Universidad Austral de Chile
Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE : Dr. Jorge Chávez A.
INSTITUCIÓN: Universidad de Chile

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Annemarie Nielsen S.
INSTITUCIÓN: Universidad Austral de Chile

"Desarrollo de una metodología mediante secado por atomización (Spray Drying) para el secado de una formulación de niosomas"

Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Químico Farmacéutico.

JESSICA PAOLA CÁRDENAS HERNÁNDEZ
VALDIVIA-CHILE
2006

A mis padres, y hermano por la fortaleza y
Amor incondicional que me brindaron, el que será así por siempre.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas y entidades que de una forma u otra me han acompañado durante este largo camino.

A la universidad austral de chile, y todos mis profesores quienes me orientaron al desarrollo personal y profesional durante estos 6 años.

A mi pololo, Andrés, por el ánimo, apoyo y la compañía que siempre me ha brindado para superar momentos difíciles de la vida.

A mí querido profesor Jorge Chávez quien apostó a la realización de esta tesis. A él debo agradecer el camino recorrido, por su ayuda, rigor científico y tiempo que dedicó en resolver mis dudas. Sólo puedo decirle: gracias, Profe.

A la profesora Paz Robert, del Departamento de Tecnología de Alimentos, siempre presente en los momentos difíciles, quien muchas veces me entregó fuerzas para seguir adelante no solamente en lo académico sino también personal.

De manera especial quiero agradecer a la profesora Karina Valdés, por su buena disposición, su alegría y por supuesto el aporte a mis conocimientos.

Y finalmente, pero no menos importante a Dios, por darme la fortaleza para cumplir con cada desafío que la vida me entrega.

Muchas gracias

ÍNDICE

SUMMARY v
1. INTRODUCCIÓN 1
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO 10
3. OBJETIVOS 10
3.1 Objetivo general 10
3.2 Objetivos específicos 10
4. MATERIALES 13
4.1 Materias primas y reactivos. 13
4.2 Equipos. 13
4.3 Programas computacionales (estadísticos). 14
5. METODOLOGÍAS 15
5.1 Preparación de las vesículas. 15
5.2 Evaluación de la formación 15
5.3 Secado de los Niosomas por atomización. 16
5.3.1 Efecto de la adición de un soporte (sacarosa ó Aerosil®). 16
5.4 Diseño experimental. 16
5.5 Diseño de optimización 17
5.6 Análisis estadístico 18
5.7 Secado de los Niosomas por liofilización. 18
5.8 Caracterización física de las vesículas. 18
5.9 Determinación de actividad de agua en los niosomas deshidratados 19
5.10 Encapsulación y cuantificación de la proteína encapsulada. 19
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 20
6.1 Formación de los Niosomas. 20
6.2 Rendimiento del proceso de secado. 21
6.3 Caracterización física (forma y tamaño) de las vesículas. 25
6.4 Encapsulación de albúmina en las vesículas. 36
6.5 Actividad de agua (aw). 39
CONCLUSIONES 42
BIBLIOGRAFIA 44
ANEXOS 47

RESUMEN

Cuando son administradas al organismo por vía oral, el principal problema que presentan las biomoléculas (péptidos y proteínas), está relacionado con la inestabilidad química. Una de las formas de resolver esta situación es la inclusión de ellas en vehículos como los denominados niosomas, mediante un proceso de encapsulación que se realiza a través de una etapa de secado previo, después de lo cual por rehidratación se logra que la molécula ingrese al interior de la microcápsula. Actualmente se utiliza la liofilización como proceso de deshidratación, sin embargo, éste resulta ser un proceso caro y lento. De acuerdo a las consideraciones anteriores, el desarrollo de esta tesis se basó en la formulación de niosomas empleando el método de sonicación y su posterior secado por medio de Spray Drying (S.D) como alternativa a la liofilización. Para evaluar los efectos que tenía cada una de las variables operativas del equipo de S.D sobre la calidad del producto final, se utilizó un diseño experimental considerando un análisis estadístico factorial. Para la caracterización de las micropartículas se utilizó la comprobación de la formación vesicular antes y después del secado, se midió tamaño de partícula (factor de gran importancia para la absorción y adherencia a sustancias fagocíticas), se evaluó la morfología de la superficie de las partículas del polvo seco, se midió la actividad de agua y finalmente se calculó el porcentaje de encapsulación de albúmina dentro de las vesículas secas para ambos

métodos.

Los resultados mostraron que todos los ensayos realizados para el S.D de acuerdo al diseño experimental permitieron obtener un producto seco lográndose el mayor rendimiento para la condición que resultó ser la condición estadística óptima (Temperatura 150ºC, Alimentación 5 ml/min y Aspiración 80%). Esta metodología además permitió el secado de los niosomas sin que se destruyesen (presencia de cruces de malta) ni que se modificase el tamaño de partícula, el que se mantuvo alrededor de 15µm. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al porcentaje de encapsulación de la albúmina para ambos métodos de secado, lográndose hasta un 86% para el S.D (condición óptima) y una actividad de agua inferior a 0,7%, medida como parámetro de humedad relativa, lo que permite mantener buenas condiciones de estabilidad.

En conclusión, el proceso de S.D es igualmente eficiente en comparación con el secado por liofilización y podría transformarse en una alternativa de deshidratación para los niosomas.

SUMMARY

The main problem that displays the bio-molecules (peptides and proteins) when they are administered to the organism by oral route, is related to the chemical instability. One of the approaches to solve that problem is the inclusion of them in vehicles like vesicles of non-ionic tensoactives named niosomes, the encapsulation in these vesicles is made through a hydratation and re-hydratation process. At the moment the most common process to dry the niosomes is the freeze drying technique nevertheless the principal disadvantages are related with the expensive and slow process. For preparing the formulations of niosomes the method of sonication was used, after that the vesicles were drying by means of Spray Drying (S.D) method, which was used like alternative to the freeze drying process. In this study a factorial statistical design was used to evaluate the effects of the operative variables of the S.D on the quality of the final product. The vesicular formation was verified before and after the drying by means of electronic microscopy, particle size was measured by light scattering (factor of great importance for the absorption and adhesion to macrophages), the morphology of dry particle surface was evaluated by scanning electronic microscopy, the content of relative humidity was measured by the water activity and finally the percentage of encapsulation was evaluated using albumin as model protein by means of uv spectroscopy.

The results showed that the S.D process was adequated to dry niosomes, the optimum set up was inlet temperature 150ºC, feed 5 ml/min and aspiration 80%. The particle size

of the dried niosomes was 15 um and the encapsulation rate was similar to both methods (86% for S.D) and the water activity reached a value of 0,7%.

In conclusion there are no differences in between the particles dried by means of both methods and therefore S.D process would become in a valid alternative for dehydration niosomes.

1. INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han demostrado que el desarrollo de nuevas moléculas con actividad terapéutica por sí solo no es suficiente para el progreso en la efectividad de la farmacoterapia. Los problemas que deben abordarse son variados, uno de ellos es la correlación entre el comportamiento “in vitro” de las formas farmacéuticas (FF) y los resultados obtenidos “in vivo” debido a factores atribuibles al principio activo (p.a) y/o al sistema farmacéutico, entre los cuales se pueden citar:

a) Propiedades fisicoquímicas que dificultan la formulación.

b) Alta fluctuación de los niveles plasmáticos después de una administración oral.

c) Concentración insuficiente en el sitio de acción debido a una absorción deficiente, distribución no especifica, rápido metabolismo o eliminación (péptidos y proteínas).

Hasta hace algunos años, la administración oral de péptidos y proteínas terapéuticas era considerada casi imposible, debido a problemas de estabilidad como; ruptura a pH gástrico, labilidad frente a la actividad enzimática del tracto GI, pobres niveles de absorción y bajo poder inmunogénico debido el carácter hidrofílico de la mayoría de ellos (Uchegbu I., *et al* 1998)

En este contexto desde la tecnología farmacéutica se han planteado diferentes estrategias para resolver los inconvenientes anteriores, como por ejemplo el desarrollo de vectores para el trasporte de moléculas terapéuticas como los denominados “sistemas coloidales portadores de fármacos”. En general, el trasporte en el organismo de sustancias biológicamente activas debe responder a ciertos requerimientos como (Navarra., *et al* 2005):

- Posibilidad de direccionamiento: si se aumenta la selectividad del fármaco por el sitio de acción, se puede elevar la eficacia terapéutica disminuyendo potenciales efectos secundarios.
- Aumento de la duración del efecto: ya que al actuar como depósito, la sustancia activa se cede lentamente, con disminución de la frecuencia de administración.
- Protección de la sustancia encapsulada: se incrementa la estabilidad ya que se evitan eventos degradativos.
- Internalización celular de moléculas y compuestos.
- Posibilidad de amplificar efectos del material que se quiere transportar.

Algunos ejemplos de estos sistemas son: liposomas, niosomas, nanosferas, nanocápsulas, micelas, etc.

Niosomas como sistemas de transporte de sustancias activas.

En el año 1978 se introdujo un nuevo tipo de vesículas preparadas a base de tensioactivos no-iónicos (NSVs) denominadas niosomas (Uchegbu I., *et al* 1995). Estas se han planteado como una alternativa interesante para el transporte de proteínas por sus ventajas comparativas como tamaño, y capacidad de carga de moléculas hidrofílicas y lipofílicas. Poseen estructura y propiedades similares a los liposomas, presentando mayor estabilidad química (no sufre peroxidación lipídica), permitiendo el empleo de una gran variedad de surfactantes y un bajo costo (Uchegbu I., *et al* 1995; Muller D., *et al* 2000). La formación de estas vesículas requiere de una cierta energía de activación, la cual es proporcionada por radiación ultrasónica o por activación térmica. La base fundamental de su formación se debe a una auto-asociación de surfactantes

que tiene su origen fundamentalmente en la interacción hidrofóbica de las cadenas hidrocarbonadas y en las repulsiones electrostáticas entre las cabezas de grupo polar, por esta razón tiene gran importancia el balance entre el grupo hidrofílico y lipofílico y la geometría del anfifilo. Están constituidas por una o más bicapas de tensioactivos (unilaminares y multilaminares), que encierran un contenido acuoso central. Pueden solubilizar y atrapar o encapsular moléculas, si están cargadas son enlazadas electrostáticamente a la superficie, mientras que los sustratos hidrofóbicos son intercalados entre las cadenas alquílicas de la bicapa (Uchegbu I., *et al* 1998; Rentel C., *et al* 1999; Uchegbu I., *et al* 1995; Monosroi A., *et al* 2003).

Por la naturaleza de sus componentes no poseen carga, sin embargo es posible inducirla mediante la adición de moléculas positivas o negativas para mantener desagregado el sistema. Al ser administradas conjuntamente con el antígeno, estas partículas han demostrado tener capacidad inmuno estimulante (mayor producción de IgA), obteniéndose excelentes resultados cuando son utilizadas por vía mucosa (Conacher M., *et al* 2000). La explicación de este comportamiento radica en que la puerta de entrada de la gran mayoría de las enfermedades infecciosas está relacionada con las mucosas y que el mecanismo de defensa depende principalmente de los sistemas de inmunidad local llamados tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT en inglés), el cual es difícil de estimular por vía inyectable y constituye alrededor del 75 por ciento del sistema inmune total del organismo (Hassan Y., *et al* 1996; Mohamedi S,*et al* 2000)

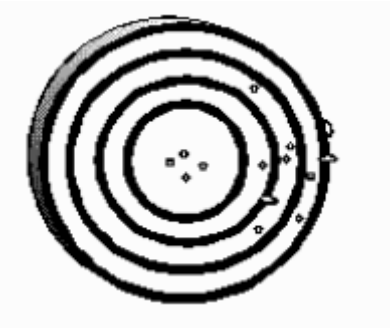


Figura Nº1: Representación esquemática de un corte transversal de una vesícula multilaminar y la distribución de proteínas de acuerdo a su afinidad en los compartimentos acuosos y lipófilos.

Tamaño de partícula y carga superficial de los niosomas.

El tamaño de partícula es una característica estructural que refleja distribución y homogeneidad de éstas. Por ejemplo, la distribución y el tamaño promedio de un fármaco determinan su eficiencia y su vía de administración (Kreuter J., *et al* 1999; García P., *et al* 2000). Dependiendo de la composición química y método de obtención, se pude obtener una variedad de tamaños y estructuras tales como multilaminares (1-10µm), unilaminares grandes (0,1- 1,0 µm) y unilaminares pequeñas (<0,1µm). El tamaño de partícula y la carga superficial de la vesícula influencian la estabilidad, cinética de bio-distribución y liberación de la sustancia encapsulada, además de la captura por las células blanco. Por ejemplo, partículas entre 5 y 10 µm serían capturadas por las placas de Peyer dentro de la mucosa y submucosa, mientras que las menores de 5 µm podrían transitar a otros órganos como el bazo, a través del drenaje linfático y partículas mayores de 5 µm serían captadas mayormente por vía paracelular (Lasic D., *et al* 1995; Kreuter.J., *et al* 1999; García P., *et al* 2000).

La carga eléctrica de la superficie de los niosomas puede ser modificada para reducir su agregación y evitar el reconocimiento por las células del retículo endotelial (RES).

Niosomas con carga superficial neutra presentan una menor tendencia a ser depuradas por el RES, después de ser administradas, sin embargo presentan mayor tendencia a la agregación (inestabilidad física). Niosomas cargados positiva o negativamente reducen la agregación y son más estables en suspensión, pero son altamente endocitados por células presentadoras de antígenos como los macrófagos (Conacher M., *et al* 2000; Rentel C., *et al* 1999; Hassan Y., *et al* 1996; Mohamedi S., *et al* 2000)

Surfactantes

Los surfactantes son moléculas anfipáticas constituidas por una o dos cabezas polares y una cadena hidrocarbonada apolar. La capacidad para formar vesículas depende de la estructura, del balance hidrófilo/lipófilo (BHL) y del parámetro de empaquetamiento (g), definido en la ecuación [1].

[1] $$g = V/(a_0 \times l_c)$$

Donde V es el volumen efectivo de la porción hidrófoba del tensioactivo, a0 es el área superficial del grupo que forma la cabeza hidrófila, lc es la longitud de la cadena hidrófoba. El valor del parámetro g determina la geometría básica del tensoactivo, lo que influye, a su vez, en la forma de las micelas y por lo tanto en el tipo de estructura resultante (Fig. Nº2).

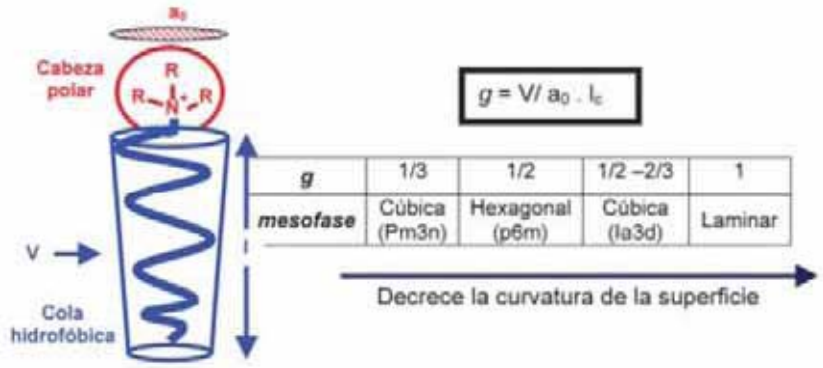


Figura Nº 2: Parámetro de empaquetamiento

El BHL debe oscilar entre 5 y 10,5 para que las vesículas puedan formarse (van Hal D., *et al* 1996)

Ésteres de sacarosa

Forman parte de un grupo de surfactantes de tipo no-iónico que contienen una molécula de sacarosa como cabeza hidrofílica parcialmente esterificada con un ácido graso como cuerpo lipófilo. La sacarosa tiene 8 grupos hidroxilos por lo que puede ser esterificada de 1 a 8 veces, el primero en esterificarse es el OH de la posición 1.

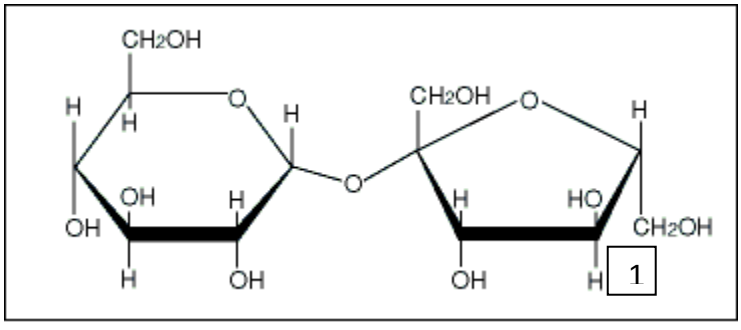


Figura Nº3: Estructura de la sacarosa

Los ésteres de sacarosa son variados y dependen del ácido graso utilizado para la esterificación, por ejemplo si se usa ácido esteárico CH3(CH2)16CO2H y palmítico CH3(CH2)14CO2H se produce una mezcla en una proporción de 70% y 30% con un rango de BHL desde 5 a 16.

Encapsulación de proteínas en sistemas vesiculares.

Una de las técnicas para entrapar o encapsular proteínas dentro de las vesículas es el método de deshidratación-rehidratación (Kirby C., *et al* 1984), que requiere de vesículas previamente liofilizadas.

