



Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas

ISSN: 1870-0195

rmcf@afmac.org.mx

Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.

México

Garzón S., María de Lourdes; Hernández L., Alejandra; Vázquez R., María Luisa; Villafuerte R., Leopoldo; García F., Beatriz
Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)
Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, vol. 39, núm. 4, octubre-diciembre, 2008, pp. 50-66
Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.
Distrito Federal, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57911113008>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Revisión Bibliográfica

Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC)

Preparation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)

María de Lourdes Garzón S.^a, Alejandra Hernández L.^a, María Luisa Vázquez R.^a, Leopoldo Villafuerte R.^b, Beatriz García F.^a

^aDepartamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana.

^bDepartamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional

Resumen

Las nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) y los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) son elaboradas mediante diferentes métodos que incluyen la dispersión de una fase oleosa conteniendo diferentes tipos de lípidos sólidos y/o líquidos, en una fase acuosa conteniendo una alta proporción de tensoactivos y co-tensoactivos. Para llegar a obtener dispersiones de partículas nanométricas estables, se requieren métodos de homogenización de alta energía y la formación de un recubrimiento protector de emulsificantes alrededor de las partículas lipídicas. Este trabajo presenta una perspectiva de los diferentes métodos de elaboración de SLN y de NLC, incluyendo los procesos de esterilización y de liofilización. Se discuten las condiciones de operación y su efecto en las características de las partículas, así como la bondad de los procesos para su escalamiento y producción en gran escala.

Abstract

Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) are produced by the dispersion of an oil phase containing solid and liquid lipids into an aqueous phase with high surfactants and co-surfactants concentrations. A high energy homogenization procedure and the formation of a surfactant shell protection over the lipid particle surface are required in order to make stable nanoparticles. This paper presents an overview of different SLN and NLC production methods. The operation conditions and the effect of the process variables are discussed, including sterilization and lyophilization processes. The suitability of these processes for large scale production is also discussed.

Palabras clave: SLN, NLC, nanopartículas lipídicas, métodos de preparación, liofilización, esterilización, homogeneización a alta presión, método de emulsificación-evaporación, método de emulsificación-difusión, microemulsificación.

Key words: SLN, NLC, lipid nanoparticles, preparation methods, lyophilization, sterilization, high pressure homogenization, method of emulsification-evaporation, method of emulsification-diffusion, microemulsification.

Correspondencia:

M en C Ma. de Lourdes Garzón Serra
Departamento de Sistemas Biológicos UAM Xochimilco
Calz. Del Hueso #1100 Col. Villa Quietud
C.P. 04960, México, D.F.
Tel: 5483 7268
e-mail: lgarzon@correo.xoc.uam.mx

Fecha de recepción: 07 de mayo de 2007

Fecha de recepción de modificación: 29 de abril de 2008

Fecha de aceptación: 07 de julio de 2008

Introducción

La incorporación de fármacos lipofílicos con baja solubilidad en los fluidos fisiológicos, en diferentes presentaciones farmacéuticas, se ha realizado satisfactoriamente mediante varias estrategias entre las que se encuentran: la disminución del tamaño de partícula, la disolución de los activos en mezclas de agua-disolvente y posterior emulsificación a alta presión, la precipitación del fármaco con un no-disolvente, y la preparación de microemulsiones o/w, mismas que han sido usadas en nutrición parental, y administradas por vía transdérmica, ocular y oral.

En los últimos años se han desarrollado las nanopartículas sólidas lipídicas (SLN) como una forma alternativa en la administración de fármacos lipofílicos. Son sistemas coloidales con una alta proporción de agua (70-95%), elaborados principalmente a partir de lípidos fisiológicos sólidos que tienden a gelificar y a expulsar el fármaco durante el almacenamiento, presentan capacidad de carga limitada, son biodegradables y tienen buena tolerancia¹. Las propiedades y la estabilidad de las SLN se han mejorado mediante la adición de lípidos líquidos en los que el fármaco generalmente es más soluble, dando lugar a nuevos sistemas nanoparticulares conocidos como acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC).

Las SLN y los NLC presentan las ventajas de los liposomas y de las microemulsiones y son más efectivas para la liberación controlada. Consisten en matrices formadas por un lípido solidificado con patrones cristalinos específicos, que podrían incluir nanocompartimentos conteniendo el lípido líquido. Presentan un tamaño de 50-1000 nm y se mantienen estabilizadas en suspensión acuosa mediante concentraciones relativamente altas de tensoactivos o polímeros hidrofílicos. Estos dos tipos de nanopartículas lipídicas (NL) poseen la integridad física de las partículas sólidas de forma definida y preservan la estabilidad química y física de sus ingredientes.

