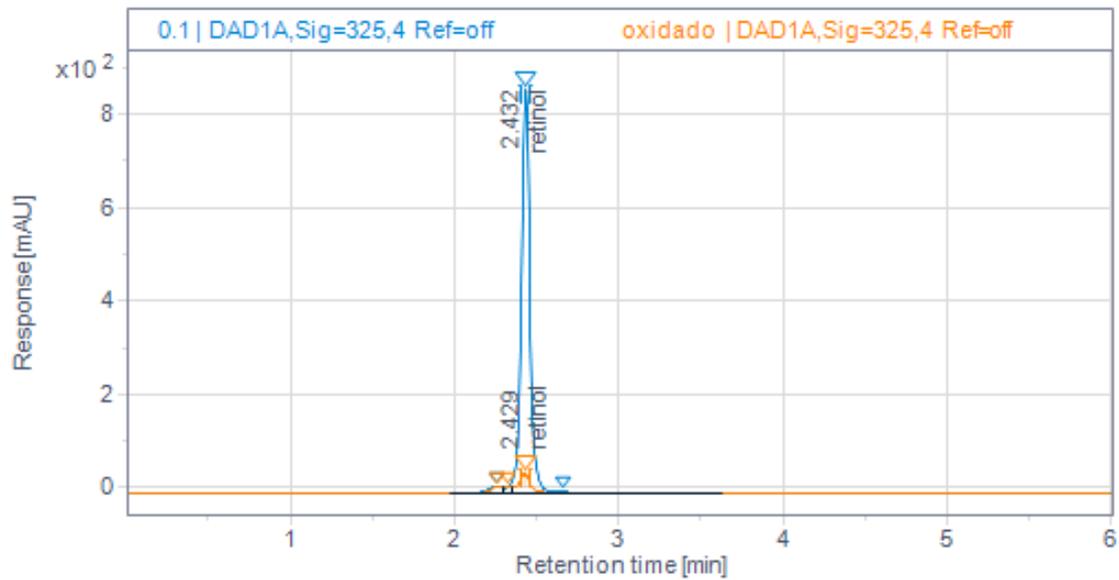


Figura 17: cromatograma del tiempo de retención de la muestra donde el CT50 era el origen del retinol

Como se observa en el cromatograma de la figura 20 el CT50 y el retinol también comparten tiempos de retención muy similares además que su respuesta de señal estando a la misma concentración es también muy parecida, por lo que podemos asegurar que trabajar con el producto del proveedor es seguro y más importante reproducible para todas las emulsiones.

5.5-Estudio de la liberación de fármacos mediante el HPLC

Una vez que se han desarrollado las capacidades para producir emulsiones con fármacos y para manejar y comprender el HPLC, se han creado nuevos métodos de HPLC y sus correspondientes curvas de calibración. La intención es utilizar el HPLC para investigar la liberación de los fármacos desde las cápsulas y desde las cápsulas integradas en los andamios. Para detectar los fármacos mediante el HPLC se ha utilizado como fase móvil propanol y agua miliQ a partes iguales y la columna Angilent, eclipse XDB-C18 – 4.6*150 mm, 5 um. El flujo fue ajustado gradualmente hasta llegar a 0.8 ml/min.

Cada fármaco presenta diferentes perfiles de absorción de luz. Para realizar la cuantificar de los fármacos generalmente se utiliza la longitud de onda donde el fármaco tiene su máxima absorbancia (longitud de onda de máxima absorción). Para realizar las pruebas preliminares,

se utilizaron en un principio las longitudes de onda hallados en la literatura(mupirocina 320-400 nm, batimastat 250 nm e ibuprofeno 200 nm). Sin embargo, ciertos fármacos arrojaban bajas respuestas de señal por lo que se decidió determinar experimentalmente, utilizando el HPLC; la longitud de onda que arrojara la mejor respuesta de señal. A partir de esto se encontró que, para la mupirocina, el batimastat y el ibuprofeno las longitudes de onda de máxima absorción eran 221, 200 y 198.