La liofilización también llamada crio-desecación, es un proceso de secado cuyo principio consiste en sublimar el hielo de un producto congelado (Constantino H., *et al* 2002; Maa Y., *et al* 2000). Durante este proceso, las vesículas pueden presentar problemas de agregación o fusión con un aumento de tamaño o ruptura de las capas vesiculares, sin embargo, la presencia de un crioprotector (lactosa, sacarosa) permite la formación de cristales de hielo pequeños evitando la ruptura de las vesículas (Baille A., *et al* 1985). Dentro de los inconvenientes de este método están el elevado costo de las instalaciones y de los equipos (alrededor de tres veces más que otros métodos) y la lentitud del proceso (un ciclo puede durar 4-8 horas para 2 gramos de producto) (Walton D., *et al* 1999). En este contexto una alternativa de uso seria el secado por atomización (S.D).

Secado por atomización (Spray Drying)

El Spray Drying constituye una técnica relativamente sencilla donde se convierten soluciones o dispersiones liquidas en polvo (Broadhead J., *et al* 1992), en una etapa operacional continua, el cual puede ser utilizado directamente en la fabricación de diversas formas farmacéuticas. Consiste en lograr la disminución del contenido de humedad de un producto en un tiempo mínimo, de tal manera que no se produce deterioro. El producto es pulverizado por medio de un atomizador (presión, dos fluidos o centrífugo) y en forma simultánea entra en contacto con una corriente de aire caliente (medio convectivo); las partículas caen por gravedad y se secan en el trayecto de la cámara de secado donde posteriormente llegan al ciclón (se produce la separación del aire saturado con humedad y el producto seco) y se recolectan en forma de polvo (Simon E., *et al* 1996; Palmieri G., *et al* 2001). Entre las características de este método están el producir partículas esféricas con un estrecho rango de distribución de tamaño y, la versatilidad ya que se puede trabajar con sustancias termosensibles por los bajos tiempos de residencia y el efecto refrigerante que se consigue a través de la evaporación y por último su bajo costo (Goula A., *et al* 2004). Dependiendo de las propiedades físicas y químicas del material y, del diseño y operación del secador puede obtenerse un producto en polvo, en gránulos o en aglomerados (Bakan J., *et al* 1986). La velocidad de secado es crítica para la calidad y estabilidad del producto. Si es muy rápido puede generar partículas deformes, por el contrario si es muy lento puede producir partículas húmedas (Maa Y., *et al* 2000). Está velocidad está influenciada por varios factores como caudal de alimentación (solución, suspensión, emulsión, etc.), presión de atomización, temperatura de entrada y temperatura de salida (Müller D., *et al*

2000; Palmieri G., *et al* 2001). Estudiar como estos parámetros y la naturaleza del material a secar afectan las características de las partículas (porcentaje de humedad, forma y tamaño) es necesario cada vez que se quiere emplear esta metodología.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los niosomas deshidratados por atomización poseen características físicas y capacidad de encapsulación, similares a aquellos obtenidos por liofilización.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad de emplear el secado por atomización como herramienta para el secado de niosomas, destinados a ser empleados como vehículo para BSA (albúmina bovina sérica), comparándola con la liofilización en cuanto a características físicas y capacidad de encapsulación.

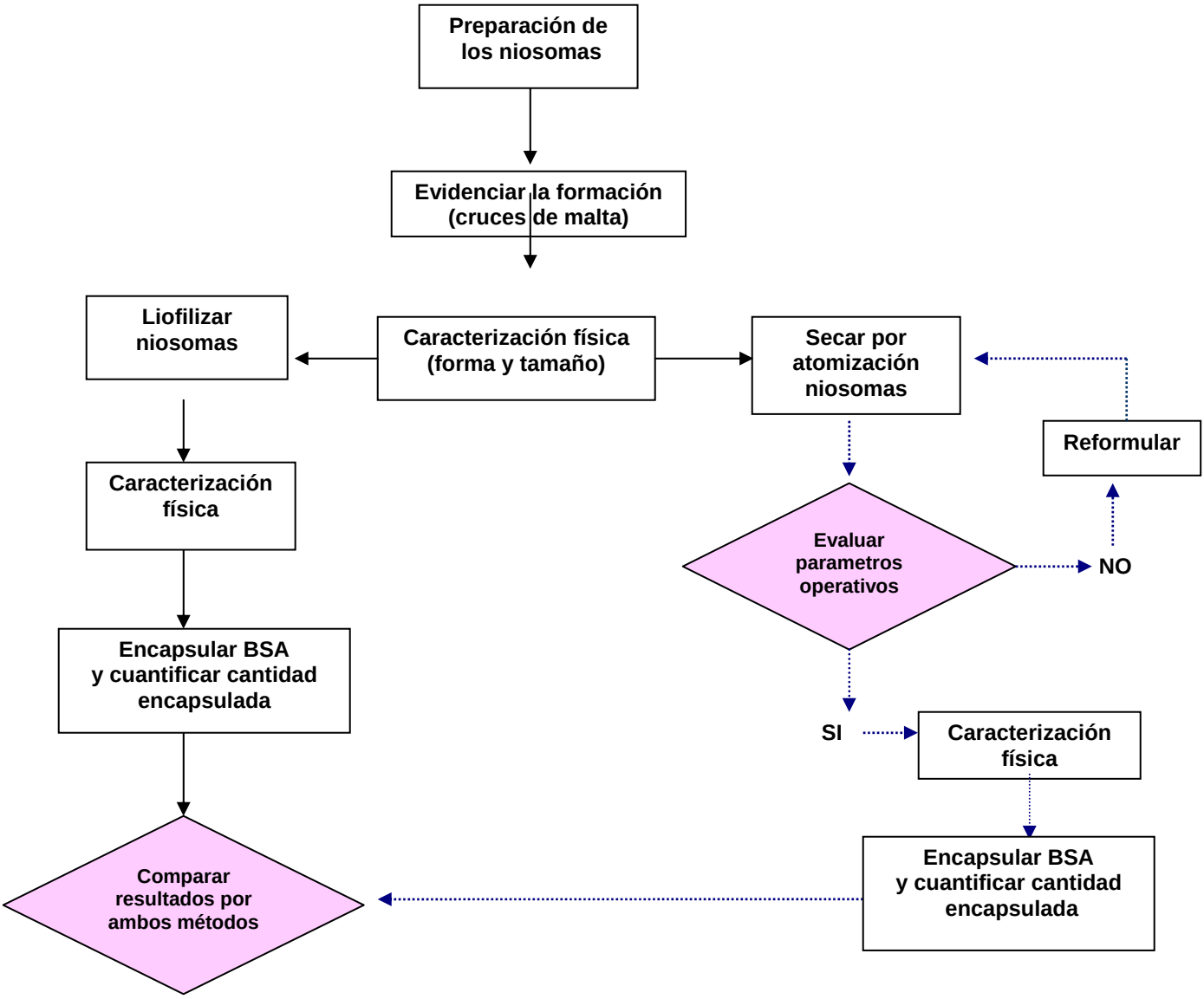
3.2 Objetivos específicos

1. Desarrollar una formulación base de niosomas utilizando una mezcla de ésteres de sacarosa palmítico y esteárico.
2. Caracterizar los niosomas obtenidos por el método de sonicación en cuanto a forma y tamaño.
3. Establecer los parámetros operativos (set-up) del secado por atomización para el secado de la formulación de niosomas.
4. Realizar las adaptaciones necesarias sobre la formulación base de niosomas (adición de soportes) para adaptarla al método de Spray Drying.
5. Incorporar la proteína modelo (BSA) por el método de deshidratación-rehidratación.
6. Liofilizar la formulación de niosomas y posteriormente encapsular BSA por el método de deshidratación utilizado para cargar la proteína

7. Caracterizar físicamente (forma y tamaño) las formulaciones obtenidas por ambas metodologías.

8. Comparar el porcentaje de encapsulación de las formulaciones obtenidas por ambas metodologías.

Diagrama de flujo del trabajo donde se presentan los pasos a seguir en el transcurso del trabajo



4. MATERIALES

4.1 Materias primas y reactivos.

- Albúmina Bobina Sérica fracción V, pureza >96% (Sigma, USA).
- Esteres de sacarosa: mezcla de palmitato y estearato, BHL 7 ,Wasag 7^{MR} , (Ryoto, Japón)
- Colesterol, pureza > 95% (Sigma, USA)
- Dihexadecil fosfato (DCP), pureza >90%. (Sigma, USA)
- Reactivos: metanol (Merck, Alemania), cloroformo (Merck, Alemania), hidróxido de sodio (Merck, Alemania), fosfato de potasio monobásico (Merck Alemania), sacarosa (Scharlau, España), oxido de silicio coloidal aerosil 200® (Degussa, Alemania) fueron de grado pro-análisis.

4.2 Equipos.

- Sonicador de Baño ELMASONIC E 30/H (Alemania) frecuencia 37 KHz
- Baño termoregulado HAAKE DC3 (Alemania)
- Agitador Vortex TOUCH PLATE, (super – mixer, USA)
- Secador Spray B-191, Büchi (Suiza), equipado con una boquilla de 0,7 mm y asociado a un compresor de aire (HAUG).
- Liofilizador, ILSHIN® (China).
- Microscopio de luz polarizada ,Standard 20, ZEISS (Alemania)
- Difracción de luz láser ,Malvern Zetasizer X (Inglaterra)
- Microscopio electrónico de barrido (SEM), JEOL JSM-25SII (Japon)

- Espectrofotómetro, Spectronic GENESYS UV-VIS ,modelo 5 (EUA)
- Filtros para centrifugación Centrisart ®,Sartorius AG (Alemania), 100.000D.
- Medidor actividad de agua Thermoconstanter, NOVASINA TH/RTD-200 (Suiza)
- Centrifuga ROTOFIX 32, Merk (Alemania).
- Balanza analítica Chyo ,Kyoto (Japón)

4.3 Programas computacionales (estadísticos).

- Statgraphics 5.0 (análisis de varianza)
- MATLAB®
- STATA 9.1 (Test Shapiro Wilkins)
- Excel

5. METODOLOGÍAS

5.1 Preparación de las vesículas.

Se utilizó el método de sonicación descrito en la literatura por Baillie A. *et al* 1985. Los ésteres de sacarosa fueron disueltas en cloroformo/metanol (3:1) (solución stock 150mM) y mezcladas en una proporción de 4:5:1 de ésteres de sacarosa: colesterol: inductor de carga (DCP). La fase orgánica se evaporó a sequedad bajo campana en un baño de agua (< 50ºC)

La película obtenida se resuspendió con 5 mL de una solución de sacarosa (10% p/v) o con 5 mL de buffer fosfato (preparado según USP 23). La dispersión formada se calentó a 80ºC por 15 minutos en un baño de agua. Las vesículas se formaron mediante sonicación por 1 minuto a 80ºC (temperatura superior a la de transición de fases). Inmediatamente después de la sonicación, las vesículas se enfriaron a 25 ºC. En la Tabla 1 se indica la composición de las vesículas.

Tabla 1. Formulación de niosomas

FORMULACIÓN	% MOLAR
Éster de sacarosa	40
Colesterol	50
DCP	10

5.2 Evaluación de la formación

La evaluación de la formación de las vesículas se realizó por microscopia de luz polarizada, mediante la observación de estructuras birrefrigentes conocidas como cruces de malta.

5.3 Secado de los Niosomas por atomización.

Para el secado por atomización se evaluaron diferentes condiciones como: temperatura de entrada, aspiración y alimentación. En el Anexo 1 se encuentra un diagrama del equipo utilizado.

5.3.1 Efecto de la adición de un soporte (sacarosa ó Aerosil®).

Se evaluó el efecto de la adición de sacarosa (10%) y el dióxido de sílice coloidal (Aerosil®) (0,5%), sobre la calidad del secado por atomización y sobre el rendimiento del proceso.

5.4 Diseño experimental.

Para el diseño experimental se utilizó un modelo factorial (2^3) de un bloque considerando cuatro puntos centrales, sin construcción de una superficie respuesta. Se utilizó el programa Statgraphics 5.0. Como variables independientes se consideraron: temperatura de entrada, caudal de ingreso de la muestra al secador (% de alimentación) y caudal de aire extraído (% de aspiración). Como variable dependiente se consideró el rendimiento del proceso (%).

Para definir los valores que se emplearían como puntos centrales en la construcción del diseño, se realizaron algunos ensayos preliminares en los cuales la temperatura mínima fue 10ºC por sobre la de evaporación del agua (a 100ºC no se obtuvo polvo seco), y como máximo superior se consideró el valor de 150ºC (Müller D. *et al* 2000), ya que a valores mayores el polvo se colocaba amarillo, lo que reflejaba cambios en las características físicas. En la Tabla Nº 2 se muestran los valores de las variables

independientes, utilizados como máximos y mínimos en el diseño experimental.

TablaNº 2: Valores máximos y mínimos de las variables independientes en estudio

FACTORES	NIVEL SUPERIOR	NIVEL CENTRAL	NIVEL INFERIOR
A: Temperatura (ºC)	150	130	110
B: Alimentación (mL/min)	20	12,5	5
C: Aspiración (%)	100	80	80

La Tabla Nº3 muestra los 12 valores obtenidos para el desarrollo del diseño experimental.

Tabla Nº 3: Valores sugeridos por el programa estadístico para las variables en estudio

EXPERIMENTO	TEMPERATURA (ºC)	ALIMENTACIÓN (mL/min)	ASPIRACIÓN (%)
1	110	5	80
2	150	5	80
3	110	20	80
4	150	20	80
5	110	5	100
6	150	5	100
7	110	20	100
8	150	20	100
9	130	12,5	90
10	130	12,5	90
11	130	12,5	90
12	130	12,5	90

5.5 Diseño de optimización

Este diseño permite evaluar si las asociaciones de las variables independientes tienen efecto significativo sobre la respuesta, para así poder encontrar un modelo matemático con el cual se puedan establecer los parámetros y condiciones para secar el producto.

5.6 Análisis estadístico

El análisis de los resultados se realizó mediante un test de varianza simple (ANOVA), según el modelo lineal general univariante, en el programa estadístico Statgraphics 5.0, considerando un nivel de confianza del 95% (error máximo permisible 5%), aceptando como significativo valores de probabilidad (valor p) menores a 0,05.

5.7 Secado de los Niosomas por liofilización.

El congelamiento de las muestras se realizó con nitrógeno líquido, para obtener temperaturas inferiores a la de completa solidificación del producto. El secado primario se realizó a una presión de 5mTorr, por dos días, controlando el descongelamiento, hasta la ausencia total de hielo en el interior del matraz. El secado secundario se llevó a cabo hasta una humedad relativa del 3%.

5.8 Caracterización física de las vesículas.

a) Diámetro: los diámetros promedios de las vesículas fueron obtenidos por difracción de luz láser (DLL), utilizando un equipo Malvern Zetasizer X con un rayo Helio-Neon de baja potencia a una longitud de onda de 6328 Aº. Las muestras fueron rehidratadas en 10 mL de buffer fosfato salino (PBS), a temperatura ambiente y como medio dispersante para la medición se utilizó agua destilada.

b) Forma y topografía del polvo: para estudiar la forma y superficie de las partículas, se empleó microscopia electrónica de barrido (SEM). Las muestras fueron previamente sombreadas con oro en un Varian Vacuum Evaporator PS 10E, el oro al ser excitado por los electrones incidentes emite un electrón secundario, el cual es el responsable de

la formación de la imagen. Estas se observaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-25SII a 30 KV y las fotografías se obtuvieron mediante un soporte Mamiya Roll Film Holder Model 2, utilizando una película Kodak de 120 T-Max ISO 100. La determinación del tamaño de las microcápsulas se realizó utilizando la barra de referencia que se muestra en la parte inferior de cada fotografía.

5.9 Determinación de actividad de agua en los niosomas deshidratados.

La determinación de la actividad de agua en las muestras secas por ambos métodos (liofilizados y atomizados) se realizó a 25ºC mediante un higrómetro eléctrico Novasina Thermoconstanter modelo TH/RTD 200, durante 2 horas. Este equipo mide la humedad relativa del aire a partir del valor de la variación en la conductividad de un sensor de cloruro de litio, esto indicaría la eficiencia de secado y condicionaría el porcentaje de encapsulación.

5.10 Encapsulación y cuantificación de la proteína encapsulada.

Para la encapsulación de la proteína modelo, las muestras deshidratadas fueron rehidratadas con una solución de albúmina (10mg/mL) en buffer fosfato a pH 7.4. La fracción encapsulada se determinó mediante cuantificación de la proteína libre. Las muestras se dispusieron en filtros para centrifugación (Centrisart ® Sartorius AG) y centrifugadas a temperatura ambiente por 30 minutos a 3500 rpm. En el sobrenadante se determinó la proteína libre por espectroscopia UV (280nm).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Formación de los Niosomas.

Una de las pruebas que se realiza para detectar la formación de los niosomas es la observación mediante microscopía de luz polarizada (MLP) de unas estructuras birrefrigentes conocidas como "*Cruces de Malta*", esta difracción de la luz se produce por la orientación molecular del colesterol en la membrana de las vesículas (Manosroi A. *et al* 2003), en la Fig. Nº 4 se puede observar una imagen característica de una muestra recién preparada.

Figura Nº4: Fotografía de una "Cruz de Malta" obtenida mediante MLP (40x) de una vesícula recién preparada

La Fig. Nº5 muestra fotografías MLP de cruces de Malta obtenidas de vesículas rehidratadas con buffer fosfato después de haber sido sometidas a diferentes condiciones de secado. En ellas puede apreciarse que la temperatura no influyó en la disposición de los componentes de las vesículas.