Muchos investigadores han desarrollado y optimizando los procesos de obtención y escalamiento de las SLN y los NLC, combinando elementos de las diferentes técnicas reportadas, tales como: la homogeneización a alta presión, la microemulsificación con agitación a alta velocidad o ultrasonido, la emulsificación mediante evaporación o difusión del disolvente, la doble emulsificación (w/o/w) y la nanoesferonización a alta velocidad². La liberación de un compuesto lipofílico a partir de estos acarreadores lipídicos, es el resultado de la combinación de varios mecanismos de partición entre las fases lipídicas que los constituyen, el tensoactivo y el medio acuoso que los rodea.³

En este trabajo se describen algunos de los métodos para la preparación de SLN y NLC reportados en los últimos años, analizando el efecto que tienen las variables del proceso de producción y de escalamiento en las características de las nanopartículas.

El efecto de los componentes de la formulación será analizado en un trabajo posterior.

Consideraciones generales para la elaboración de SLN y NLC

Las características principales de las SLN y los NLC tales como: tamaño de partícula, grado de dispersión del tamaño, potencial zeta, eficiencia de carga y cinética de liberación, están determinadas por la naturaleza de la matriz de lípido, por la mezcla de tensoactivos, la viscosidad de la fase lipídica y de la fase acuosa en el momento de la emulsificación, y también por los parámetros de producción, principalmente por las condiciones de homogeneización y la temperatura.

Los procesos de elaboración de las SLN y los NLC incluyen en primer término la preparación de la fase oleosa mediante la fusión o disolución de las grasas. Es aconsejable que los lípidos seleccionados sean analizados por calorimetría diferencial de barrido (DSC), con el propósito de conocer la posible depresión del punto de fusión que puedan sufrir en la mezcla, las transformaciones polimórficas que presente la matriz del lípido en función de su capacidad de carga y el carácter cristalino de la sustancia activa incorporada.⁴

Los lípidos que formarán la matriz de las NL deberán seleccionarse considerando su capacidad para disolver el fármaco que constituye la carga, de tal modo que presente el coeficiente de partición más alto. Dado que el fármaco quedará disperso o disuelto en la fase oleosa, su concentración en la matriz pudiera tener un efecto significativo en el tamaño y en la estructura de las partículas.

El incremento en la capacidad de carga de las NL requiere del acomodo del fármaco dentro de las imperfecciones de la matriz, para lo cual el lípido debe solidificar con un empacamiento cristalino poco ordenado y presentar grandes distancias intermoleculares. Esta situación se favorece utilizando diferentes tipos de ácidos grasos o adicionando una entidad química diferente, tal como un aceite⁵. Si durante la etapa de enfriamiento del proceso de obtención de las NL, el lípido cristaliza antes que el fármaco, se podría producir una separación de fases dando lugar a un núcleo con un recubrimiento enriquecido con fármaco, provocando una liberación inicial intensa una vez que las NL se suspendan en el medio de disolución. Este fenómeno podría ser el resultado de usar una temperatura elevada y una alta concentración de tensoactivos.^{1,6}

La segunda etapa del proceso consiste en la preparación de la fase acuosa, la cual generalmente es una disolución de alta concentración de tensoactivos, combinados con co-emulsificantes o con polímeros estabilizadores.

Los tensoactivos tienen un gran impacto en la calidad de las NL, puesto que son adsorbidos en la superficie de las gotas de grasa,

formando una barrera estérica que les imparte estabilidad. Existen diferentes clases de tensoactivos y co-tensoactivos, algunos de los cuales pueden ser mezclados con el lípido. Su naturaleza y concentración debe ser determinada en cada caso.

Las mezclas de tensoactivos generalmente tienen un efecto sinérgico, produciendo una película interfacial con alta capacidad de recubrimiento y con viscosidad suficiente para disminuir la agregación de las partículas durante la producción y el almacenamiento⁷. La adición de co-emulsificantes (por ejemplo glicolato sódico) mejora la estabilidad física de las partículas al incrementar los efectos estéricos y la rigidez de la película externa, y al modificar la carga superficial de las partículas.⁸

La tercera etapa en la elaboración de las NL consiste en la formación de una pre-emulsión, mezclando ambas fases en frío o en caliente, mediante agitación vigorosa o ultrasonido. La disgregación de las gotas del lípido (fundido o disuelto) en partículas nanométricas requiere de suficiente energía, por lo que la homogeneización a alta velocidad o a presión debe continuar durante varios ciclos.

La última etapa consiste en la concentración de la dispersión acuosa de NL mediante procesos de evaporación, centrifugación, ultrafiltración, secado o liofilización, lo que hace más fácil su manejo y administración.