A continuación, se muestran las respuestas de señal obtenidas de los fármacos a distintas concentraciones:

Concentración (mg/ml)	Área inyección 1 (mAU ²)	Área inyección 2 (mAU ²)	Área inyección 3 (mAU ²)	Área media (mAU ²)	Desviación estandar (mAU ²)
0.1	2354	2368	2345	2355.67	11.59
0.075	1901	1886	1889	1892	7.94
0.05	1313	1311	1308	1310.67	2.52
0.025	783	685	791	753	59.03
0.01	393	382	380	385	7
0.0075	313	314	306	311	4.36
0.005	285	262	230	259	27.62
0.025	175	156	162	164.33	9.71
0.001	143	162	141	148.67	11.59
0.00075	123	121	136	126.67	8.14

Tabla 4: Areas obtenidas de la señal característica de la mupirocina a diferentes concentraciones (0.1-0.00075 mg/m).

Concentración (mg/ml)	Área inyección 1 (mAU ²)	Área inyección 2 (mAU ²)	Área inyección 3 (mAU ²)	Área media (mAU ²)	Desviación estandar (mAU ²)
0.2	1837	1831	1836	1834.67	3.21
0.15	1445	1443	1443	1443.67	1.154
0.1	935	938	940	937.677	2.52
0.05	454	450	451	451.67	2.08
0.02	190	191	192	191	1
0.015	133	135	134	134	1
0.01	96	94	93	94.33	1.53
0.005	46	47	45	46	1
0.002	22	22	22	22	0
0.0015	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

Tabla 5: Areas obtenidas de la señal característica de batimastat a diferentes concentraciones (0.2-0.0015 mg/m).

Concentración (mg/ml)	Área inyección 1 (mAU ²)	Área inyección 2 (mAU ²)	Área inyección 3 (mAU ²)	Área media (mAU ²)	Desviación estandar (mAU ²)
0.25	N/A	6679	6628	6653.5	36.0624458
0.1875	6603	3903	3912	4806	1556.25416
0.125	3881	2775	2815	3157	627.321289
0.0625	2869	1831	1819	2173	602.783543
0.025	1829	768	758	1118.333333	615.475697
0.01875	766	592	642	666.666667	89.5842248
0.0125	609	360	334	434.333333	151.823362
0.00625	327	173	156	218.666667	94.20368
0.0025	177	70	78	108.333333	59.6014541
0.0019	78	76	53	69	13.892444

Tabla 6: Areas obtenidas de la señal característica de ibuprofeno a diferentes concentraciones (0.25-0.0019 mg/m).

A partir de estos resultados y observar las altas respuestas de señal del ibuprofeno y de la mupirocina, se decidió que para el estudio se utilizarían la señales obtenidas para 200 nm de longitud de onda ya que en esta longitud de onda se obtiene una respuesta de señal satisfactoria para todos los fármacos.