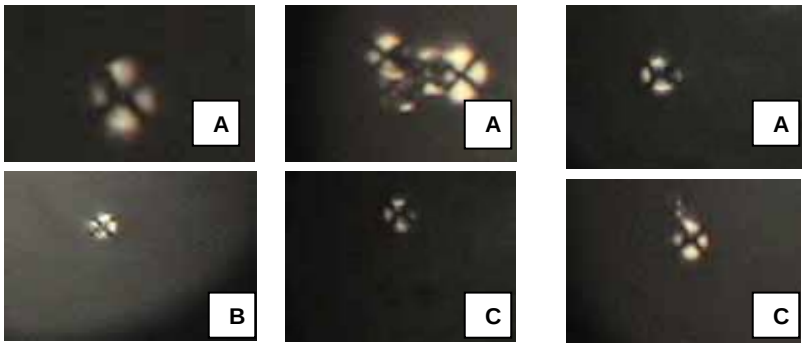


Figura Nº5: Fotografías de "Cruces de Malta" por MLP (40x) de vesículas rehidratadas después de secas a 110 (A), 130 (B) y 150ºC (C).

6.2 Rendimiento del proceso de secado.

En la Tabla Nº 4 se presentan los resultados obtenidos después de aplicar las diferentes condiciones sugeridas para el proceso de secado en relación con la variable respuesta (% rendimiento).

Tabla Nº 4: Condiciones experimentales para el secado por atomización de niosomas y el rendimiento respectivo.

Experimento	Temperatura de secado (ºC)	Alimentación (mL/min)	Aspiración (%)	Rendimiento (%)
V1	110	5	80	65,7
V2(*)	150	5	80	68,9
V3	110	20	80	49,5
V4	150	20	80	63,4
V5	110	5	100	61,1
V6	150	5	100	64,8
V7	110	20	100	34,7
V8	150	20	100	58,3
V9	130	12,5	90	60,9
V10	130	12,5	90	61,3
V11	130	12,5	90	62,1
V12	130	12,5	90	58,3

(*)= condición optima de secado

El mayor rendimiento experimental (68,9%) se obtuvo a 150 ºC, 5 mL/min y 80% para temperatura, alimentación y aspiración respectivamente. Bajo estas condiciones, el polvo fue de fácil remoción tanto desde el ciclón como del vaso recolector.

El menor rendimiento (34,7 %) se obtuvo para una temperatura de 110 ºC, 20 mL/min de alimentación y 100% de aspiración. Esta situación podría explicarse por el aumento de la velocidad de alimentación, ya que las gotas formadas no se secaron completamente, formando un film húmedo en la cámara de secado y en el ciclón.

Del análisis de los resultados anteriores puede señalarse que la influencia de cada una de las variables no es aislable del contexto general. El análisis de optimización permitió conocer cuales asociaciones tenían mayor importancia estadística. En este sentido, se encontró influencia significativa (valor p <0,05) para todas las variables de manera independiente (A, B y C) siendo la más significativa la alimentación (P=0,0013) y temperatura (P=0,0024), en cuanto a las asociaciones entre si de las variables la que mostró mayor influencia estadística fue la asociación de temperatura de entrada - alimentación (AB), con un valor p= 0,0071, las demás asociaciones, temperatura de entrada - aspiración (AC) y alimentación - aspiración (BC) no mostraron influencia significativa, con valores p= 0,2218 y 0,1862 respectivamente. El Anexo Nº3 muestra el análisis de varianza realizado.

En general, cada una de las variables tiene efectos distintos sobre el proceso de secado, si se observa la temperatura de ingreso puede señalarse que cuanto mayor es la diferencia de temperatura entre el medio de calentamiento y el producto a secar, mayor es la velocidad de secado; la alimentación determina la velocidad con que la muestra ingresa a la cámara de secado, si esta es baja, manteniendo la presión constante, habrá una mayor subdivisión de gotitas acelerando el secado y permitiendo una mejor eficiencia térmica del secador, ya que una mayor área, proporciona más superficie de contacto con el medio de calentamiento. La influencia de la aspiración se explica por el tiempo de residencia de la muestra en el interior de la cámara de secado, si es baja este tiempo será mayor. (Maa Y. *et al* 2000).

Los valores de las variables independientes con los cuales se obtuvo la respuesta óptima se muestran en la Tabla Nº5. Esta condición óptima estadística resulto ser la

misma con la cual se obtuvo el mayor rendimiento experimental.

Tabla Nº 5: Valores de las variables independientes con los cuales se obtuvo el rendimiento máximo en el proceso de secado.

Parámetros	Valores
Tº de Entrada (ºC)	150
Tº de Salida (ºC)	82-85
Velocidad de Alimentación (mL/min)	5
Porcentaje de Aspiración (%)	80
Flujo de Aire (L/hr)	600
Presión de Aire (bar)	5-7
Valor Óptimo (rendimiento %)	71,21

Una de las estrategias que se ha desarrollado para mejorar el rendimiento del proceso de secado por atomización es el empleo de soportes que aumenten la cantidad de sólidos en suspensión y al mismo tiempo contribuyan a la formación de los núcleos de las microcápsulas, produciendo partículas de mejor flujo. En este estudio se evaluaron dos soportes inertes como sacarosa y óxido se sílice coloidal (Aerosil^{MR}), utilizando como condiciones experimentales temperatura 110ºC, alimentación 5mL/min y aspiración 80% (se utilizaron estas condiciones para poder comparar el secado con buffer del secado con la sacarosa). En la Tabla Nº 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla Nº 6: Efecto de la adición de un soporte sobre el rendimiento en el proceso de secado.

Soporte	Temperatura (ºC)	Alimentación (mL/min)	Aspiración (%)	Rendimiento (%)
Sacarosa	100	5	80	64,3
	110	5	80	62,7
	120	5	80	59,4
Aerosi ®l	100	5	80	50,6
	110	5	80	58,0
	120	5	80	63,4

Los resultados muestran que los rendimientos obtenidos con Aerosil® son menores que los obtenidos con sacarosa en las mismas condiciones de secado. Esta situación es controversial, ya que este excipiente se utilizó para aumentar la cantidad de sólidos en suspensión y por lo tanto para aumentar el rendimiento. El Aerosil® 200 es amorfo, altamente disperso con un tamaño de partícula de 12- 16nm y un área superficial de 120-200 m^2/g, lo que le confiere una densidad aparente muy baja. Su superficie actúa formando una capa continua que envuelve la partícula de polvo (efecto de cojinete de bolas), por lo cual se utiliza como deslizante y antiadherente (Soler D. 2001). La explicación para este menor rendimiento estaría en el pequeño tamaño y en la baja densidad, lo que provocaría una mayor fuga de las partículas hacia el exterior del equipo a través del filtro que saca el aire del secado desde el equipo.

El rendimiento del proceso de secado con sacarosa fue menor en comparación con el obtenido cuando se uso buffer fosfato (ver Tabla Nº4). La explicación a este hecho puede estar relacionada con la disposición de la sacarosa en las vesículas secas ya que ésta se sitúa rodeando externamente a las bicapas (sin penetrar o permear hacia el interior). Esta situación implica que al quedar en contacto directo con el medio de calentamiento (110ºC) se produce la fusión de ellas, lo que contribuye a que gran parte del polvo se pegue en las paredes de la cámara de secado y determine una disminución en el rendimiento.

6.3 Caracterización física (forma y tamaño) de las vesículas.

a) Tamaño

El tamaño promedio de las vesículas se determinó sobre muestras representativas del material. Cuando se utiliza esta técnica los resultados pueden expresarse de diferentes formas, una de ellas es el d(0,5), que representa la media de la distribución, el d(4,3) representa el diámetro promedio en volumen, mientras que el d(0,1) y el d(0,9) corresponden al diámetro del 10% y 90% de la distribución de tamaño respectivamente. La Tabla Nº7 resume las diferentes expresiones de los resultados obtenidos en la medición del tamaño de partícula de las vesículas recién preparadas.

Tabla Nº 7: Resultados de la medición del tamaño de partícula de los niosomas sin ser sometidos a secado determinado por difracción de luz láser.

Mediciones	**D(4,3) µm**	**D(0,5) µm**	**D(0,1) µm**	**D(0,9) µm**
V1	12	6,86	2,45	23,77
V2	10,9	7,53	2,74	19,83
V3	13,53	8,01	2,58	23,57
V4	13,46	7,65	2,73	22,98
V5	13,07	8,32	2,87	24,92
V6	11,19	8.93	2.93	20,01
V7	14,69	8,13	2,91	25,49
V8	11,3	8.87	2.76	19,97
V9	9,93	6,52	2,3	19,85
Promedio	12,23	7,87	2,70	22,45
Std	1,54	0,82	0,21	2,14
CV	12,59	10,42	7,78	9,53

Como el tamaño de partícula está determinado por el método de fabricación y por las características químicas de las materias primas (Baillie A., *et al* 1985), el valor del

coeficiente de variación (CV) =12,59%, obtenido para las mediciones del diámetro volumétrico en este trabajo, refleja una gran variabilidad que puede explicarse por el tiempo y frecuencia de sonicación empleado.

La Tabla Nº8 muestra el tamaño de partícula determinado por difracción de luz láser para las vesículas en diferentes condiciones de secado. Cada una de las muestras empleadas en la Tabla Nº 7 fue utilizada como punto de partida para cada condición de secado, de manera que fue posible comparar individualmente el efecto del secado en relación al tamaño de las partículas. En el Anexo Nº 5 y 6 se muestran algunos de los resultados de las mediciones realizadas.

Tabla Nº 8: Tamaño de partícula determinado por difracción de luz láser de las vesículas sometidas a secado por atomización y rehidratadas.

Condición de secado	Temperatura (ºC)	Alimentación (mL/min)	Aspiración (%)	D (4,3) (µm)	D(0,5) (µm)	D(0,1) (µm)	D(0,9) (µm)
V1	110	5	80	11,14	7,97	3,09	19,16
V2(*)	150	5	80	10,52	7,14	2,85	18,04
V3	110	20	80	-	-	-	-
V4	150	20	80	13,69	9,1	3,21	23,64
V5	110	5	100	12,59	10,23	3,46	23,45
V6	150	5	100	10,6	7,71	2,95	18,4
V7	110	20	100	14,41	9,17	3,59	22,68
V8	150	20	100	11,8	6,79	2,83	20,61
V9	130	12,5	90	10,81	6,67	2,68	17,41

(-)= no fue posible realizar medición, (*)= condición optima de secado

Respecto de las vesículas sin secar, la influencia del secado sobre el tamaño de las vesículas es aleatorio, en algunas condiciones el tamaño se mantiene (V4, V7, V8,) mientras que en otras disminuye (V1, V2, V5, V6,). Como no se realizó un diseño experimental en que la variable respuesta fuese el tamaño de partícula, no fue posible

hacer un análisis más detallado.

Al comparar entre sí las diferentes condiciones de secado (Tabla Nº 8), se encontró que, con el aumento de la alimentación desde 5 a 20 ml/min, se produjo un incremento en el diámetro volumétrico desde 10,52 µm a 13,69 µm, manteniendo sin variaciones el resto de las condiciones de trabajo (temperatura de secado 150ºC y aspiración 80%); este hecho es consistente con las consideraciones teóricas (Espósito E., *et al* 2000), relativas a que el aumento de la alimentación determina un aumento en el tamaño de la partícula. También pudo observarse una disminución en el diámetro volumétrico de la partícula desde 11,14 µm a 10,52 µm con el incremento de la temperatura desde 110ºC a 150ºC (condición V1 y V2 respectivamente), indicación que señala que el aumento de la temperatura de secado, disminuye el tamaño de partícula.

Para evaluar si después del proceso de secado el tamaño de partícula de las vesículas se mantenía sin cambios significativos, se realizó un análisis estadístico utilizando el programa Statgraphic 5.0 considerando como parámetro control el tamaño de las vesículas sin secar. El análisis mostró un valor p igual o superior a 0,05, con un 95% de confianza, indicando que luego del secado por atomización no se produjeron diferencias estadísticamente significativas en los tamaños. Esto se representa esquemáticamente en el Gráfico Nº1.

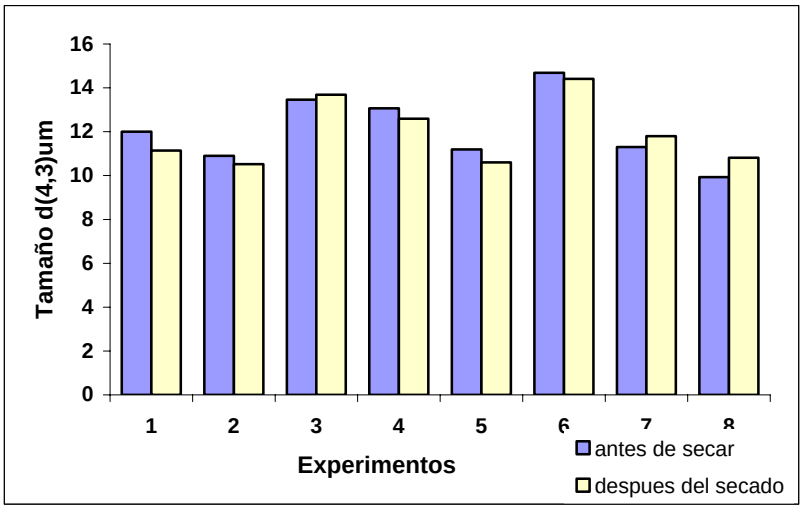


Gráfico Nº 1: Comparación de tamaños volumétricos de vesículas sin secar y secas por atomización.

Al medir el tamaño de partícula de los niosomas rehidratados provenientes de las muestras en que se usaron los soportes inertes, se encontró que con sacarosa el diámetro volumétrico fue mayor que cuando se usó aerosil (ver Tabla Nº 9); en general este valor fue superior al obtenido en todas las condiciones estudiadas (ver Tabla Nº 8). Esta situación se explicaría por el tamaño de las partículas que forman cada uno de los soportes.

Tabla Nº 9: Tamaño de partícula utilizando diversos soportes

Soporte	Temperatura (ºC)	Alimentación (mL/min)	Aspiración (%)	D(4,3) (µm)	D(0,5) (µm)	D(0,1) (µm)	D(0,9) (µm)
Aerosil®	110	5	80	11,33	10,26	5,32	18,78
Sacarosa	110	5	80	16,31	7,8	2,72	39,77

En relación con el secado por liofilización (ver Tabla Nº10), se encontró que el tamaño de partícula promedio de las vesículas resultó ser mayor que el obtenido en las vesículas sin secar y secas por atomización (ver Gráfico Nº2).

Tabla Nº 10: Tamaño de las vesículas secas por liofilización

Medición	**D(4,3)** µm	**D(0,5)** µm	**D(0,1)** µm	**D(0,9)** µm
L1	20,79	11,59	3,05	50,44
L2	22,17	10,6	2,36	55,52
L3	22,77	15,57	2,59	52,52
L4	23,06	11,81	3,43	57,13
L5	25,02	14,48	2,34	63,68
L6	27,18	18,92	3,37	62,65
L7	27,57	19,23	3,07	55,78
L8	28,19	20,71	4,12	58,35
L9	32,85	11,17	3,36	86,81
Promedio	**25,51**	**14,90**	**3,08**	**60,32**
Desv. Std	**3,80**	**3,91**	**0,58**	**10,81**
CV	**14,90**	**26,24**	**18,83**	**17,92**

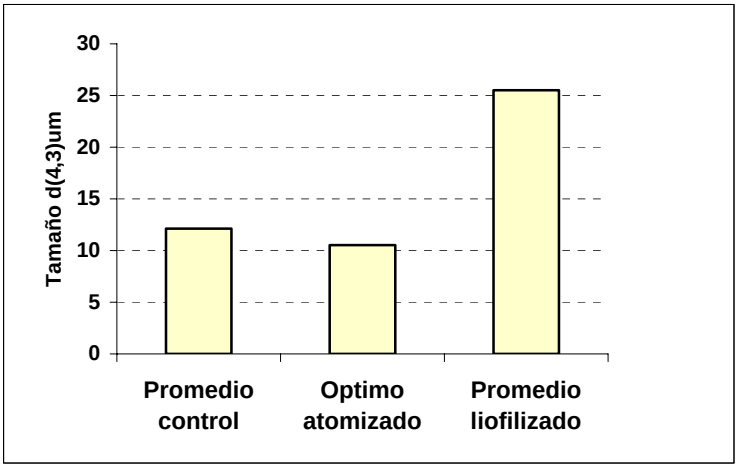


Gráfico Nº2: Comparación entre los diámetros volumétricos de las vesículas control versus el tamaño del optimo por atomización y el promedio de los tamaños obtenidos por el secado por liofilización.

Sin embargo, el tamaño el promedio de las vesículas liofilizadas no es representativo de la población ya que al realizar los análisis respectivos se encontraron en todos los casos una distribución bimodal. En el Anexo Nº 7 se muestran las mediciones

realizadas.

La situación anterior es controversial ya que las vesículas sin secar presentaron solo una moda, lo que implica una distribución única. La aparición de un grupo de partículas de mayor tamaño indicaría que se produjo la fusión de algunas vesículas, probablemente durante la primera etapa de la liofilización. Durante el congelamiento el tamaño de los cristales formados es de gran importancia, si son muy grandes como consecuencia de un enfriamiento muy lento, se generan roturas mecánicas en la matriz. Para evitar este problema se utilizan agentes crioprotectores (sacarosa), estos actúan de varias formas por ejemplo: disminuyen el punto de congelación del agua, facilitan el flujo de agua a través de la membrana celular y protegen estructuras moleculares y supramoleculares, compensan diferencias de presión osmótica que se generan cuando comienza a congelarse la superficie de la célula y se incrementa la concentración de solutos en el medio que lo rodea (evita perdida excesiva de agua que provocaría deshidratación y destrucción celular) (Van W., *et al* 1996). Otro hecho que explicaría la presencia de dos poblaciones de tamaños, se relacionaría con problemas durante la medición propiamente tal, donde no se esperó el tiempo suficiente para la rehidratación completa del polvo. Para evaluar la posibilidad de una distribución normal o de Gauss, se aplicó una prueba estadística conocida como test de Shapiro Wilkins, esta prueba es utilizada cuando las muestras son pequeñas ($n<30$). Según el análisis efectuado en las muestras secas por liofilización el valor p resultó ser significativo (>0.05), lo que indica que esta distribución se comporta como normal. En el Anexo Nº 4 se muestra el análisis efectuado.