Métodos de preparación de las SLN y los NLC

Método de homogeneización a alta presión

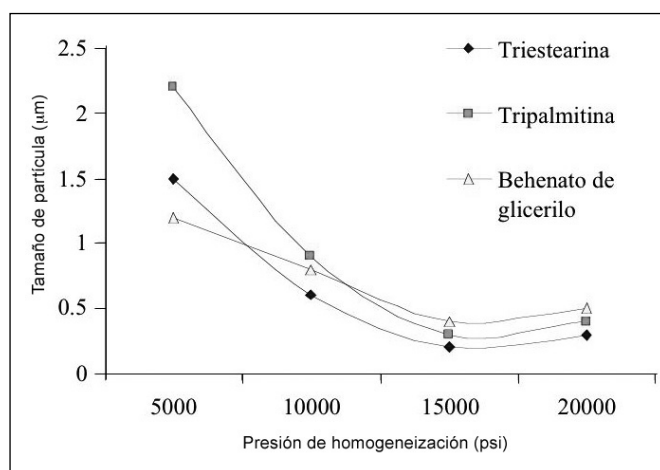
El método de homogeneización a alta presión es el más utilizado para la obtención de NL, ya que puede llevarse a cabo a altas temperaturas o a temperatura ambiente y puede ser fácilmente escalado a nivel de producción. En este método se aplican fuertes cantidades de energía que generan alta fuerza de corte, turbulencia, y cavitación^a en el material oleoso, pudiendo procesar dispersiones hasta de 40% de lípidos, dando lugar a nanopartículas con bajo índice de polidispersión (IP). En general se favorece la formación de partículas finas incrementando la temperatura, la presión, y/o el número de ciclos de homogeneización. Presiones extremadamente altas podrían originar la coalescencia de las partículas.^{4,5,9,10}

El método de homogeneización a alta presión en caliente puede ser considerado como una emulsificación, mientras que el método en frío realmente consiste en la molienda de una suspensión de partículas sólidas, mediante la aplicación de alta presión⁷. La mayoría de las SLN producidas por homogeneización en caliente tienen un tamaño inferior a 500 nm con una baja proporción de micropartículas. El proceso de homogeneización en frío minimiza la exposición a la temperatura pero no la evita completamente, ya que es necesario

realizar la fusión del lípido. Las dispersiones obtenidas en frío por lo general producen partículas de mayor tamaño y distribución que las obtenidas en caliente, presentando menos problemas durante el encapsulamiento del fármaco y durante la cristalización.

La principal desventaja del método en caliente es que puede incrementar la velocidad de degradación de los activos y/o de los lípidos acarreadores, así como provocar cambios conformacionales en las proteínas. En algunos casos los lípidos podrían permanecer durante varios meses como una masa fundida superenfriada, debido al tamaño de las partículas y a la presencia de gran cantidad de tensoactivos, lo cual afectaría la liberación del fármaco. Esta tendencia se incrementa cuando la matriz se elabora con grasas duras de glicéridos complejos que no recristalizan a temperatura ambiente.^{5,11}

El método general de homogeneización a alta presión en caliente consiste en calentar la mezcla de lípido y fármaco a 5°C-10°C por arriba del punto de fusión del lípido y adicionarla, mediante agitación mecánica a alta velocidad o ultrasonido, a una disolución acuosa de tensoactivo mantenida a la misma temperatura¹⁰. En general se recomienda destruir cualquier núcleo cristalino de la materia prima oleosa mediante un calentamiento prolongado antes de la adición del fármaco, con el propósito de que se forme una masa sólida totalmente diferente durante el enfriamiento¹². La pre-emulsión obtenida de este modo se procesa en un homogeneizador a alta presión (300-500 bar) durante de 3 a 5 ciclos, a temperatura controlada. Cuando la nanoemulsión se enfría a temperatura ambiente cristaliza en forma de SLN o de NLC de acuerdo a la formulación utilizada.



Gráfica 1. Efecto de la presión de homogeneización y del tipo de lípido en el tamaño de partícula de SLN cargadas con citrato de tamoxifen

^a Cavitación: Formación de burbujas de vapor o de gas en el seno de un líquido, causada por variaciones en la presión de trabajo.

Un proceso típico de homogeneización a alta presión consiste en utilizar una fase lipídica correspondiente al 10% de la formulación total (behenato de glicerilo fundido a 85°C, tri y monoglicéridos de ácidos grasos C₁₂₋₁₄ fundidos a 65°C, sin o con la adición hasta de 50% de triglicéridos líquidos cáprico-caprílicos)¹³. La masa fundida se mezcla con una disolución acuosa (Poloxámero 188 al 2.5%) mantenida a la misma temperatura, dispersando con un agitador a 8,000 rpm durante 30 seg. La premezcla se homogeneiza en caliente a una presión de 500 bar durante 3 ciclos, después de lo cual se enfría hasta 22°C. La presencia del aceite da lugar a partículas de menor tamaño con un IP ligeramente más bajo.