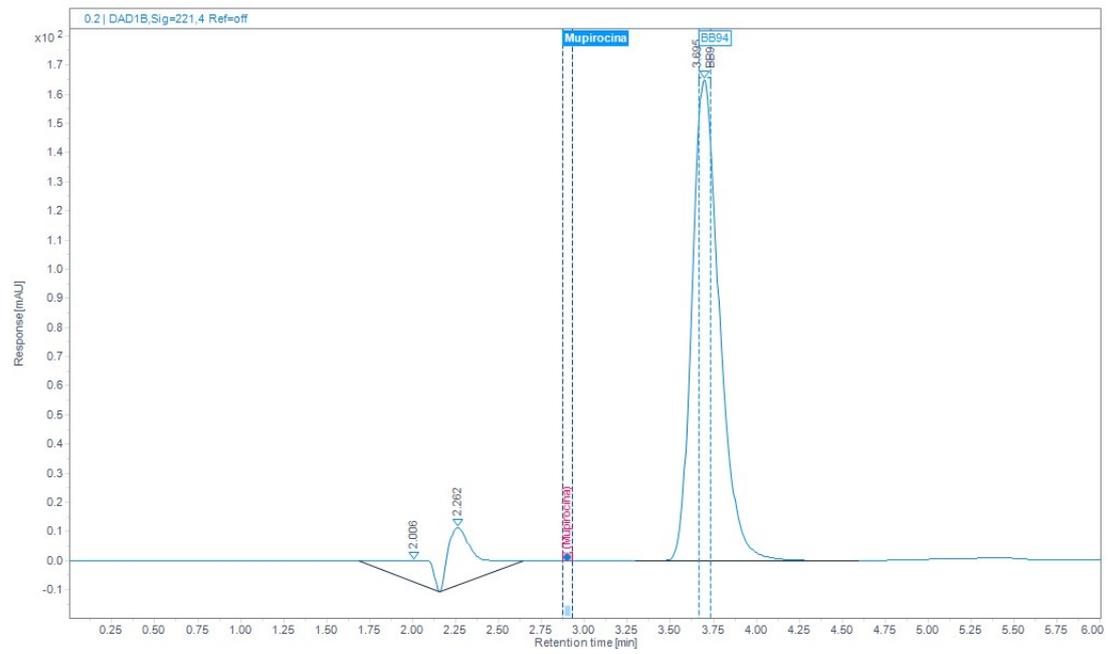


Figura 18: cromatogramas de los tiempos de retención del Batimastat

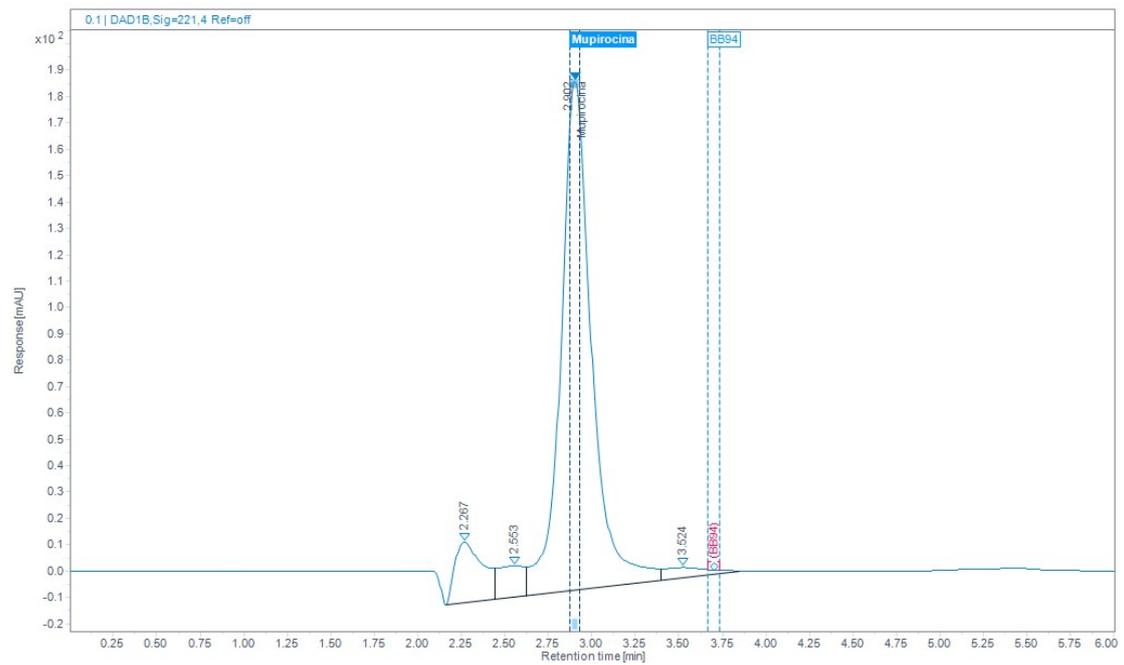


Figura 19: cromatogramas de los tiempos de retención de la Mupirocina

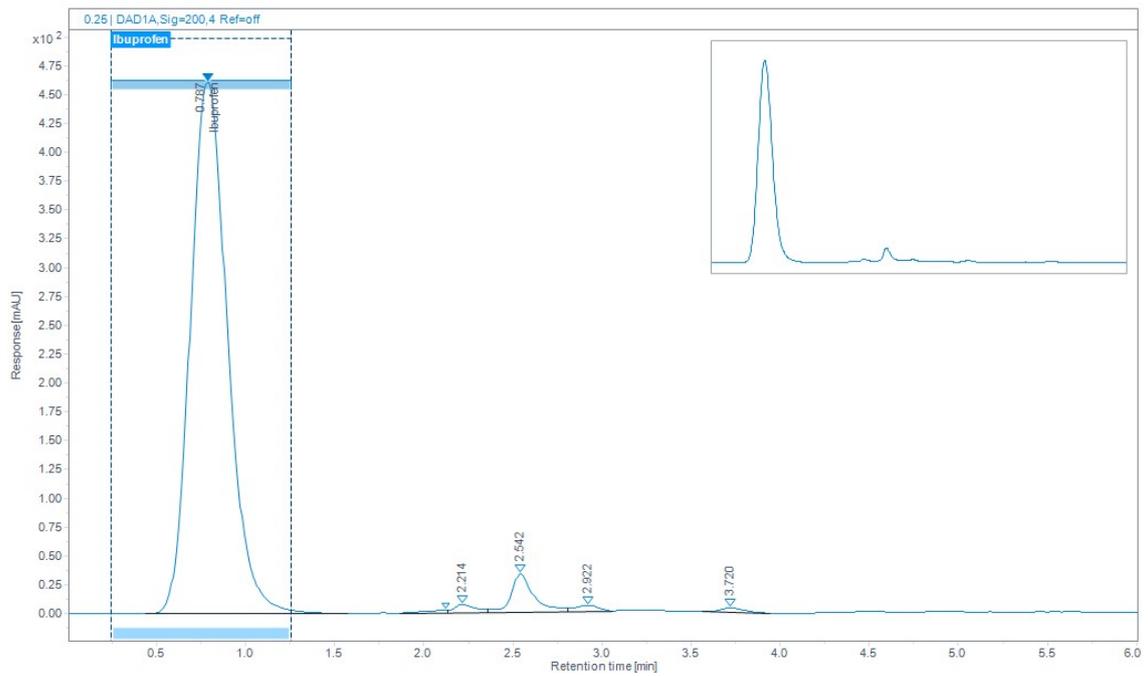


Figura 20: cromatogramas de los tiempos de retención del ibuprofenoU

Gracias a los cromatogramas observamos cuales son los tiempos de retención de los fármacos lo que nos permitirá realizar la curva de calibrado, para el batimastat es de 3,695 min, la mupirocina de 2,908 min y del ibuprofeno 0,787 min. Por otra parte a todos tener un tiempo de retención distinto se nos abre la posibilidad de medir todos estos fármacos a la vez lo que nos facilitaría hacer un estudio de reléase.