Como se comprobó la normalidad de la distribución de los datos de tamaño, entonces

fue posible realizar un test de ANOVA para determinar si había diferencias significativas en los tamaños de las vesículas sin secar (control) a partir de las secas por liofilización. El resultado del análisis mostró diferencias significativas en los diámetros volumétricos d (4,3)) con un p-value < a 0,05. En el Gráfico Nº3 se puede observar esta diferencia.

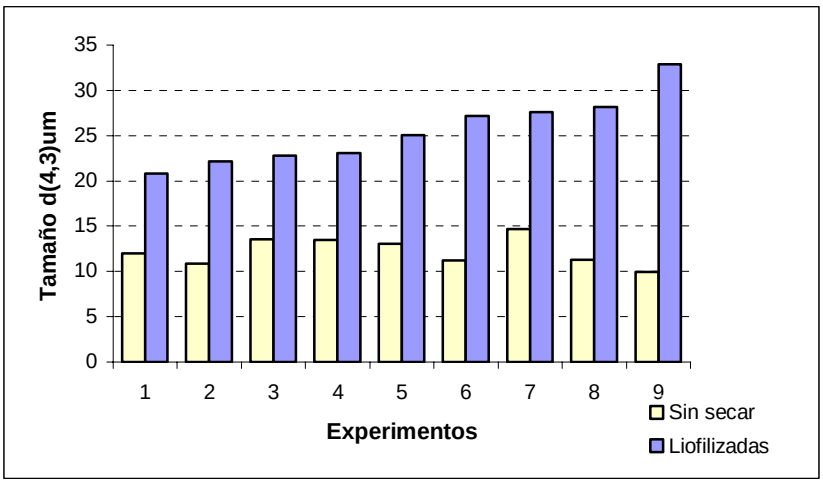


Gráfico Nº3: Comparación del tamaño volumétrico de las vesículas sin secar y secas por liofilización.

El tamaño de partícula es un factor que tiene numerosas implicancias, una de ellas es la influencia sobre la absorción intestinal. La pared del intestino está compuesta principalmente por células epiteliales (enterocitos) donde normalmente ocurre la absorción de nutrientes y entre las cuales se pueden distinguir unas agrupaciones de tejido linfoide denominadas Placas de Péyer cubiertas por un epitelio especial (formado por células M). En este contexto, existen tres posibles rutas de captación de partículas: intracelular (transporte a través de las células del epitelio), linfática (mediante células M y Placas de Peyer) y vía paracelular (trasporte a través de uniones intercelulares) (Kreuter J., *et al* 1999; García P. 2000). Partículas entre 5 y 10 µm serían captadas dentro de la mucosa y submucosa por las Placas de Peyer, mientras que las menores

de 5 µm podrían transitar a otros órganos como el bazo a través del drenaje linfático y por último, las partículas mayores de 5 µm serían captadas mayormente por la vía paracelular. En este sentido, de acuerdo al tamaño de partícula medido en las diferentes muestras (atomizadas) y según la literatura, puede inferirse que el mayor porcentaje de vesículas serían captadas por las células M, este hecho es de importancia si se quieren administrar vesículas por vía oral, ya que aumentarían la respuesta inmunológica de las mucosas

b) Morfología de las vesículas deshidratadas.

La microscopia electrónica de barrido (SEM) es una herramienta fundamental para estudiar la morfología de partículas de muy pequeño tamaño, permitiendo una visión tridimensional. Esta imagen es posible porque el haz de electrones generados por una fuente, es enfocado por lentes electromagnéticas a través de una columna con alto vacío, proyectándose sobre la superficie de la muestra donde los electrones rebotan o provocan la emisión de electrones secundarios de la muestra. Estos electrones dispersados o emitidos son recolectados por detectores y proyectados sobre una pantalla que proporciona una imagen tridimensional del objeto. Las muestras biológicas requieren previamente de un proceso de desecado y un recubrimiento con una película de un metal conductor.

En la Fig. Nº6 se muestra una microfotografía por SEM de una muestra de vesículas secas por liofilización. En ella se observan formas heterogéneas, algunas esféricas con superficie lisa (Fig. Nº6 derecha) de aproximadamente 30 micras de tamaño, otras aparecen fusionadas entre si, sugiriendo que el secado no fue exitoso. Sin embargo, la

explicación parece estar relacionada con la presencia del azúcar utilizado como crioprotector en las muestras, el cual por acción de la temperatura durante la preparación para la microscopía SEM, se fundiría formando aglomerados y produciendo la impresión de fusión que se observa en las fotografías antes señaladas.

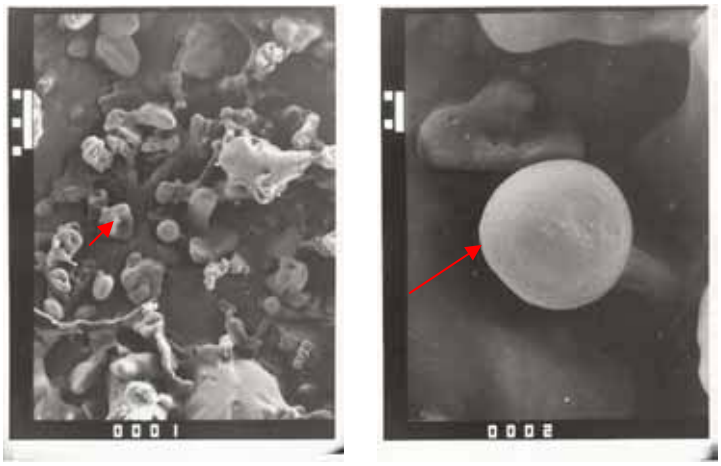


Figura Nº 6. Microfotografías de niosomas secados por liofilización con un aumento de 150x (izquierda) y 1000x (derecha).

Las Fig. Nº 7, 8 y 9 muestran microfotografías de vesículas secas por atomización en diferentes condiciones. En las fotografías de la Fig. Nº 7 se observan partículas aglomeradas entre si, comportamiento que estaría relacionado con las condiciones de secado con temperatura y alimentación similar (110ºC y 20ml/min), pero aspiración diferente (100 y 80%), estas condiciones determinaron un secado poco eficiente con bajos porcentajes de rendimientos (Tabla Nº 4) y mayores tamaños de partículas.

En las fotografías de la Fig. Nº8 se observa una disposición similar a la anterior, pero con algunas partículas individuales que tienen formas de donas (orificio en el centro) con diámetro aproximado de 7 micras.

En la Fig.Nº9 se observan fotografías que describen el comportamiento de las

partículas secas en condiciones de temperatura 110-150, alimentación y aspiración similares (5 mL/min, 80%). Bajo estas condiciones se puede observar una mayor presencia de partículas individuales de tamaño entre 3 a 5 micras, lo que se relaciona con las condiciones de secado más eficientes, que permitieron así mismo un mayor porcentaje de encapsulacion.

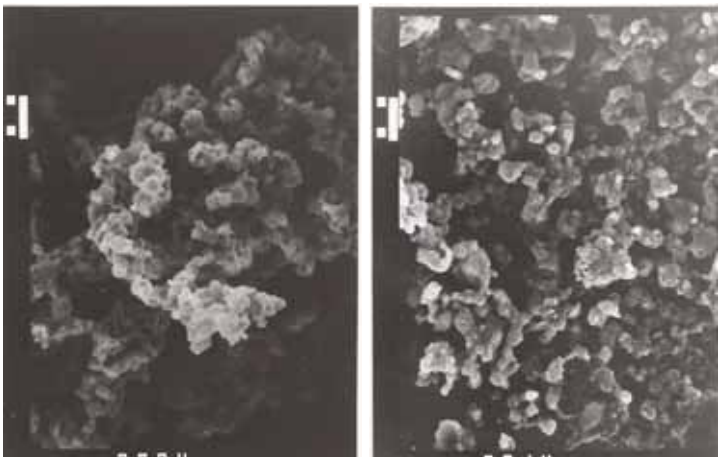


Figura Nº 7. Microfotografías de niosomas seco por atomización en condiciones de temperatura 110 ºC, alimentación 20 ml/min, y 100% de aspiración aumento 1000x (izquierda) y 110ºC, 20 ml/min,y 80%, aumento 1000x (derecha)

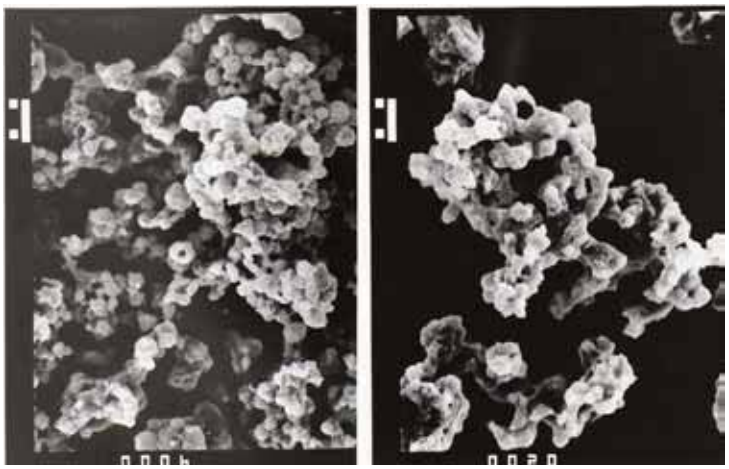


Figura Nº 8. Microfotografías de niosomas secos por atomización a condiciones de TºC (130),Al ml/min. (13), As % (90), aumento de 1000x (izquierda) y a condiciones de TºC (150), Al ml/min. (20), As % (100) 1000x (derecha),

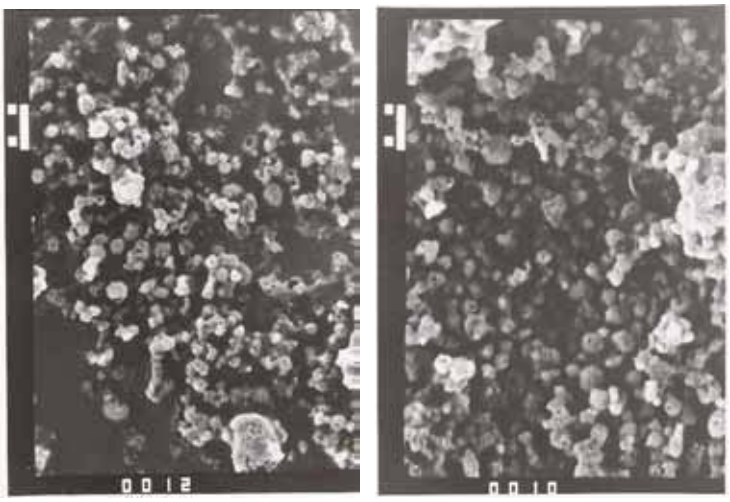


Figura Nª9. Microfotografías de niosomas secos por atomización a condiciones de TºC (110),Al ml/min. (5), As % (80) aumento 1000x (izquierda) y a condiciones de TºC (150),Al ml/min. (5), As % (80) aumento de 1000x (derecha).

El secado por atomización produce distintas formas morfológicas (Walton D., *et al* 1999; Maa Y., *et al* 2000) que dependen no solo de la naturaleza química de la muestra sino fundamentalmente de la velocidad de secado.

El cambio en la forma y topografía de las partículas también se puede explicar por la influencia del solvente sobre estas (Espósito E., *et al* 2000). Cuando el solvente comienza a evaporarse, en la superficie de las gotas se forma una capa sólida de polímero, generándose dos situaciones posibles:

a.- cuando la capa externa de polímero es porosa y permeable al solvente puede evaporase completamente, produciendo partículas de forma regular y esféricas.

b.- si dentro de los componentes de las gotas se encuentra un material soluble, se produce una fractura de la pared interna de esta para permitir la evaporación del solvente, formando partículas con presencia de cráteres en la superficie y de forma muy irregular y no necesariamente esférica.

6.4 Encapsulación de albúmina en las vesículas.

Los resultados de la encapsulación para los niosomas rehidratados desde muestras secas por atomización y liofilizados se muestran en la Tabla Nº 11 y Nº12 respectivamente.

Tabla Nº 11: Encapsulación de albúmina (%) en las vesículas secas por atomización en diferentes condiciones.

Vesículas atomizadas	Encapsulado (%)
V1	83,40
V2(*)	87,86
V3	81,20
V4	73,46
V5	79,43
V6	86,00
V7	72,88
V8	80,09
V9	85,34

(*)*Condición óptima teórica de secado*

El mayor rendimiento en la encapsulación para todas las condiciones evaluadas (considerando atomización y liofilización) correspondió a la condición V2, con un valor de 87,86%, esta condición también resultó ser la óptima en relación al rendimiento del secado. En esta condición las vesículas fueron pequeñas con un tamaño de partícula de 10,52µm, que implicaría un mayor número de unidades disponibles para la encapsulación. En contraposición, el menor porcentaje de encapsulacion lo presentó la condición V7 con un tamaño de partícula de 14,41um y una temperatura de 110ºC, alimentación 20ml/min y aspiración 100%; esto sugiere que el tamaño de partícula es un factor crítico para la encapsulación. En el Gráfico Nº4 se observa la correlación lineal encontrada en este estudio.

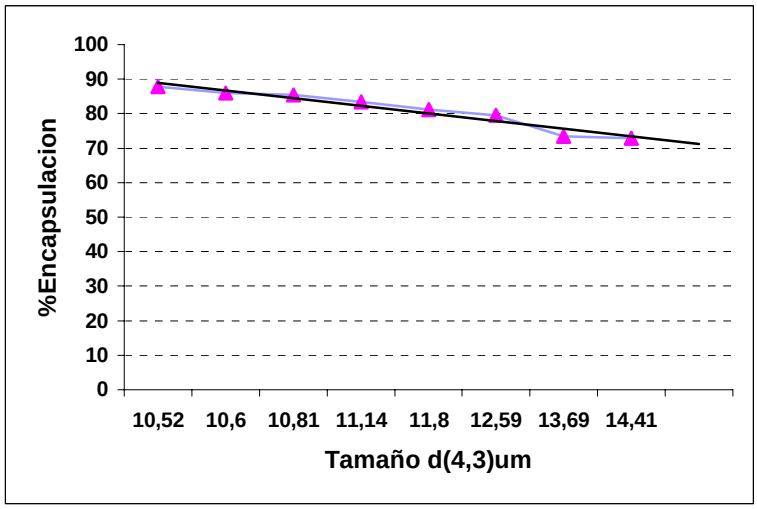


Gráfico Nº4: Correlación entre el tamaño de partícula y el porcentaje de encapsulacion de albúmina de las vesículas secas por atomizacion.

Tabla Nº 12*: Encapsulación de albúmina (%) en las vesículas secas por liofilización.*

Vesículas liofilizadas	Encapsulado (%)
L1	86,04
L2	85,32
L3	85,08
L4	85,67
L5	85,62
L6	83,85
L7	84,37
L8	82,17
L9	81,07
Promedio	84,35
Desviación Std	1,71
CV	2,03

En la Tabla Nº12 aparecen las mediciones realizadas a las 9 formulaciones que fueron liofilizadas en las mismas condiciones. Los resultados muestran porcentajes de encapsulacion similares a los obtenidos para las vesículas secas por atomización. Esta situación demostró que el secado por atomización es igualmente eficiente que el secado por liofilización. (Ver Gráfico Nº5)

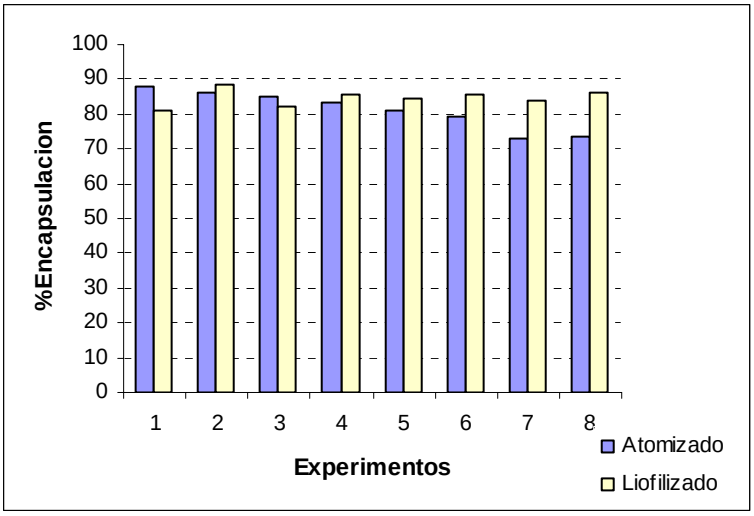


Gráfico Nº5: Comparación de eficiencia de encapsulacion de albúmina entre los niosomas secos por atomización y liofilización.