La presión y el número de ciclos utilizados en el proceso de homogeneización determinan el tamaño de partícula. En la gráfica 1 se puede ver el cambio de tamaño de las SLN formadas a partir de diferentes lípidos con 3% de taurocolato de sodio como emulsificante, en función de la presión de homogeneización, alcanzando su menor tamaño a 15,000 psi durante 3 ciclos¹⁴. Condiciones más drásticas provocan el aumento del tamaño de partícula debido a la coalescencia ocasionada por la mayor energía cinética empleada. El efecto del número de ciclos de homogeneización se aprecia en la tabla 1.

El tipo de lípido no siempre tiene un efecto importante en el tamaño de partícula, pero sí en la eficiencia de carga del fármaco, debido a la forma en que solidifica al interior de la matriz de las SLN. El behenato de glicerilo (mezclas de mono y diglicéridos) cristaliza con una estructura imperfecta favoreciendo la solubilización del principio activo y aumentando la capacidad de encapsulamiento.¹⁴

El método de homogeneización a presión en frío es adecuado para encapsular fármacos termolábiles o hidrofílicos. Consiste en fundir la mezcla de los componentes lipídicos y dispersarla a gran velocidad hasta formar micropartículas que posteriormente se mezclan con una disolución acuosa fría de tensoactivo, homogeneizando a temperatura ambiente (o más baja), generalmente a 500 bar durante 5 ciclos.

La difusión que el fármaco pudiera presentar hacia la fase acuosa durante el proceso en frío, podría minimizarse empleando disoluciones de micelas sólidas invertidas (SRMS), en las que los lípidos permanecen (al menos en parte) en estado sólido como micelas invertidas, con un potencial de solubilización que puede llegar hasta el 6.5%. El procedimiento resulta eficiente en la liberación prolongada de diferentes fármacos, presentando ciertas limitaciones cuando se trata de sustancias hidrofílicas.¹⁵

El proceso de manufactura de las SRMS comprende dos etapas: a) la preparación de una mezcla a 60°C de lecitina y triglicéridos (1:1 p/p) agitando sin calentamiento, hasta la formación de las micelas en las que se disuelve el fármaco; b) la molienda las SRMS

Tabla 1. Efecto del número de ciclos de homogeneización y del tipo de lípido en el tamaño de SLN (µm)

Número de ciclos	Triestearina	Tripalmitina	Behenato de glicerilo
1	1.6	1.8	0.9
2	0.8	0.7	0.5
3	0.2	0.3	0.4
4	0.3	0.4	0.5

cargadas, dispersando la grasa congelada en una disolución de polisorbato 80 a 13,000 rpm durante 15-20 min, en una atmósfera de nitrógeno líquido y homogeneizando la suspensión gruesa durante 2 ciclos sin presión, y durante 20-30 ciclos a 1000 bar¹⁵. La dispersión obtenida contiene 0.1% de SRMS con un tamaño de partícula de 60-130 nm, un IP de 0.3 y una eficiencia de carga del 37% al 99%, dependiendo de la lipofiliidad del fármaco.

Se han podido elaborar vacunas por el método de homogeneización a alta presión en frío, mediante la incorporación de antígenos proteicos en SLN¹⁶. La baja capacidad de carga de las proteínas en las SLN está determinada por su alto coeficiente de partición en agua, cuestión que puede mejorarse con el uso de tensoactivos que actúen como estabilizantes de la emulsión. La incorporación de lisozima como proteína tipo, muestra que las SLN retienen la proteína no degradada. El proceso se realiza disolviendo la proteína en una disolución acuosa de Poloxámero 182 (a la concentración micelar crítica) a temperatura ambiente, e incorporándola en la mezcla de lípidos fundidos mantenidos por debajo de 50°C para evitar la degradación. La fase lipídica cargada se tritura en presencia de nitrógeno líquido y se dispersa con alta velocidad en una disolución acuosa de tensoactivo, homogeneizando a 25°C a 1000 bar/3 ciclos.¹⁶

Método de emulsificación-evaporación y emulsificación-difusión de disoluciones lipídicas

La emulsificación de lípidos que previamente se han disuelto en disolventes orgánicos, permite la incorporación de fármacos termolábiles en las NL; el procedimiento se realiza en una sola etapa sin necesidad de equipo especial y en condiciones benignas de temperatura. Las principales desventajas de este método son: la posible retención de residuos del disolvente (hasta de 100 ppm), la producción de dispersiones muy diluidas debido a la limitada solubilidad del lípido en el material orgánico (0.1g/L generalmente), así como la dificultad de recuperación de los disolventes durante el proceso de escalamiento.