Calibration Curve

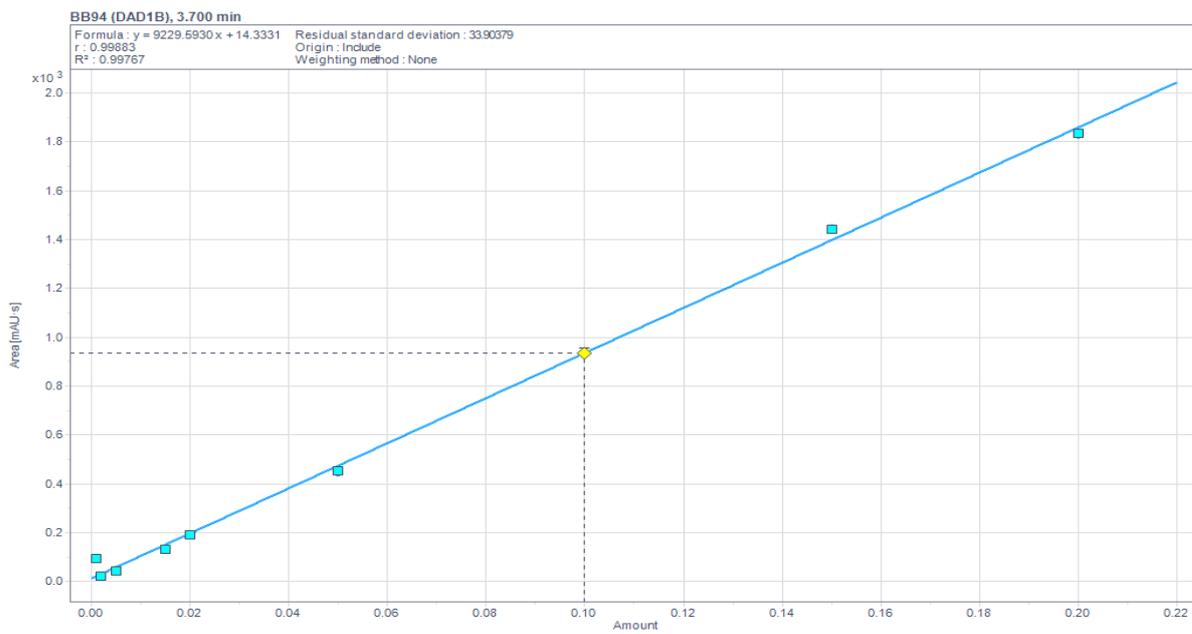


Figura 21: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de batimastat

Calibration Curve

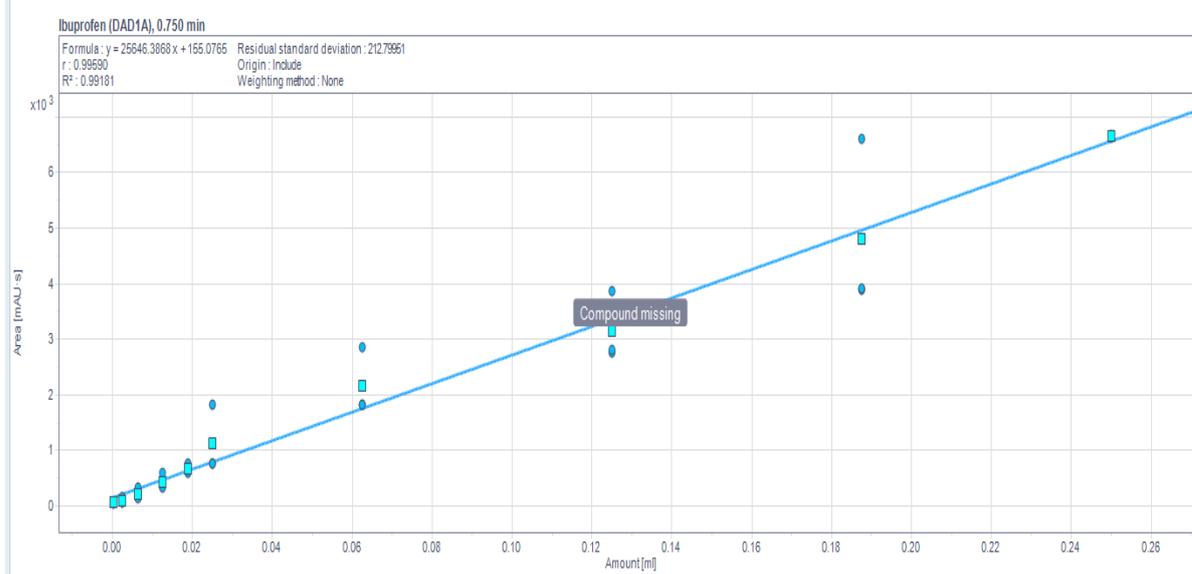


Figura 22: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de Ibuprofeno

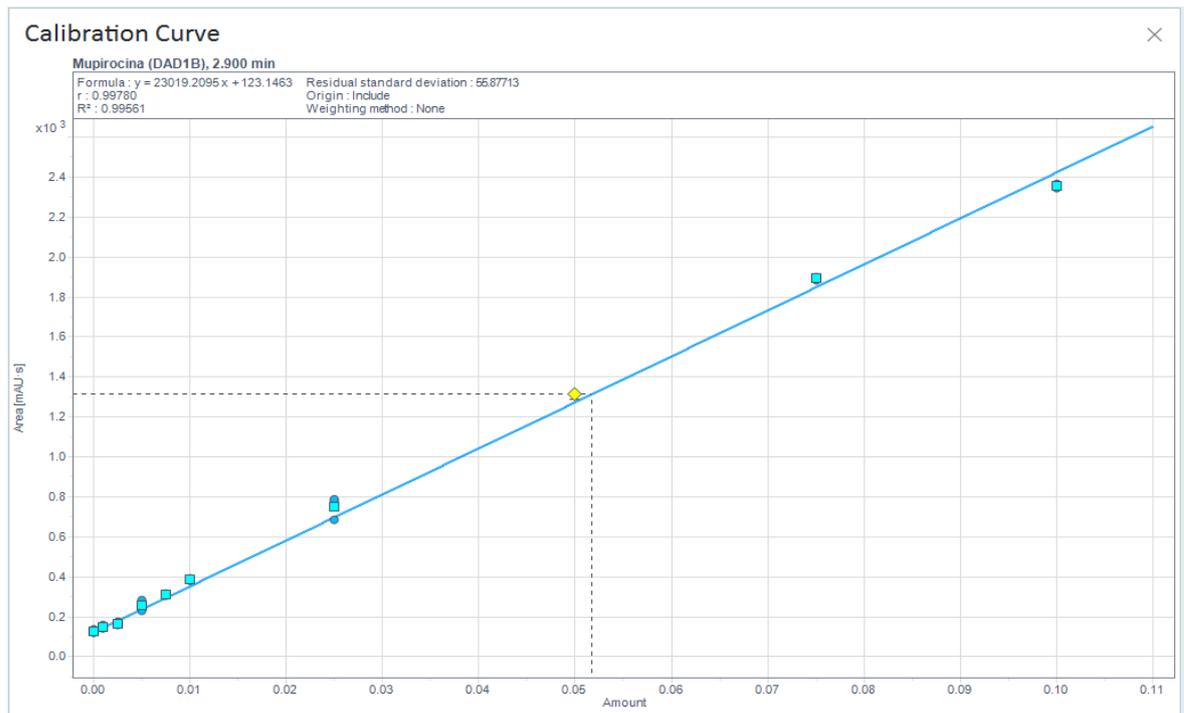


Figura 23: Curva de calibrado obtenida para las concentraciones de Mupirocina

Con respecto a las curvas de calibración que obtenemos un ajuste lo bastante bueno como para utilizarlo para predecir las concentraciones liberadas por las capsulas de la nanoemulsión experimental propuesto más adelante.

6-Conclusiones

En relación a la producción de las capsulas cagadas con diferentes compuesto se ha observado mediante los datos obtenidos que con el paso de los días hay un aumento de las poblaciones de partícula de mayor tamaño, sin embargo, esto no afecta de manera significativa la distribución de las poblaciones ya que esta se mantiene al pasar los días. Partiendo de esta observación podemos concluir que para estabilizarse la emulsión realizada favorece la formación de nanopartículas en comparación con otros métodos de estabilización como la floculación o el "creaming effect".

Lo anterior nos garantiza que las capsulas mantendrán su estructura por un periodo largo de tiempo además la introducción de fármacos ayuda a mantener la estabilidad de la nanoemulsión, por lo que podríamos afirmar que podría ser un método efectivo para la distribución de componentes farmacológicos.