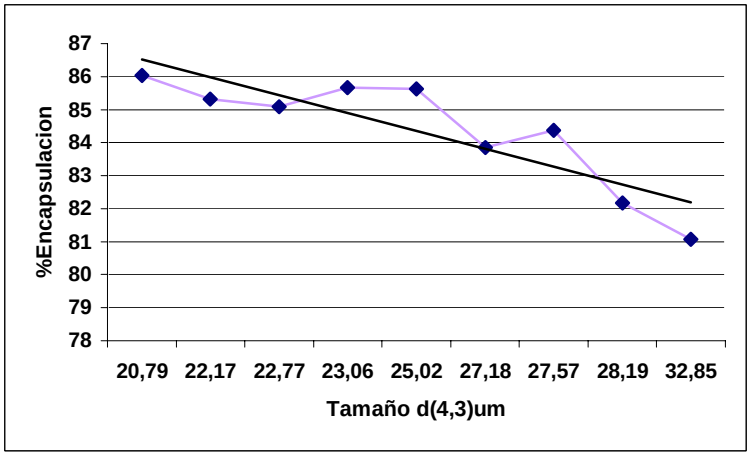


Gráfico Nº6: correlación entre el tamaño de partícula y el porcentaje de encapsulacion de albúmina de las vesículas secas por liofilización.

En el Gráfico Nº6, se puede observar nuevamente que el tamaño de partícula influye en el porcentaje de encapsulacion, obteniéndose para las vesículas liofilizadas de menor tamaño (20,79um), el porcentaje mas elevado.

Considerando lo antes señalado no es posible dar una explicación de por qué las

vesículas liofilizadas a pesar de presentar tamaños grandes presentan porcentajes de encapsulacion elevados, esto debido a que no se sabe cuantas vesículas (numero) disponibles hay en cada caso (liofilizadas y atomizadas

Igualmente se midió el porcentaje de encapsulacion de los niosomas secos con los soportes ya señalados antriormente. Los resultados mostraron que las vesículas con aerosil presentaron un 84,75% de encapsulación de albúmina en relación con las que contenían sacarosa con un 80,29%. Este valor es comparable con el porcentaje de encapsulacion obtenido con las vesículas sin soporte, lo que indica que el tipo de soporte utilizado no produce cambios importantes en la funcionalidad de ellas, sin embargo, indica que el tamaño de partícula esta comprometido en el porcentaje de encapsulacion, al obtenerse para la sacarosa un menor porcentaje de encapsulacion.

6.5 Actividad de agua (aw).

La aplicación de las vesículas como sistemas de transporte requiere de suficiente estabilidad química, producto de la hidrólisis de sus componentes lipídicos. Para evitar la inestabilidad tanto física como química los preparados niosomales deben deshidratarse y permanecer con la mínima cantidad de agua.

La aw se define como la relación entre la presión de vapor de agua contenida en un producto y la presión de vapor de agua de una atmósfera saturada aw = p/p0 (Chirife, 1983). La Tabla Nº13 muestra los resultados obtenidos de la medición de la actividad de agua en las vesículas secas por atomización y liofilización.

Tabla Nº 13: índice de agua de las vesículas secas por atomización a diferentes condiciones de secado.

Secas por atomización	Actividad de Agua (%)	Secas por liofilización	Actividad de agua (%)
V1	0,34	L1	0,228
V2 (*)	0,336	L2	0,226
V3	0,344	L3	0,232
V4	0,321	L4	0,235
V5	0,327	L5	0,237
V6	0,333	L6	0,242
V7	0,341	L7	0,244
V8	0,325	L8	0,248
V9	0,347	L9	0,237

El contenido de agua en una sustancia puede producir un deterioro como consecuencia de la pérdida de estabilidad por la acción de procesos de hidrólisis o de crecimiento bacteriano (Salunkhe *et al*. 1973). Los procesos de deterioro de un producto se pueden clasificar del siguiente modo:

a) a_w >0,9: corresponde a un contenido en agua en torno al 30%; estos productos deben someterse a tratamientos térmicos o químicos para inhibir el crecimiento microbiano.

b) a_w entre 0,9 y 0,7: la humedad oscila entre un 20 y un 30%; el producto empieza a ser estable con relación al crecimiento microbiano. Se acepta como límites para el crecimiento de las bacterias un 0,9 de aw; un 0,88 para las levaduras y 0,80 para los mohos.

c) a_w <0,7: el contenido de humedad está por debajo del 20%; son productos resistentes al deterioro microbiano, menos susceptibles a las reacciones de Maillard y más a las de

oxidación de lípidos que los de a_w intermedia

Según los resultados obtenidos tanto las vesículas secas por liofilización y atomización permitirían mantener condiciones de estabilidad.

CONCLUSIONES

El secado por atomización resultó un método adecuado para lograr la deshidratación de los niosomas, en comparación con la liofilización como metodología tradicional, ya que permitió mantener la forma de las vesículas, sin variaciones estadísticamente significativas en el tamaño de las partículas.

La mejor condición de secado evaluada mediante el rendimiento y el porcentaje de encapsulación incluyó: 150ºC de temperatura de entrada, 5% de alimentación, y 80% de aspiración, valores que resultaron ser los mismos que los calculados para el óptimo estadístico utilizando el diseño factorial.

Al evaluar el impacto del secado por atomización en las características de las vesículas se encontró que respecto de la capacidad de encapsulación de albúmina, el factor crítico resultó ser el tamaño de partícula, obteniéndose los mejores resultados con las vesículas de menor tamaño.

El empleo de soportes como alternativa para la optimización del proceso de secado mediante atomización de las vesículas no presentó ventajas comparativas en cuanto a rendimiento y porcentaje de encapsulación, respecto de los valores obtenidos para los mismos parámetros cuando no se usó soporte. Sin embargo,el aerosil presentó como ventaja la mejor estabilidad física de las partículas secas ya que estás no se aglomeraron ni cambiaron su aspecto durante el tiempo que duró este estudio.

La evaluación de la estabilidad de las vesículas mediante el número de agua permitió obtener un índice que reflejó el contenido de humedad relativo. De acuerdo a los resultados no se encontraron diferencias atribuibles al método de secado cuando se compararon las vesículas secas por liofilización como por atomización.

BIBLIOGRAFÍA

Rentel C., Bouwstra J., Naisbett B., Junginger H.1999. Niosomes as a novel peroral vaccine delivery system. *International Journal of Pharmaceutics, 186: 161-167.*

Tzannis S. & Prestrelski S. 1999. Moisture Effects on Protein Excipient Interactions in Spray-Dried Powders. Nature of Destabilizing Effects of Sucrose. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 88: 360-370.*

Ellis S 1996.The effects of spray-drying parameters on some chemical and physical characteristic of powdered phenol-formaldehyde resins. *Forest Products Journal, 46: 69-75*

Gideon F., Kersten, Daan J., Crommelin 2003: Liposomes and ISCOMs. V*accine 21: 915-920*

Espósito E, Roncarati R, Cortesi R, Carvellati F, Nastruzzi C., 2000. Production of Microparticles by Spray-Drying Technique: Influence of Experimental Parameter on Morphological and Dimensional Characteristics. *Pharm. Dev. Technol. 5(2): 267-278.*

Uchegbu I., Florence A. 1995. Non-ionic surfactant vesicles (niosomes): physical and pharmaceutical chemistry. *Advances in Colloid and Science, 58: 1-55.*

Uchegbu I., Vyas S. 1998. Non-ionic surfactant based vesicles (niosomes) in drug delivery . *International Journal of Pharmaceutics, 172: 33-70.*

Broadhead, J., Edmond R ., Rhodes, C. 1992. The spray-drying of pharmaceuticals, *Drug Dev. Ind. Pharm., 18:1169-1206.*

Mohamedi S., Brewer J., Alexander J., Heath A., Jennings R. 2000. Antibody responses cytokine levels and protection of mice with HSV-2 antigens formulated into NISV or ISCOM delivery systems*. Vaccine, 18: 2083-2094.*

Hassan Y., Brewer J., Alexander J., Jennings R. 1996. Immune responses in mice induced by HSV-1 glycoproteins presented with ISCOMs or NIVS delivery systems. *Vaccine, 14(17/18): 1581-1589.*

Kreuter J., Araujo L. et al 1999. Uptake of PMMA Nanoparticles from the Gastrointestinal Tract Alter Oral Administration to Rats: Mdification of the Body Distribution Alter Suspensión in Surfactant Solution and in Oil Vesicles, Int. *J.Pharm.176:209-293*

Palmieri G.,Bonacucina G ., Martino P & Martelli S. 2001. Spray-Drying as a Method

for Microparticulate Controlled Release Systems Preparation: Advantages and Limits. I. Water-Soluble Drugs. *Drug Development and Industrial Pharmacy, 27(3): 195–204..*

Soler D y García M. 2001:Influencia de la cantidad de aerosil sobre las propiedades físico-químicas del tiocianato. *Rev. salud anim. vol. 23 no. 2 139-142*

Costantino H., Firouzabadian L., Wu C.,Carrasquillo K., Griebenow K., Zale S., Tracy M. 2002.Protein Spray Freeze-drying .Effect of formulation variables on particle size and stability. *Journal of pharmaceutical sciences, 91:388-395*

Van Hal D. 1966. Noionic surfactant vesicles for dermal and transdermal drug delivery. Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad Rijk de Leiden, Holanda.

Van Winden E,1996." Freeze-drying of liposomes" Tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad Utrecht de Utrecht, Holanda.

Baille A., Florence A., Humme L., Muirhead G., Rogerson A.,1985. The preparation and properties of niosomes-non-ionic surfactant vesicles . *J. Pharmacol., 37:863-868*.

Monosroi A., Wongtrakul P., Manosroi J., & Abe M. 2003. Characterization of vesicles prepared with various non-ionic surfactants mixed with cholesterol. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 30: 129-138.*

Muller D., Foulon M., Bonnemain B & Vandamme T. 2000. Niosomes as carriers of radiopaque contrastagents for X-ray imaging. *J. Microencapsulation , 17: 227 – 243*

Kirby C., Gregoriadis G. 1984: Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapament in liposomes. *Biotechnology, 2:979-984.*

Walton D & Mumford C. 1999: Spray dried products-characterization of particle morphology. *Trans IChemE, vol 77, Part A., 21-38.*

Conacher M., Alexander J., Brewer J. 2000. Niosomes as immunological adyuvants. In Synthetic Surfactant Vesicles. (Ed. I.F. Uchegbu). *International Publishers Distributors Ltd. Singapore, 185-205.*

Goula A. & Adamopoulos K. 2004: Influence of spray drying conditions on residue accumulation-simulation using CFD. *Drying Technology ,22:1107-1128*

Maa Y. & Prestrelski S. 2000.Biopharmaceutical powders: particle formation and formulation considerations. *Current Pharmaceutical Biotechnology, 1: 283-302.*

Lasic D., *et al* 1988. The mechanism of liposome formation. *A review, Biochem. J. 256, 1–11.*

Muller C., Bassani V.,Pohlmann A.., 2000:Preparation and characterization of spray-dried polymeric nanocapsules. *Drug development and industrial pharmacy,26(3),343-347.*

Navarra. 2005. Boletín de Información Farmacoterapéutica. Vol 13 Nº1

Garcia P., 2000. Desarrollo y Evaluacion de una Formulacion en base a Vesiculas Destinada a la Administracion Oral de vacunas. Tesis para optar al grado de magíster en ciencias Farmaceuticas. Universidad de Chile

Bakan J.1986. Microencapsulation. En Lachman L.., Lieberman HA, Kanig JL. The theory and practice of industrial pharmacy, 3th Ed., Lea y Febiger, Philadelphia, 346-373

Salunkhe, D.K., Do, J.Y. y Bolin, H.R. 1973. Developments in technology and nutritive value of dehydrated fruits, vegetables and their products. *CRC Crit. Rev. Food Technol., November, 153-192.*

Lasic D*. et al,* 1995*:* Applications of Liposomes. *Elsevier Science B.V.Handbook of Biological Physics Liposome Technology.*

Pringels E., Ameye D., Vervaet C., Foreman P., Remon J. 2005. Starch/Carbopol® spray-dried mixtures as excipients for oral sustained drug delivery. *Journal of controlled release, 103: 635-641.*

Baras B., Benoit M. & Gillard J. 2000. Influence of various technological parameters on the preparation of spray-dried poly (ε-caprolactone) microparticles containing a model antigen. *J.Microencapsulation , 17: 485-498*

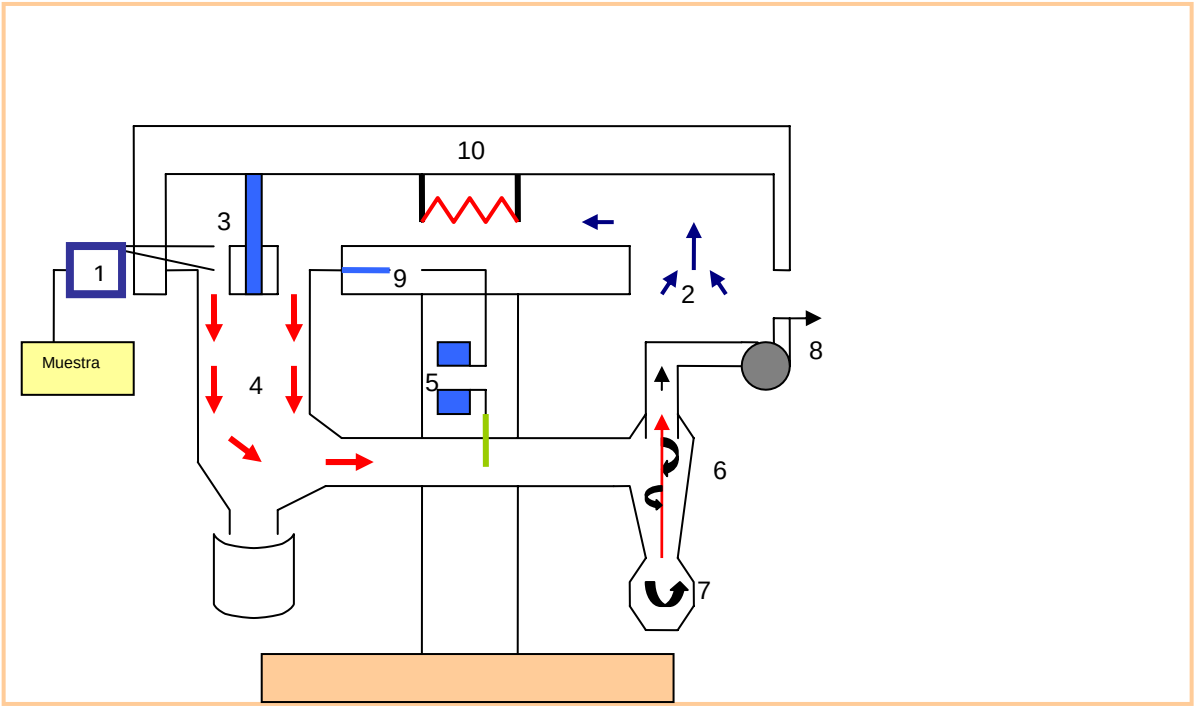
Lin Jui-Chen & Gentry J., 2003: Spray Drying drop morphology study *.Aerosol Science and Tecnology 37:15-32.*

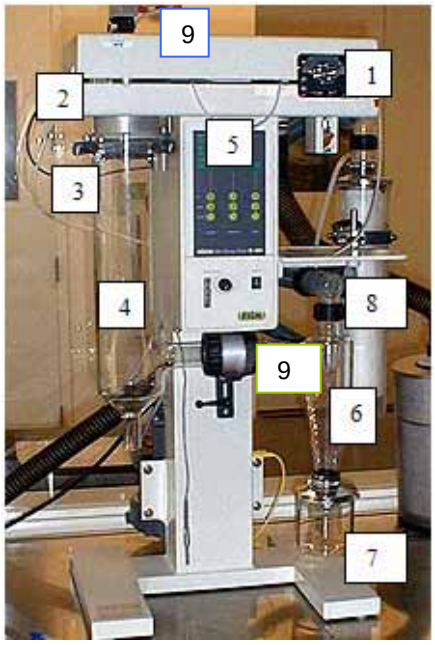
Prinn K, Costantino H., & Tracy M, 2002: Statistical modeling of protein spary drying at the lab scale. *AAPS Pharmscitech 3:1-8*

ANEXOS

Anexo I

Diagrama de funcionamiento del mini atomizador spray Büchi.