En los métodos de emulsificación de lípidos a partir de sus disoluciones se debe asegurar el equilibrio termodinámico inicial

en ambas fases, llevando a cabo la saturación del disolvente con el agua, y del agua con el disolvente. En el proceso de emulsificación- evaporación los componentes lipídicos y el fármaco se disuelven en un disolvente inmiscible en agua (por ejemplo cloroformo o tolueno) previamente saturado, emulsificándolo a altas temperaturas con una disolución de tensoactivo en el agua saturada. Posteriormente el disolvente se evapora a presión reducida, induciendo la precipitación del lípido y la formación de suspensiones casi transparentes conteniendo SLN cercanas a 100 nm, con un intervalo de dispersión estrecho. La obtención de partículas más pequeñas (hasta de 30 nm) dependerá de la carga y del tipo de emulsificante utilizado. La generación de partículas extremadamente pequeñas podría favorecer su floculación durante el almacenamiento, ya que presentan un incremento considerable en el área superficial y/o una disminución en el potencial zeta.¹⁷

En el método de inyección-difusión preferentemente se utilizan disolventes con alta miscibilidad en agua como el alcohol bencílico y el lactato de butilo (3.8% y 7.7% respectivamente); también se ha reportado el uso de formato de etilo o metil-etil cetona. La anfifilicidad del disolvente empleado en la preparación de NL favorece su difusión en un menor volumen de medio acuoso y limita la capacidad de solubilización de los lípidos comúnmente usados (tabla 2), dando lugar a la rápida precipitación de las gotas y a la obtención de suspensiones más concentradas. Generalmente también provocan cambios en la conformación de las cadenas de las macromoléculas de los emulsificantes, lo que altera su interacción con la interfase, modificando la capa estabilizante y el potencial zeta de las partículas.

La difusión del disolvente y la velocidad de nucleación se incrementan mediante la homogeneización a alta presión, mientras que el uso de agitación magnética (menos violenta) origina la precipitación de partículas más grandes. Un aumento en la velocidad de agitación incrementa la velocidad de dispersión del disolvente y podría disminuir el tamaño de partícula; así

mismo, un incremento en el volumen del disolvente podría alterar la estructura de las gotas y aumentar el tamaño de partícula. La adición de un exceso de fase acuosa acelera la difusión del disolvente hacia la fase continua, favoreciendo la precipitación de las NL.¹⁷

La encapsulación mediante el método de inyección-difusión es tan eficiente como la que presenta la técnica de emulsificación- evaporación, aunque las partículas presentan algunas diferencias. La carga se incrementa con fármacos de baja solubilidad en agua y alta solubilidad en el disolvente orgánico, debido a su baja capacidad de difusión durante la evaporación del disolvente^{7,18}. La emulsificación de Lipoid S100 (en cloruro de metileno) con una disolución acuosa de ésteres sacáridos de ácidos grasos, mediante la técnica de emulsificación- evaporación utilizando ultrasonido, produce SLN más pequeñas y más estables debido al incremento en el potencial zeta. La inyección del Lipoid S100 disuelto en acetona dentro de la disolución acuosa del tensoactivo (mediante chorro fino con aguja de 0.45 mm) también da lugar a partículas esféricas monomodales pero de mayor tamaño y menor potencial zeta. La presencia de carga (paclitaxel) no altera el tamaño pero sí el IP de las nanopartículas obtenidas por evaporación, mientras que en la técnica de inyección, el tamaño se incrementa hasta tres veces. La estructura cristalina del lípido dentro de las SLN no se ve afectada por el método.¹⁸

Cuando el proceso de difusión de disolvente se lleva a cabo a bajas temperaturas (0°C-25°C) generalmente se incrementa la eficiencia de la encapsulación. La rápida precipitación del lípido en forma de gotas antes de que pueda presentarse la coalescencia de las partículas, favorece el depósito del fármaco en la interfase lípido-agua y disminuye su escape hacia la fase acuosa¹⁹. El encapsulamiento de péptidos por este método presenta ciertas dificultades adicionales, debido a que la mayor parte de ellos tienen un componente hidrofóbico importante que facilita su adhesión a las paredes del equipo. La cantidad de péptido incorporada a las SLN dependerá de la formulación y de las condiciones del proceso. El efecto de la temperatura no es significativo en el tamaño de partícula debido a la rápida difusión del disolvente.¹⁹

La presencia de polímeros hidrofílicos en la fase acuosa origina la formación espontánea de partículas menores a 1 µm, ya que son adsorbidos rápidamente por la superficie de las gotas formadas durante la difusión del disolvente. El alcohol polivinílico (PVA) produce la agregación de las SLN cuando el medio acuoso es ácido, debido a que el potencial zeta del sistema se encuentra cercano a cero, facilitando la separación de las partículas por centrifugación. Si el medio no está acidificado, no se lleva a cabo la coacervación ni la precipitación del lípido. El efecto del pH en la estabilidad de las NL determina las condiciones de preparación y de aplicación de las dispersiones de NL.^{19,20}

Tabla 2. Solubilidad del monoestearato de glicerilo en lactato de butilo y en alcohol bencílico a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Solubilidad (mg/mL)	
	Lactato de butilo	Alcohol bencílico
40	54	46
45	102	1370
50	1450	1920
55	2025	2830