Con respecto a las mediciones del HPLC nos percatamos que es una herramienta útil y confiable para poder mantener un control de calidad con las emulsiones producidas, ya que con las curvas de calibrado generadas podemos medir las concentraciones de retinol, para observar si su concentración se ha mantenido con el tiempo y además se ha demostrado que somos capaces de detectar los derivados de retinol oxidado no deseados, consolidando la utilidad del HPLC como una herramienta para el control de calidad.

Además, a lo largo del proyecto hemos logrado desarrollar un metodo para medir de manera eficiente las concentraciones de retinol en cualquier muestra y evitar fallos en lecturas por el manejo erróneo de estas ya que con el protocolo desarrollado evitamos la oxidación del retinol en las muestras disminuyendo la presencia de productos de oxidación en las medidas.

Para resumir, hemos visto que se han optimizado de manera exitosa los métodos de detección de los fármacos del HPLC, Se han realizado las curvas de calibrado de mupirocina, ibuprofeno y batimastat, y que con estos métodos optimizados somos capaces de estudiar los perfiles de liberación de los fármacos tanto en calas capsulas como en los andamios cargados con los fármacos.

Como se ha podido observar dentro del marco de este trabajo vemos que se han cumplido varios de los objetivos propuestos en concreto el perfil de liberación de los fármacos, la producción y mantenimiento de las gotas, la incorporación de las capsulas funcionalizadas a un scaffold comercial y se han también desarrollado tareas que no estaban previamente

previstas antes de mi incorporación como el estudio y comportamiento del retinol como fase oleosa en una nanoemulsion. Es importante mencionar que la posibilidad de incorporar la nano emulsión al hidrogel dinámico fue descartada ya que no se habían hecho los suficientes avances con este como para comenzar y terminar la tarea dentro de mi estadía en la empresa.

7-Líneas futuras

Diseño experimental

Al terminar las curvas de calibrado de los fármacos ya tenemos todas las herramientas necesarias para poder realizar un estudio de liberación de los fármacos una vez han sido incorporados en el scaffold. Sin embargo, por temas de tiempo no se pudo terminar el estudio de reléase de las nanocapsulas/gotas de aceite incorporadas por lo que se propuso este diseño experimental para estudiarlo en un futuro.

El diseño experimental fue realizado tomando varios aspectos de la literatura científica disponible, y es el siguiente:

Condiciones:

- Temperatura 37 °C
- pH 7.4
- Scaffold en suspensión de PBS
- Suspendido en un vial de 30 mL de una solución de PBS
- Placa agitadora para mantener la temperatura y agitación de la solución

Mediciones:

- Alícuotas de 6ml cada 30 hasta 3 horas y luego cada hora hasta cumplir las 5h
- Reponer el PBS extraído
- Liofilizar las alícuotas
- Resuspender en 20 μ l y medir las concentraciones de batimastat y mupirocina, de esos 20 μ l coger 5 μ l y diluir su concentración en 15 μ l adicionales.
- Filtrar y analizar las muestras por el HPLC
- Recoger la intensidad y determinar la concentración con las curvas de calibrado

Tratado de datos

- Con las concentraciones obtenidas realizar una curva de reléase a través del tiempo