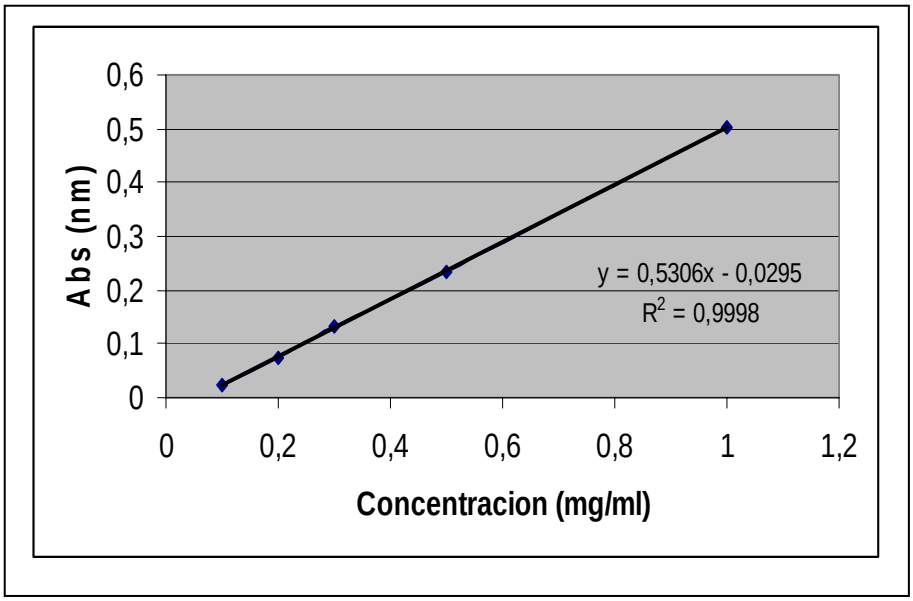


(1) Bomba de alimentación
(2) Entrada de aire caliente
(3) Inyector- atomizador
(4) Cámara de deshidratación o atomización. Se da la transferencia de calor y materia
(5) Panel de Control :Temperatura , alimentación , flujo de aire
(6) Ciclón separador. Permite separar el producto deshidratado en forma de partículas de polvo del flujo de aire húmedo
(7) Recipiente de recogida de producto en polvo
(8) Conducción de salida del aire y vapor de agua
(9) Sensores de temperatura de entrada (—) y salida (—)
(10) Horno de calentamiento

Anexo 2:

Curva de Calibración de Albúmina Bovina Sérica

Concentración inicial 5mg/ml



Albúmina (mg/mL)	Absorbancia (nm)
0,1	0,025
0,2	0,074
0,3	0,133
0,5	0,233
1	0,502

Anexo 3*:*

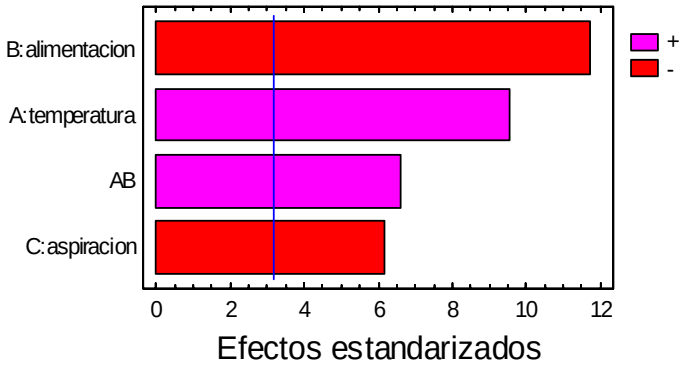
Resultados análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Razón F	Valor p
A: temperatura	246,42	1	246,42	91,15	0,0024
B: alimentación	372,645	1	372,645	137,85	0,0013
C: aspiración	102,245	1	102,245	37,82	0,0086
AB	117,045	1	117,045	43,30	0,0071
Falta de ajuste	53,9917	4	13,4979	4,99	0,1087
Error Puro	8,11	3	2,70333	-	-
Total (corr.)	900,457	11	-	-	-

R-cuadrado =	93,1033 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.) =	89,1624 por ciento
Error Estándar de Est. =	1,64418
Error absoluto de la media =	1,92778
Estadístico Durbin-Watson =	2,05189 (P=0,4684)
Autocorrelación residual Lag 1 =	-0,0649953

Efectos estimados para Rendimiento	
Promedio	= 59,0833 +/- 0,474634
A: Temperatura	= 11,1 +/- 1,16261
B: Alimentación	= -13,65 +/- 1,16261
C: Aspiración	= -7,15 +/- 1,16261
AB	= 7,65 +/- 1,16261

Gráfico de Pareto estandarizado para rendimiento

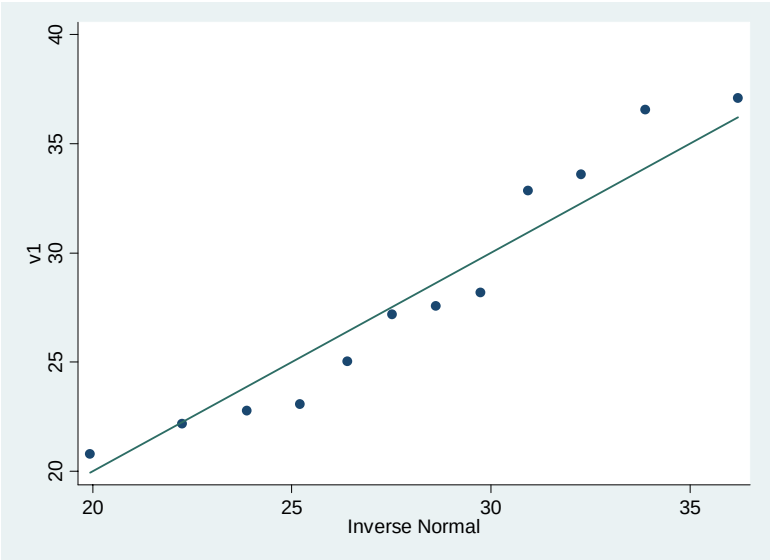


Anexo 4

Test para evaluar la distribución normal de los datos obtenidos en la medición del tamaño de partícula

D(4,3)µm	D(0,5)µm	D(0,1)µm	D(0,9)µm
20.79	11.59	3.05	50.44
22.17	10.6	2.36	55.52
22.77	15.57	2.59	52.52
23.06	11.81	3.43	57.13
25.02	14.48	2.34	63.68
27.18	18.92	3.37	62.65
27.57	19.23	3.07	55.78
28.19	20.71	4.12	58.35
32.85	11.17	3.36	86.81
33.59	28.85	3.77	65.91
36.55	27.04	4.17	76.94
37.09	29.39	5.8	72.21

Shapiro-Wilk W		test for normal data			
Variable	***Obs***	**W**	**V**	**z**	**Prob>z**
v2	12	0.88823	1.867	1,217	0.11182
v3	12	0.89536	1.748	1,089	0.13817
v4	12	0.91400	1.437	0,706	0.23997
v1	12	0.91559	1.410	0,67	0.25146



Anexo 5:

Medición de tamaños de partículas de vesículas sin secar, secas por atomizacion (distribución normal) y secas por liofilización (distribución bimodal)

I-2330Promedio (1-7) :Run Number 0

I-2330: Muestra 4
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. -- OT: I-848
Sample File Name: TECFARM , Record: 208 *Source:* Averaged
Measured on: Tue, 13 13e Sep 13e 2005 1 Last saved on: Tue, 13 13e Sep 13e 2005 1

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

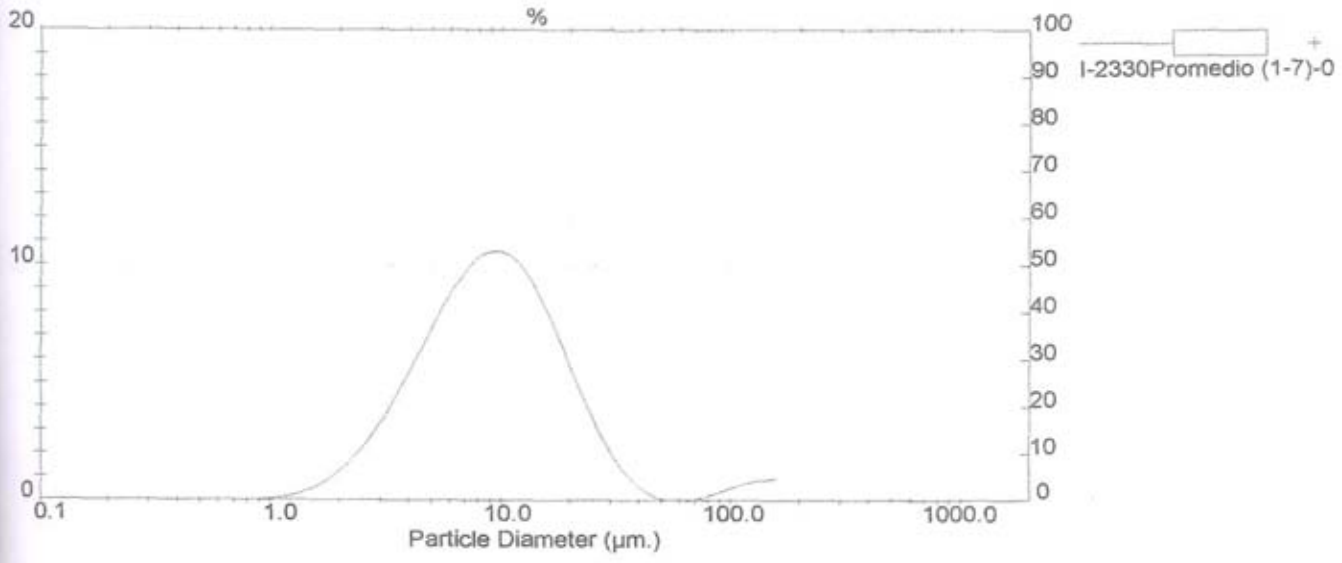
Residual = 0.240 %
d (0.5) = 9.17 µm
D [4, 3] = 14.41 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 7.08 µm
Specific Surface Area = 0.8479 sq. m. / gm

Concentration = 0.018 %
d (0.1) = 3.59 µm
Span = *2.08*

Obscuration = 19.08 %
d (0.9) = 22.68 µm

Mode = 9.54 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.00	0.48	0.00
0.48	0.00	0.59	0.00
0.59	0.00	0.71	0.00
0.71	0.01	0.86	0.01
0.86	0.04	1.04	0.06
1.04	0.13	1.26	0.19
1.26	0.34	1.52	0.53
1.52	0.71	1.84	1.24
1.84	1.29	2.23	2.52
2.23	2.13	2.70	4.65
2.70	3.23	3.27	7.88
3.27	4.59	3.95	12.47
3.95	6.14	4.79	18.61
4.79	7.72	5.79	26.33
5.79	9.16	7.01	35.49
7.01	10.19	8.48	45.68
8.48	10.64	10.27	56.32
10.27	10.33	12.43	66.65
12.43	9.29	15.05	75.94
15.05	7.65	18.21	83.59
18.21	5.73	22.04	89.32
22.04	3.83	26.68	93.15
26.68	2.25	32.29	95.39
32.29	1.10	39.08	96.49
39.08	0.37	47.30	96.87
47.30	0.04	57.25	96.90
57.25	0.03	69.30	96.94
69.30	0.15	83.87	97.09
83.87	0.42	101.52	97.51
101.52	0.68	122.87	98.19
122.87	0.86	148.72	99.05
148.72	0.95	180.00	100.00



I-2435 Promedio :Run Number 0

I-2435: Muestra C
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. -- OT: I-887
Sample File Name: TECFARM , Record: 897 Source: Averaged
Measured on: Thu, 06 6e Oct 6e 2005 05: Last saved on: Thu, 06 6e Oct 6e 2005 05:

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

Residual = 0.147 %
d (0.5) = 8.13 µm
D [4, 3] = 14.69 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 5.65 µm
Specific Surface Area = 1.0610 sq. m. / gm

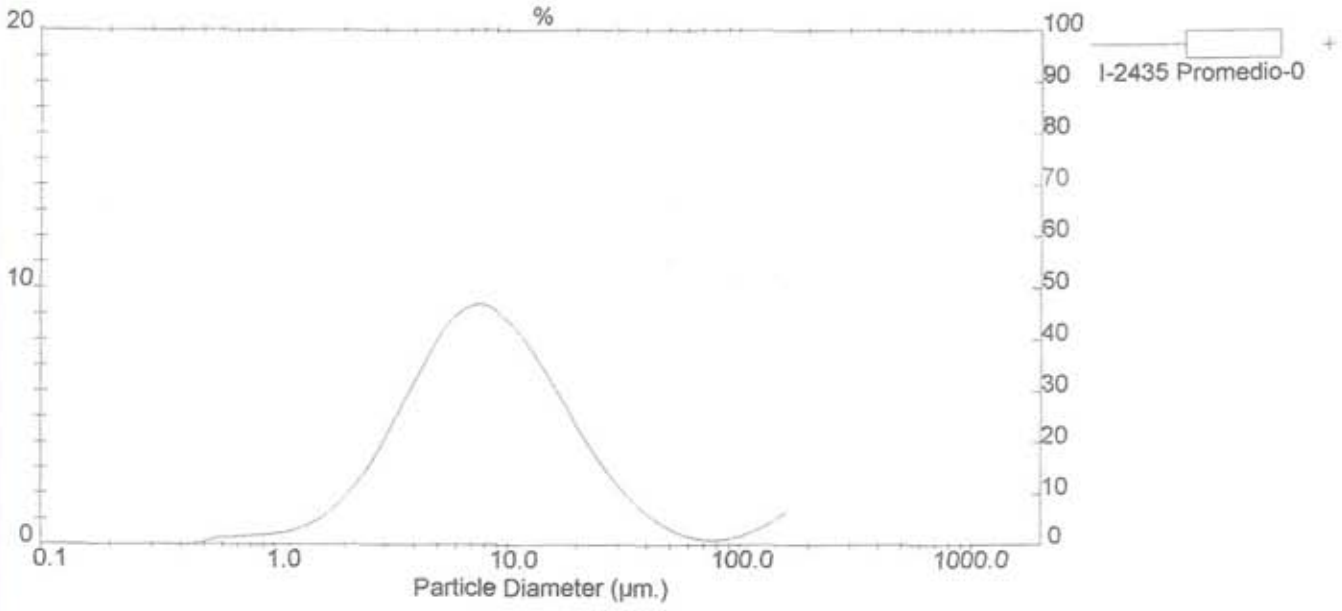
Concentration = 0.007 %
d (0.1) = 2.91 µm
Span = 2.78

Obscuration = 10.04 %
d (0.9) = 25.49 µm

Mode = 7.65 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.06	0.48	0.06
0.48	0.20	0.59	0.26
0.59	0.31	0.71	0.56
0.71	0.37	0.86	0.93
0.86	0.42	1.04	1.35
1.04	0.52	1.26	1.87
1.26	0.75	1.52	2.62
1.52	1.19	1.84	3.81
1.84	1.88	2.23	5.69
2.23	2.87	2.70	8.56
2.70	4.11	3.27	12.68
3.27	5.55	3.95	18.23
3.95	7.03	4.79	25.26
4.79	8.29	5.79	33.55
5.79	9.12	7.01	42.67
7.01	9.37	8.48	52.04

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	9.06	10.27	61.10
10.27	8.28	12.43	69.39
12.43	7.21	15.05	76.60
15.05	5.96	18.21	82.57
18.21	4.68	22.04	87.25
22.04	3.48	26.68	90.73
26.68	2.47	32.29	93.20
32.29	1.67	39.08	94.87
39.08	1.03	47.30	95.90
47.30	0.58	57.25	96.48
57.25	0.30	69.30	96.78
69.30	0.21	83.87	96.99
83.87	0.28	101.52	97.26
101.52	0.51	122.87	97.77
122.87	0.88	148.72	98.65
148.72	1.35	180.00	100.00



I-2332 Promedio(1-7) :Run Number 0

I-2332: Muestra 5
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. — OT: I-848
Sample File Name: TECFARM , Record: 1169 Source: Averaged
Measured on: Fri, 23 23e Sep 23e 2005 0 Last saved on: Tue, 07 7e Mar 7e 2006 04:

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

Residual = 0.275 %
d (0.5) = 7.97 µm
D [4, 3] = 11.14 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 5.84 µm
Specific Surface Area = 1.0269 sq. m. / gm

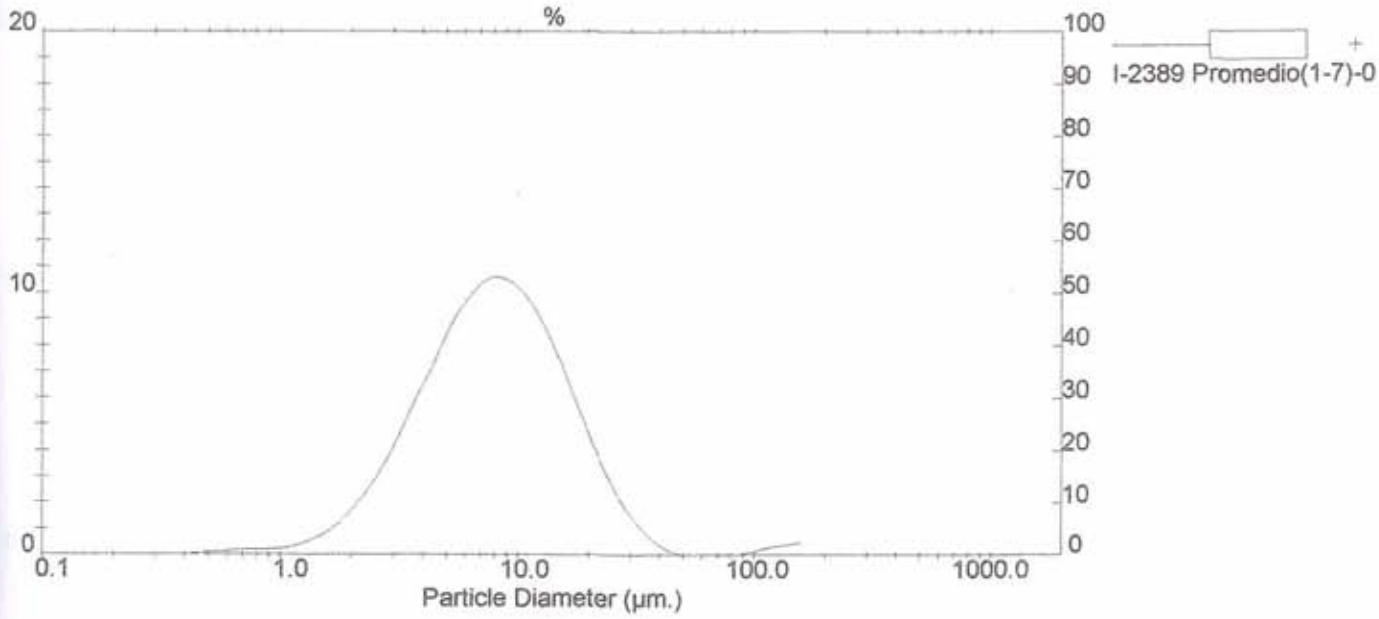
Concentration = 0.009 %
d (0.1) = 3.09 µm
Span = 2.02