La concentración de la fase acuosa pudiera incrementar el tamaño de partícula hasta un valor límite. A baja concentración el tamaño de las NL está determinado por la cantidad de carga en las gotas de lípido, mientras que a alta concentración, dependerá de la masa de las gotas. Este efecto podría disminuir con la presencia de co-tensoactivos (como el Pluronic F68) en el agua, dado que mejoran la estabilidad termodinámica de las SLN²⁰. Por otro lado, la viscosidad de la fase externa acuosa podría modificar la cinética de difusión del disolvente y también el tamaño hidrodinámico de las partículas.²⁰

La versatilidad del método de emulsificación-difusión del disolvente facilita la obtención de dispersiones de NL que cumplan con los requisitos para su administración intravenosa. Es posible obtener un producto semitransparente, con partículas menores a 100 nm, con bajo IP, potencial zeta de -31.6 mV, alta capacidad de carga (4.6%) y una eficiencia de atrapamiento de 87.7%, inyectando lentamente una disolución de ácido esteárico en acetona y de lecitina de soya en etanol, dentro de una fase acuosa conteniendo poloxámero 188 y glicerina, evaporando posteriormente a vacío.²¹

Método de microemulsificación

La preparación de SLN por el método de microemulsificación permite obtener partículas termodinámicamente estables, ópticamente isotrópicas y con un tamaño que puede ser controlado en el momento de la emulsificación. El proceso es fácilmente escalable sin necesidad de equipo especializado y con bajo consumo de energía²². Las nanoemulsiones obtenidas por este método contienen altas concentraciones de tensoactivos y co-tensoactivos, por lo que su uso en humanos se encuentra sujeto a regulaciones sanitarias.

La elaboración de SLN por microemulsificación se logra debido a la cristalización de las gotas de lípido dentro del medio acuoso. El tamaño de partícula dependerá principalmente del tipo de tensoactivos y co-tensoactivos, y de las condiciones experimentales. La optimización del proceso comienza realizando pruebas de solubilidad del fármaco en los lípidos y solubilizantes, utilizando diagramas de fase pseudoternarios que permiten seleccionar los componentes de una microemulsión estable, es decir, aquella que soporte ciclos de enfriamiento-calentamiento (de -4°C a 40°C) de 24 h durante 1 semana. Este mecanismo de selección da lugar a procedimientos de alta eficiencia de carga, NL con un tamaño promedio inferior a 200 nm y un IP inferior a 0.6.²²

Cuando las condiciones de microemulsificación son violentas se originan NL con perfiles bimodales. La agitación mediante ultrasonido generalmente da lugar a estructuras en las que el lípido líquido forma nanocompartimentos dentro de la matriz sólida, incrementando la capacidad de carga de las partículas³. La afinidad del fármaco por el aceite determinará su velocidad

Tabla 3. Comparación de las características de las SLN obtenidas por microemulsificación y precipitación

	Tamaño (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	Carga (%)
Microemulsificación a 70°C	118	0.16	-39.6	30.8
Precipitación a partir de etanol	69	0.12	-44.8	28.3

de liberación, con base en el coeficiente de reparto entre los nanocompartimentos y el lípido sólido y entre éste y el medio acuoso. Una microemulsión típica para obtener SLN se elabora a partir de 10% de lípido sólido fundido, 15% de tensoactivo y 10% de co-tensoactivo. La fase oleosa tibia se adiciona con flujo lento o mediante inyección con una jeringa termosellada, dentro de un exceso de agua fría (1:50), dispersando con agitación fuerte o ultrasonido hasta lograr la formación de gotas del lípido y su posterior precipitación. El exceso de agua se remueve por ultrafiltración o por liofilización. La preparación de algunas NLC se lleva a cabo a partir de behenato de glicerilo y triglicéridos cáprico-caprílicos, mezclados con una disolución acuosa de Lutrol F68 al 1.35%, a 80°C y 8,000 rpm, durante 1 min. La pre-emulsión obtenida debe ultrasonificarse hasta la homogeneización completa, manteniéndose a 5°C por encima del punto de fusión de los lípidos con objeto de prevenir la recristalización³.

Las dispersiones de SLN preparadas por microemulsificación y por precipitación generalmente presentan partículas con características físicas equivalentes, que pueden ser esterilizadas por filtración (membrana de 0.2 µm) y purificadas mediante diálisis. En la tabla 3 se muestran las características de SLN conteniendo tamoxifén, elaboradas por microemulsificación a 70°C (con Epikuron y taurocolato de sodio, emulsificante y co-tensoactivo respectivamente) y mediante precipitación de la disolución etanólica.²³

El porcentaje de encapsulación de algunos péptidos en SLN obtenidas a partir de microemulsiones o/w, puede incrementarse hasta tres veces en comparación con el obtenido en una microemulsión w/o/w, si se aumenta su lipofilidad mediante la formación de un par-iónico del polipéptido con un ión aniónico (taurodesoxicolato de sodio-hexadecilfosfato de sodio, 4:1). Con ambos procesos los perfiles de liberación del fármaco similares.²⁴

Otro tipo de componentes poco lipofílicos también pueden ser encapsulados por microemulsificación, si previamente se hacen más lipofílicos mediante la adición de un coloide protector. El coloide se encontraría disuelto en el medio dispersante y fuertemente adsorbido en la superficie de la fase dispersa²⁵.