8-Referencias

- [1] Navascuez, M., & Dupin, D. (2022). NATURAL ORIGIN STABILIZER FOR OIL IN WATER EMULSIONS (Patent N.o WO2021122942A1). En European patent office (WO2021122942A1). ZBM patent.
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/069411191/publication/WO2021122942A1?q=WO2021122942A1>
- [2] DUPIN, D., & LOIDAZ, I. (2023). USE OF A COPOLYMER FOR THE STABILISATION OF AN EMULSION (Patent N.o EP3691779). En LECOMMANDOUX SÉBASTIEN (N.o EP3691779). ZBM patents.
<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/060186215/publication/EP3691779B1?q=EP3691779B1>
- [3] Monroy, R., & Pereira, J. (2020). Estado del arte. Avances recientes en el diseño de nanoemulsiones: conceptos y tendencias sobre nanocosméticos.
<https://www.redalyc.org/journal/707/70767026003/html/>
- [4] Wu, F., Zhou, Z., Su, J., Wei, L., Yuan, W., & Jin, T. (2013). Development of dextran nanoparticles for stabilizing delicate proteins. *Nanoscale Research Letters*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/1556-276x-8-197>
- [5] Ibuprofeno, antiinflamatorio. Nombre comercial: Alginasin, Algidrin, Alogesia, Apirofeno, Brufen, Dalsy, Dersindol, Dolencar, Dolorac, Doltra, Espididol, Espidifen, Fenospin, Ibufarmalid, Ibufen, Ibumac, Junifen, Liderfeme, Neobrufen, Nodolfen, Norvectan, Nurofen, Paidofebril, Pirexin, Ratiiodol, Totalgil, Gelofeno, Saetil. (s. f.). <https://www.cun.es>.
<https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/ibuprofeno-antiinflamatorio>
- [6] Mupirocina. Nombre comercial: Bactroban, Plasimine. (s. f.). <https://www.cun.es>.
<https://www.cun.es/enfermedades-tratamientos/medicamentos/mupirocina>
- [7] Batimastat - CAS 130370-60-4 - CalBiochem | 196440. (s. f.).
https://www.merckmillipore.com/ES/es/product/Batimastat-CAS-130370-60-4-Calbiochem,EMD_BIO-196440

- [8] Kedishvili, N. Y. (2016). Retinoic Acid Synthesis and Degradation. *Sub-cellular Biochemistry/Subcellular Biochemistry*, 127-161. https://doi.org/10.1007/978-94-024-0945-1_5
- [9] Sahu, P. K., Ramiseti, N. R., Cecchi, T., Swain, S. K., Patro, C. S., & Panda, J. D. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006>
- [10] Bhattacharjee, S. (2016). DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- [11] Guialab. (2018, 4 septiembre). Comprendiendo y desafiando los límites de la técnica DLS - Guialab. Guialab. <https://www.guialab.com.ar/notas-tecnicas/comprendiendo-y-desafiando-los-limites-de-la-tecnica-dls/>
- [12] Eshel, G., Levy, G. J., Mingelgrin, U., & Singer, M. J. (2004). Critical evaluation of the use of laser diffraction for Particle-Size distribution analysis. *Soil Science Society of America Journal*, 68(3), 736–743. <https://doi.org/10.2136/sssaj2004.7360>

Imágenes

- (i) Arnold, E. (2017, 26 mayo). *The HPLC system: simply explained*. MPL Lösungsfabrik. <https://mpl.loesungsfabrik.de/en/english-blog/high-performance-liquid-chromatography/hplc-system-simply-explained>
- (ii) *Sistema HPLC, PrimaideTM*. (s. f.). VWR. <https://es.vwr.com/store/product/9463922/sistema-hplc-primaidetm>
- (iii) Iesmat. (2023, 26 junio). *Zetasizer Lab - IESMAT*. IESMAT - Soluciones Tecnológicas Para Su Aplicación. <https://iesmat.com/equipos/zetasizer-lab/>
- (iv) Inside Therapeutics. (2024, 22 agosto). *LNP characterization guidelines: Size, PDI, Morphology - Inside Therapeutics*. <https://insidetxt.com/review/lnp-and-liposomes-characterization-guidelines/>

- (v) *Particle Size Analyzer MasterSize 3000 Series - Gabbrielli*. (2023, 3 noviembre). Gabbrielli.
<https://www.gabbrielli.com/en/prodotto/granulometro-laser-mastersize-serie-3000/>
- (vi) Abdel-Razzaq, F. A., Dhaigham, A. A. R., & Yaseen, S. K. (2023). Design and Construction of a Dust Detection System using Infrared Laser: The Case of Dust Storms in Baghdad in the Summer 2022. *Iraqi Journal Of Physics*, 21(1), 34-41. <https://doi.org/10.30723/ijp.v21i1.1077>