Obscuration = 11.94 %
d (0.9) = 19.16 µm

Mode = 8.13 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.05	0.48	0.05
0.48	0.13	0.59	0.17
0.59	0.18	0.71	0.35
0.71	0.20	0.86	0.55
0.86	0.23	1.04	0.78
1.04	0.33	1.26	1.11
1.26	0.58	1.52	1.69
1.52	1.04	1.84	2.73
1.84	1.76	2.23	4.48
2.23	2.78	2.70	7.27
2.70	4.08	3.27	11.35
3.27	5.61	3.95	16.96
3.95	7.24	4.79	24.20
4.79	8.76	5.79	32.95
5.79	9.96	7.01	42.91
7.01	10.57	8.48	53.48

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	10.50	10.27	63.98
10.27	9.72	12.43	73.70
12.43	8.33	15.05	82.04
15.05	6.54	18.21	88.57
18.21	4.65	22.04	93.22
22.04	2.95	26.68	96.17
26.68	1.65	32.29	97.82
32.29	0.77	39.08	98.59
39.08	0.21	47.30	98.80
47.30	0.01	57.25	98.81
57.25	0.00	69.30	98.81
69.30	0.00	83.87	98.81
83.87	0.07	101.52	98.88
101.52	0.25	122.87	99.13
122.87	0.40	148.72	99.53
148.72	0.47	180.00	100.00



I-2436 Promedio :Run Number 0

I-2436: Muestra D
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. — OT: I-887
Sample File Name: TECFARM , Record: 978 Source: Averaged
Measured on: Thu, 06 6e Oct 6e 2005 05: Last saved on: Thu, 06 6e Oct 6e 2005 05:

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

Residual = 0.147 %
d (0.5) = 7.53 µm
D [4, 3] = 10.90 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 5.29 µm
Specific Surface Area = 1.1338 sq. m. / gm

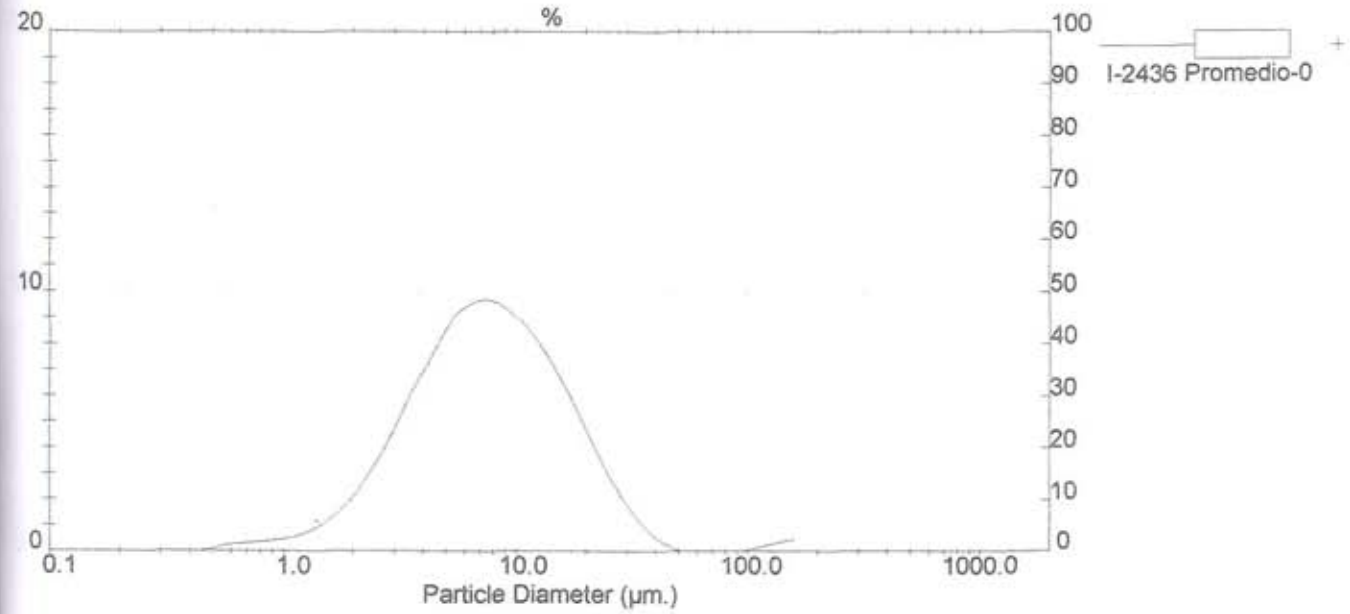
Concentration = 0.016 %
d (0.1) = 2.74 µm
Span = 2.27

Obscuration = 21.93 %
d (0.9) = 19.83 µm

Mode = 7.48 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.05	0.48	0.05
0.48	0.18	0.59	0.23
0.59	0.29	0.71	0.52
0.71	0.37	0.86	0.90
0.86	0.45	1.04	1.35
1.04	0.60	1.26	1.94
1.26	0.89	1.52	2.83
1.52	1.40	1.84	4.23
1.84	2.18	2.23	6.40
2.23	3.26	2.70	9.67
2.70	4.61	3.27	14.28
3.27	6.13	3.95	20.41
3.95	7.61	4.79	28.02
4.79	8.81	5.79	36.83
5.79	9.54	7.01	46.38
7.01	9.68	8.48	56.05

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	9.31	10.27	65.37
10.27	8.57	12.43	73.93
12.43	7.53	15.05	81.47
15.05	6.22	18.21	87.69
18.21	4.73	22.04	92.42
22.04	3.23	26.68	95.65
26.68	1.94	32.29	97.59
32.29	0.98	39.08	98.57
39.08	0.35	47.30	98.92
47.30	0.03	57.25	98.95
57.25	0.00	69.30	98.95
69.30	0.00	83.87	98.95
83.87	0.03	101.52	98.98
101.52	0.17	122.87	99.15
122.87	0.35	148.72	99.50
148.72	0.50	180.00	100.00



I-2387 Promedio(1-7) :Run Number 0

I-2387: Muestra 7
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. -- OT: I-866
Sample File Name: TECFARM , Record: 395 Source: Averaged
Measured on: Fri, 23 23e Sep 23e 2005 0 Last saved on: Fri, 23 23e Sep 23e 2005 0

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

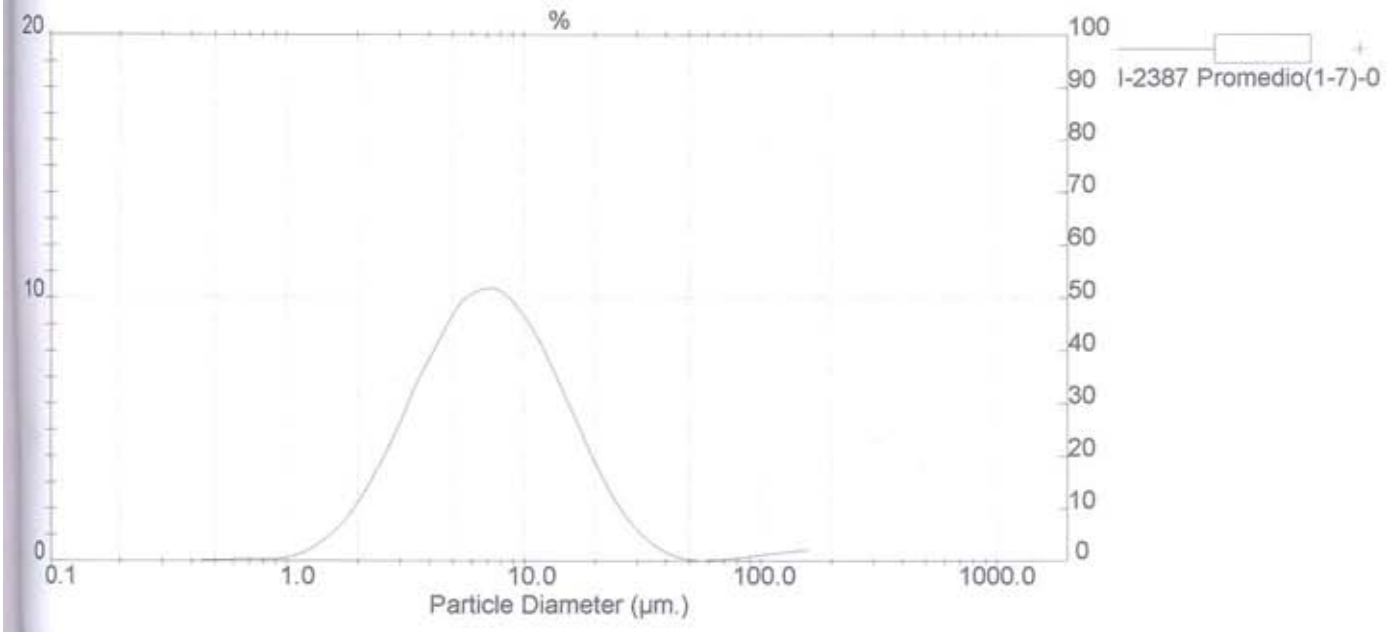
Residual = 0.175 %
d (0.5) = 7.14 µm
D [4, 3] = 10.52 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 5.50 µm
Specific Surface Area = 1.0918 sq. m. / gm

Concentration = 0.012 %
d (0.1) = 2.85 µm
Span = 2.13

Obscuration = 16.72 %
d (0.9) = 18.04 µm

Mode = 7.30 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.04	0.48	0.04
0.48	0.07	0.59	0.12
0.59	0.08	0.71	0.20
0.71	0.08	0.86	0.28
0.86	0.12	1.04	0.40
1.04	0.30	1.26	0.70
1.26	0.69	1.52	1.38
1.52	1.35	1.84	2.74
1.84	2.32	2.23	5.06
2.23	3.62	2.70	8.68
2.70	5.16	3.27	13.85
3.27	6.83	3.95	20.68
3.95	8.39	4.79	29.08
4.79	9.61	5.79	38.68
5.79	10.31	7.01	48.99
7.01	10.35	8.48	59.34
8.48	9.76	10.27	69.09
10.27	8.62	12.43	77.71
12.43	7.11	15.05	84.82
15.05	5.40	18.21	90.22
18.21	3.76	22.04	93.98
22.04	2.36	26.68	96.34
26.68	1.31	32.29	97.65
32.29	0.63	39.08	98.29
39.08	0.23	47.30	98.51
47.30	0.05	57.25	98.56
57.25	0.05	69.30	98.61
69.30	0.11	83.87	98.72
83.87	0.19	101.52	98.91
101.52	0.29	122.87	99.20
122.87	0.37	148.72	99.57
148.72	0.43	180.00	100.00



I-2392 Promedio(1-7) :Run Number 0

I-2392: Muestra Aerosil
Solicitante: Karina Valdes — Tecnologia Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. — OT: I-866
Sample File Name: TECFARM , Record: 1171 Source: Averaged
Measured on: Fri, 23 23e Sep 23e 2005 0 Last saved on: Tue, 07 7e Mar 7e 2006 04:

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

Residual = 0.321 %
d (0.5) = 10.26 µm
D [4, 3] = 11.33 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 8.98 µm
Specific Surface Area = 0.6679 sq. m. / gm

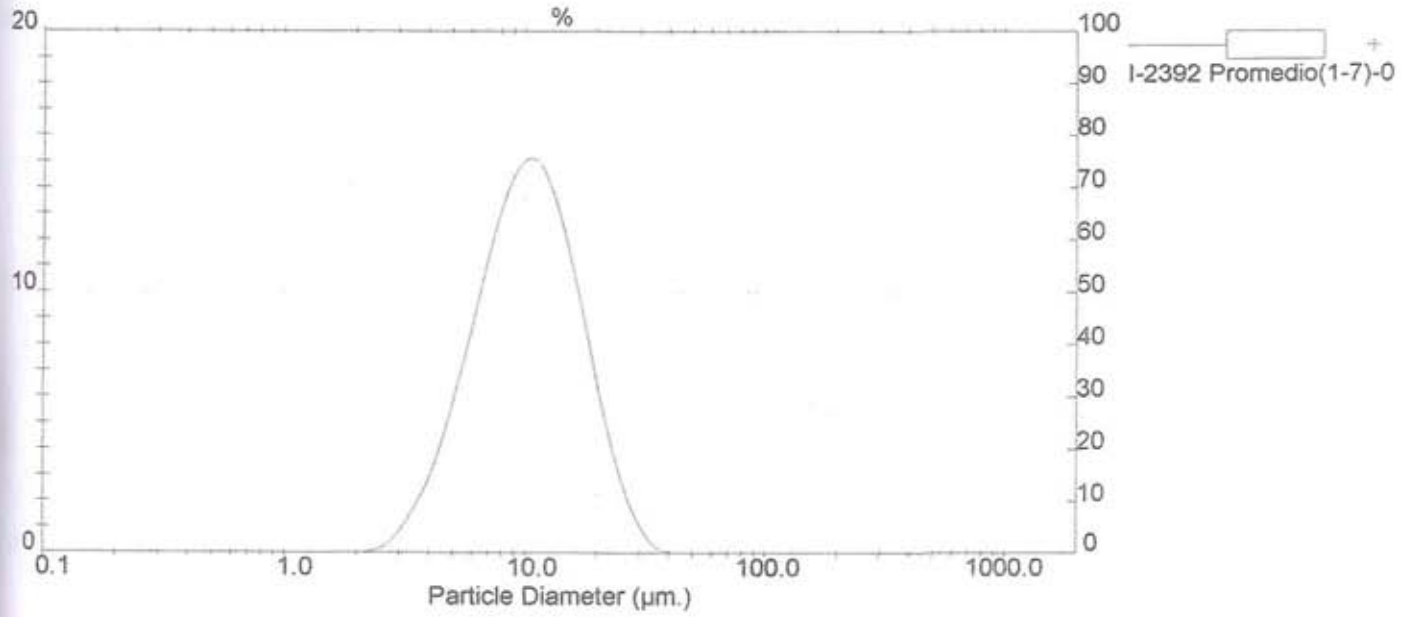
Concentration = 0.036 %
d (0.1) = 5.32 µm
Span = 1.31

Obscuration = 26.80 %
d (0.9) = 18.78 µm

Mode = 10.71 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.00	0.48	0.00
0.48	0.00	0.59	0.00
0.59	0.00	0.71	0.00
0.71	0.00	0.86	0.00
0.86	0.00	1.04	0.00
1.04	0.00	1.26	0.00
1.26	0.00	1.52	0.00
1.52	0.00	1.84	0.00
1.84	0.00	2.23	0.00
2.23	0.17	2.70	0.17
2.70	0.78	3.27	0.95
3.27	1.96	3.95	2.91
3.95	3.86	4.79	6.77
4.79	6.42	5.79	13.19
5.79	9.56	7.01	22.75
7.01	12.59	8.48	35.34

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	14.73	10.27	50.07
10.27	15.07	12.43	65.14
12.43	13.39	15.05	78.53
15.05	10.17	18.21	88.70
18.21	6.50	22.04	95.19
22.04	3.34	26.68	98.54
26.68	1.25	32.29	99.79
32.29	0.21	39.08	100.00
39.08	0.00	47.30	100.00
47.30	0.00	57.25	100.00
57.25	0.00	69.30	100.00
69.30	0.00	83.87	100.00
83.87	0.00	101.52	100.00
101.52	0.00	122.87	100.00
122.87	0.00	148.72	100.00
148.72	0.00	180.00	100.00



I-2332 Promedio(1-7) :Run Number 0

I-2332: Muestra Sacarosa
Solicitante: Karina Valdes — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. -- OT: I-848
Sample File Name: TECFARM , Record: 1170 Source: Averaged
Measured on: Fri, 23 23e Sep 23e 2005 0 Last saved on: Tue, 07 7e Mar 7e 2006 04:

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

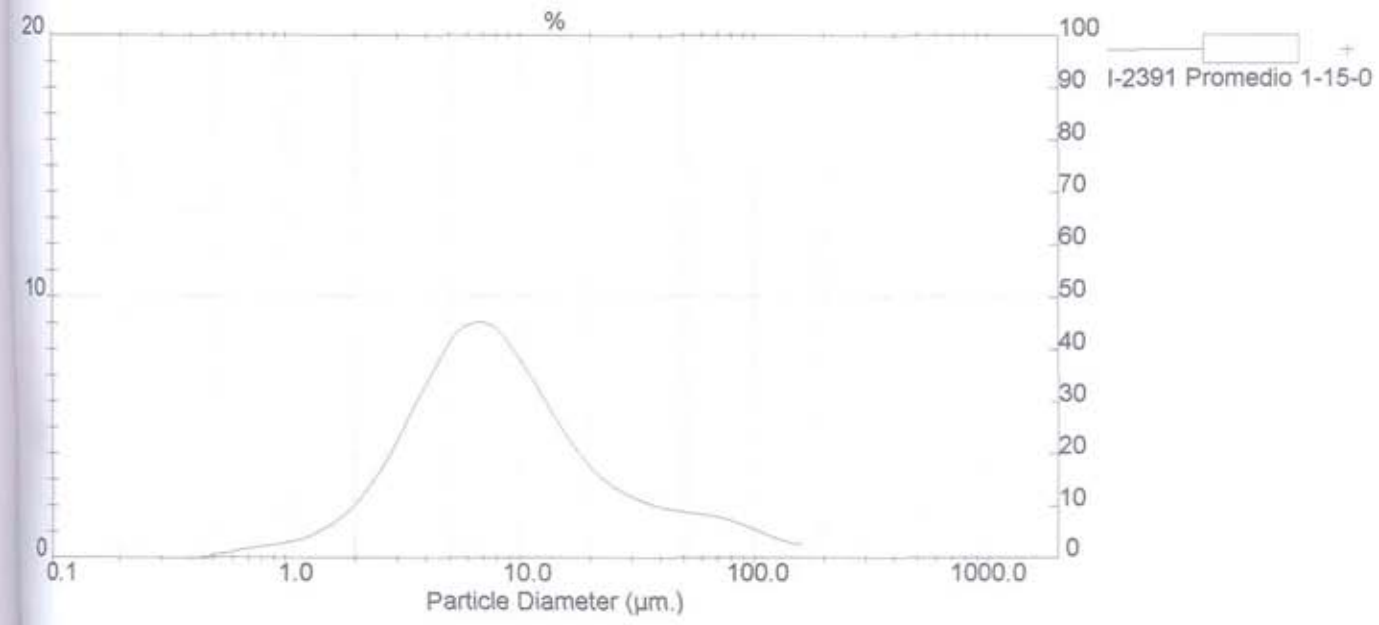
Residual = 0.197 %
d (0.5) = 7.80 µm
D [4, 3] = 16.31 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 5.48 µm
Specific Surface Area = 1.0952 sq. m. / gm