La encapsulación de magnetita (marcador biológico formado por hidróxidos ferroso-férricos) utilizando este sistema, se lleva a cabo en dos etapas, primero se forma una emulsión o/w (oleato de etilo y lecitina de soya a 60°C en disolución acuosa de Tween 80) a la cual se le adiciona una suspensión lipofílica de magnetita en ácido oleico. En la segunda etapa se dispersa la emulsión o/w mantenida de 34°C a 47°C, en 5 partes de agua a 7°C, provocando la precipitación de nanopartículas (de <62 nm) que se lavan por ultrafiltración y se liofilizan.

Método de emulsificación mediante membrana de contacto

Las membranas de contacto (figura 1) se han usado recientemente en la preparación de SLN, ya que son fáciles de usar, aseguran el control del tamaño de las partículas mediante la selección de los parámetros de producción y permiten el fácil escalamiento del proceso²⁶. Son de cerámica, usualmente de 40 cm con 1 cm de diámetro externo y 0.6 cm de diámetro interno, con $7.5 \times 10^{-3} \text{ m}^2$ de superficie y poros de 0.1-0.45 μm , que se comportan como capilares paralelos. Contienen una capa activa de ZrO_2 sobre un soporte de $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-TiO}_2$. La fase oleosa contenida en un recipiente presurizado con atmósfera de nitrógeno, a temperatura regulada por arriba del punto de fusión, se alimenta al módulo de la membrana a través de los poros. Por un extremo se alimenta la fase acuosa también a temperatura controlada, la cual fluye tangencialmente en el interior, estableciendo contacto con los lípidos y desprendiendo las pequeñas gotas. El flujo que sale se enfría con agitación hasta temperatura ambiente. La membrana puede ser regenerada hasta recuperar una permeabilidad superior al 80% antes de utilizarse nuevamente.

Los factores que más impactan el tamaño de las SLN obtenidas en las membranas de contacto son: a) la cantidad de la fase lipídica, cuyo aumento satura los poros disminuyendo el flujo e incrementando el tamaño de partícula, y b) la temperatura de ambas fases, tal como puede verse en la tabla 4. Mayor velocidad en la fase acuosa únicamente facilita el desprendimiento de las gotas y la homogeneización de la dispersión; un aumento en la presión, incrementa la productividad del proceso, lo cual es potencialmente útil en aplicaciones industriales. Respecto a los

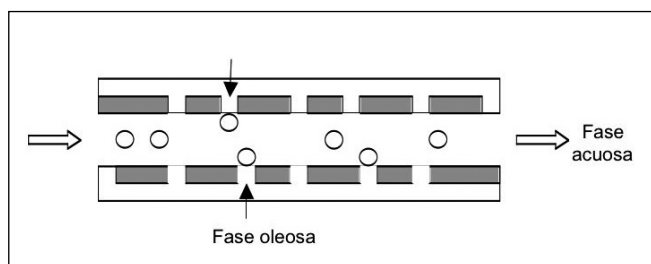


Figura 1. Representación esquemática de la membrana de contacto para la preparación de SLN

Tabla 4. Efecto de la temperatura en el flujo de la fase lipídica y en el tamaño de SLN obtenidas por el proceso de membrana de contacto

F.L. (°C)	Flujo F.L. (m ³ /h.m ²)	Tamaño (nm)	Observaciones
55	0.19 0.21 0.28	200	Este factor impacta en la viscosidad de los lípidos fundidos. Un mayor flujo disminuye el tiempo del proceso.
65		175	
78		100	
F. A. (°C)			
50	0.20	190	Las gotas solidifican instantáneamente cuando la F. acuosa tiene una temperatura inferior al p.f. de las grasas. Si es más alto calienta al lípido disminuyendo su viscosidad y haciendo gotas más pequeñas.
60	0.22	170	
70	0.25	125	

F.L.= fase lipídica, F.A.= fase acuosa

poros de la membrana, cuando son más grandes aumentan el flujo, sin que se presente un impacto en el tamaño debido a la influencia preponderante de la tensión superficial.