Concentration = 0.005 %
d (0.1) = 2.72 µm
Span = 4.75

Obscuration = 7.60 %
d (0.9) = 39.77 µm

Mode = 6.90 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.03	0.48	0.03
0.48	0.17	0.59	0.20
0.59	0.31	0.71	0.51
0.71	0.43	0.86	0.95
0.86	0.55	1.04	1.49
1.04	0.69	1.26	2.19
1.26	0.97	1.52	3.16
1.52	1.43	1.84	4.59
1.84	2.14	2.23	6.73
2.23	3.14	2.70	9.87
2.70	4.40	3.27	14.27
3.27	5.87	3.95	20.15
3.95	7.32	4.79	27.47
4.79	8.46	5.79	35.93
5.79	9.04	7.01	44.96
7.01	8.88	8.48	53.84
8.48	8.10	10.27	61.94
10.27	6.91	12.43	68.86
12.43	5.63	15.05	74.49
15.05	4.45	18.21	78.94
18.21	3.52	22.04	82.46
22.04	2.85	26.68	85.31
26.68	2.41	32.29	87.72
32.29	2.10	39.08	89.82
39.08	1.89	47.30	91.71
47.30	1.76	57.25	93.46
57.25	1.66	69.30	95.12
69.30	1.50	83.87	96.62
83.87	1.25	101.52	97.87
101.52	0.94	122.87	98.81
122.87	0.67	148.72	99.47
148.72	0.53	180.00	100.00



MASTERSIZER

Version 1.2b | Thu, 18 18e May 18e 2006

I-3955 Promedio **:Run Number 0**

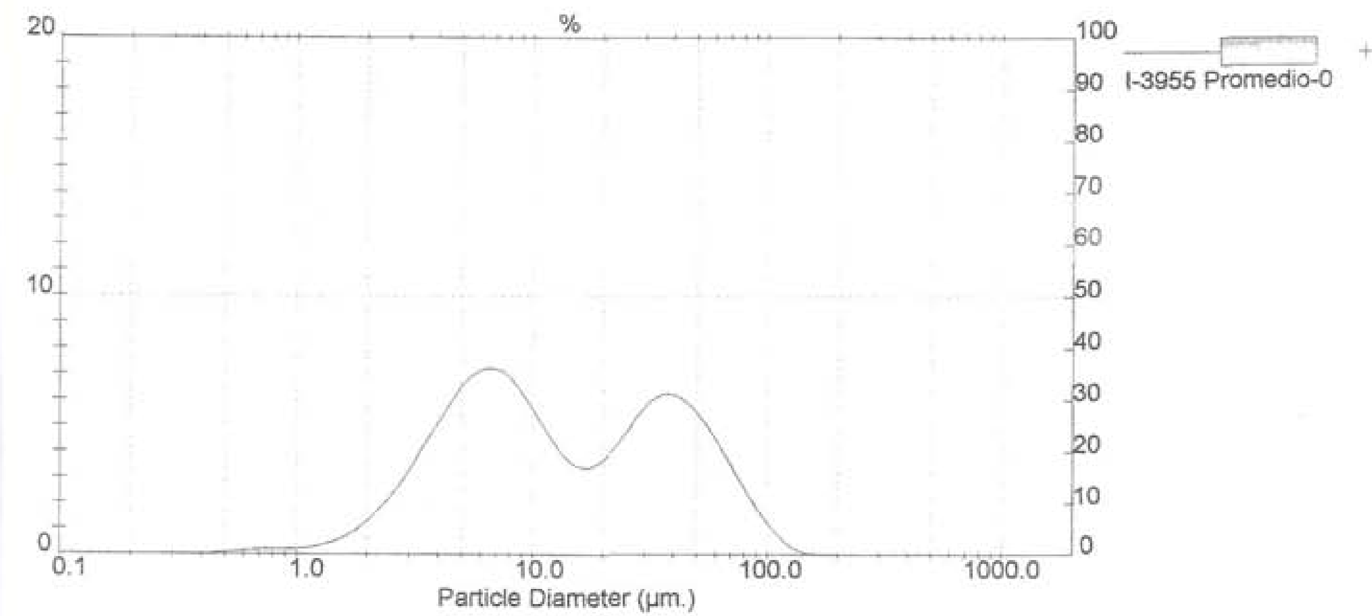
I-3955: Muestra 12
Solicitante: Jorge Chávez --- Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. -- OT: I-092/06
Sample File Name: TECFARM , Record: 1033 — Source: Averaged
Measured on: Wed, 17 17e May 17e 2006 0 Last saved on: Thu, 18 18e May 18e 2006 0

Presentation: 2RHD
Polydisperse model — Volume Result — Focus = 100 mm.

Residual = 0.178 %
Concentration = 0.017 %
Obscuration = 21.96 %
d (0.1) = 3.43 µm
d (0.9) = 57.13 µm
D [4, 3] = 23.06 µm
Span = 4.55
Sauter Mean (D[3,2]) = 7.48 µm
Mode = 6.75 µm
Specific Surface Area = 0.8017 sq. m. / gm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.04	0.48	0.04
0.48	0.12	0.59	0.16
0.59	0.18	0.71	0.34
0.71	0.20	0.86	0.54
0.86	0.22	1.04	0.76
1.04	0.28	1.26	1.04
1.26	0.45	1.52	1.48
1.52	0.78	1.84	2.27
1.84	1.35	2.23	3.62
2.23	2.18	2.70	5.80
2.70	3.22	3.27	9.02
3.27	4.44	3.95	13.46
3.95	5.70	4.79	19.16
4.79	6.72	5.79	25.88
5.79	7.23	7.01	33.11
7.01	7.03	8.48	40.14

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	6.14	10.27	46.28
10.27	4.92	12.43	51.20
12.43	3.86	15.05	55.06
15.05	3.39	18.21	58.45
18.21	3.70	22.04	62.14
22.04	4.59	26.68	66.74
26.68	5.62	32.29	72.36
32.29	6.21	39.08	78.57
39.08	6.11	47.30	84.68
47.30	5.37	57.25	90.05
57.25	4.25	69.30	94.30
69.30	2.94	83.87	97.24
83.87	1.73	101.52	98.97
101.52	0.78	122.87	99.75
122.87	0.19	148.72	99.94
148.72	0.06	180.00	100.00



MASTERSIZER X

Version 1.2b

Thu, 18 18e May 18e 2006

I-3953 Promedio :Run Number 0

I-3953: Muestra 10
Solicitante: Jorge Chávez — Tecnología Farmacéutica
Dispersante: Agua destilada
Operador: Leonor Garay C. — OT: I-092/06
Sample File Name: TECFARM , Record: 1031 Source: Averaged
Measured on: Wed, 17 17e May 17e 2006 0 Last saved on: Thu, 18 18e May 18e 2006 0

Presentation: 2RHD
Polydisperse model

Volume Result

Focus = 100 mm.

Residual = 0.359 %
d (0.5) = 28.92 µm
D [4, 3] = 27.18 µm
Sauter Mean (D[3,2]) = 7.94 µm
Specific Surface Area = 0.7559 sq. m. / gm

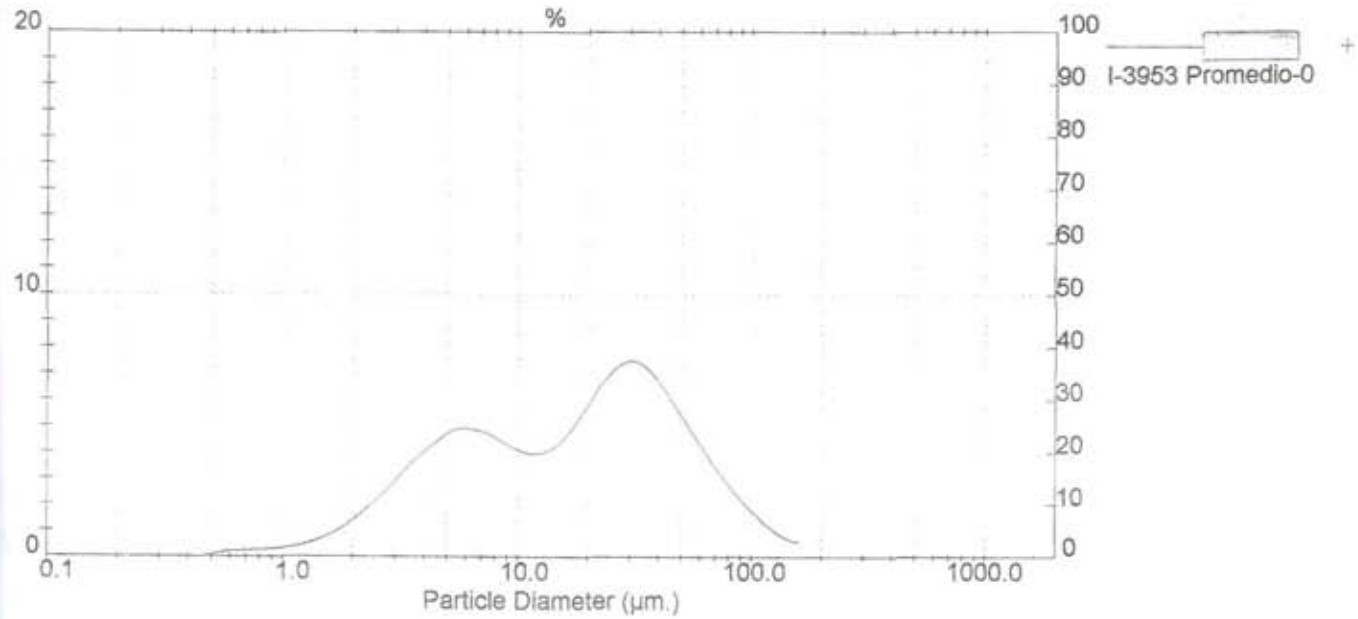
Concentration = 0.022 %
d (0.1) = 3.37 µm
Span = 3.13

Obscuration = 19.53 %
d (0.9) = 62.65 µm

Mode = 30.54 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.05	0.48	0.05
0.48	0.16	0.59	0.22
0.59	0.24	0.71	0.46
0.71	0.29	0.86	0.75
0.86	0.33	1.04	1.07
1.04	0.41	1.26	1.49
1.26	0.61	1.52	2.10
1.52	0.95	1.84	3.04
1.84	1.45	2.23	4.50
2.23	2.11	2.70	6.61
2.70	2.85	3.27	9.46
3.27	3.64	3.95	13.09
3.95	4.34	4.79	17.43
4.79	4.80	5.79	22.23
5.79	4.91	7.01	27.15
7.01	4.68	8.48	31.82

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
8.48	4.27	10.27	36.09
10.27	3.98	12.43	40.07
12.43	4.10	15.05	44.17
15.05	4.75	18.21	48.92
18.21	5.81	22.04	54.74
22.04	6.89	26.68	61.63
26.68	7.48	32.29	69.11
32.29	7.25	39.08	76.37
39.08	6.36	47.30	82.73
47.30	5.21	57.25	87.94
57.25	4.08	69.30	92.02
69.30	3.04	83.87	95.06
83.87	2.14	101.52	97.20
101.52	1.40	122.87	98.59
122.87	0.83	148.72	99.42
148.72	0.58	180.00	100.00



MALVERN INSTRUMENTS **MASTERSIZER X**

Version 1.2b

Wed, 17 17e May 17e 2006

I-3946 Promedio :Run Number 0

3946: Muestra 3
olicitante: Jorge Chávez — Tecnología Farmacéutica
)ispersante: Agua destilada
)perador: Leonor Garay C. -- OT: I-092/06
ample File Name: TECFARM , Record: 484 Source: Averaged
easured on: Wed, 17 17e May 17e 2006 1 Last saved on: Wed, 17 17e May 17e 2006 0

resentation: 2RHD
olydisperse model

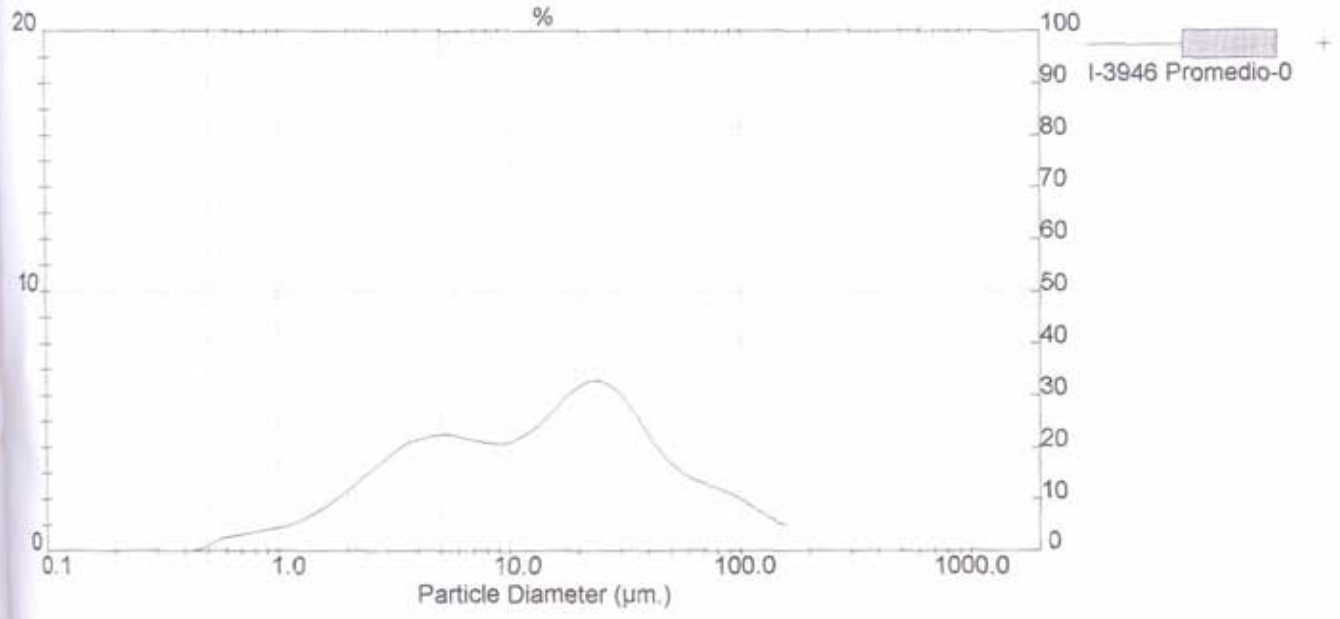
Volume Result

Focus = 100 mm.

esidual = 0.153 %
(0 .5) = 14.48 µm
[4, 3] = 25.02 µm
auter Mean (D[3,2]) = 5.74 µm
pecific Surface Area = 1.0460 sq. m. / gm

Concentration = 0.009 %
d (0.1) = 2.34 µm
Span = 4.21

Obscuration = 17.64 %
d (0.9) = 63.38 µm

Mode = 23.71 µm
Density = 1.00 gm. / c.c.

Size (Lo) µm	Result In %	Size (Hi) µm	Result Below %
0.20	0.10	0.48	0.10
0.48	0.38	0.59	0.48
0.59	0.59	0.71	1.07
0.71	0.73	0.86	1.80
0.86	0.86	1.04	2.66
1.04	1.05	1.26	3.70
1.26	1.36	1.52	5.07
1.52	1.81	1.84	6.88
1.84	2.40	2.23	9.28
2.23	3.04	2.70	12.32
2.70	3.62	3.27	15.94
3.27	4.11	3.95	20.05
3.95	4.42	4.79	24.47
4.79	4.49	5.79	28.96
5.79	4.37	7.01	33.33
7.01	4.20	8.48	37.53
8.48	4.16	10.27	41.69
10.27	4.41	12.43	46.10
12.43	4.96	15.05	51.05
15.05	5.69	18.21	56.75
18.21	6.36	22.04	63.11
22.04	6.59	26.68	69.70
26.68	6.17	32.29	75.87
32.29	5.22	39.08	81.09
39.08	4.12	47.30	85.21
47.30	3.27	57.25	88.47
57.25	2.78	69.30	91.26
69.30	2.50	83.87	93.76
83.87	2.20	101.52	95.96
101.52	1.77	122.87	97.73
122.87	1.28	148.72	99.01
148.72	0.99	180.00	100.00