Análisis de las variables de los procesos de elaboración de SLN y NLC:

Es importante puntualizar y analizar el efecto de las variables que intervienen en las diferentes etapas del método de obtención de SLN y NLC y que afectan sus características finales. Las principales variables son:

- Homogeneización y emulsificación:
 - Presión y número de ciclos
 - Tipo y velocidad de agitación (mecánica, sonicación)
 - Forma de adición de tensoactivos
 - Temperatura
- Emulsificación con disolvente:
 - Naturaleza del disolvente.
 - Naturaleza de la fase acuosa
 - Presencia de polímeros hidrofílicos

Temperatura de las fases

Agitación

- Concentración y purificación de la dispersión mediante secado, centrifugación y/o ultrafiltración:

Temperatura

Velocidad

Tipo de membrana

- Liofilización:

Presencia de crioprotectores

Temperatura de congelamiento

Velocidad y temperatura de sublimación

Efecto de las condiciones de homogeneización y emulsificación

No existe una regla general para seleccionar el tipo de homogeneización. La fuerza de corte y la cavitación producidas por el equipo, determinan su capacidad para disgregar la mezcla. En equipos con flujo horizontal se puede presentar la flotación del material y el bloqueo frecuente de la válvula, lo cual no ocurre en equipos con flujo vertical.²⁷

El impacto de la presión de homogeneización y del número de ciclos en las propiedades de las SLN, resulta altamente significativa. El tamaño de partícula es mucho menor a mayor presión y mayor número de ciclos, dando lugar a suspensiones prácticamente transparentes que fácilmente pueden flocular y precipitar durante el almacenamiento¹⁰. En el proceso de homogeneización en caliente las condiciones usuales de operación son de 5,000-20,000 psi y de 1-4 ciclos. Las condiciones óptimas dependen del nivel de los otros factores del proceso, pudiéndose obtener partículas entre 180-330 nm a 5 ciclos y 6,000 psi. El número de ciclos de homogeneización podría dar lugar a dife-

rentes tipos de NL, debido a la diferente temperatura existente en la nanoescala, que favorecería o no, la solidificación del lípido en una determinada estructura cristalina y/o la formación de espacios intermoleculares con nanocompartimentos de aceite, situación podría provocar la expulsión del fármaco durante el almacenamiento.¹

La sonicación es un método de homogeneización de fácil manejo, ampliamente utilizado en la elaboración de liposomas, nanopartículas y SLN. Es muy efectivo para reducir el tamaño de partícula en lotes pequeños, pero poco eficiente en la reducción de partículas grandes. Su uso prolongado incrementa el riesgo de degradación (del lípido o fármaco) y de contaminación con titanio proveniente de la sonda²⁸. Este tipo de homogeneización no siempre es efectivo en la preparación de NL, ya que a alta temperatura favorece la coalescencia de las partículas. En microemulsiones de ibuprofén preparadas a 70°C a partir de Precirol ATO 5, colato de sodio y Pluronic F68 y sonicadas a 400W, 20Hz, durante 20 min, el incremento de tamaño puede llegar al 30%.²⁹

La homogeneización llevada a cabo combinando la sonicación con otros métodos puede resultar muy efectiva. Se obtienen SLN con alta eficiencia de carga (>90% de clozapina), con un tamaño inferior a 380 nm y bajo IP, mediante la evaporación de la disolución de fármaco-lípidos (en cloroformo-metanol), la fusión del residuo y su posterior emulsificación por ultrasonido (25 min). Este proceso disminuye en mayor o menor grado la cristalinidad de diferentes tipos de lípidos (tabla 5), mientras que el fármaco se mantiene en estado amorfo²⁸. La pérdida de cristalinidad de los lípidos es mucho mayor cuando las dispersiones de SLN son liofilizadas.

Tabla 5. Efecto de la evaporación-sonicación y de la liofilización en las características cristalográficas de algunas mezclas de lípidos con clozapina

	Parámetro	Mezcla Física	Mezcla evaporada y sonicada	SLN Liofilizadas
Trimiristina	p. f. (°C)	57.92	57.4	55.46
	ΔH (J/g)	156.67	154.41	6.58
	% cristalinidad*	99.5	98.12	64.3
Tripalmitina	p. f. (°C)	65.09	65.66	62.83
	ΔH (J/g)	185.91	164.45	8.20
	% cristalinidad*	98.71	87.3	66.9
Triestearina	p. f. °C	72.69	73.43	68.76
	ΔH (J/g)	170.8	157.83	11.10
	% cristalinidad*	98.69	91.2	98.6

*calculada de acuerdo a la cristalinidad de las materias primas

Tabla 6. Efecto de la forma de adición del tensioactivo en las características de las SLN cargadas con β -elemeno

Lípido (% p/p)	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Eficiencia de encapsulación (%)
100 P-L	106.5	-32.5	99.3
100 P-A	149.7	-29.8	97.2
(70 P+30 M)-L	46.7	-34.9	99.8
(70 P+30 M)-A	51.5	-32.7	96.9
100 M-L	26.5	-33.7	99.9
100 M-A	32.8	-35.3	98.2

P= Percitol, M= monoestearina, L=tensioactivo en lípido, A= tensioactivo en agua.

El uso de ultrasonido combinado con alta velocidad de corte durante la emulsificación, da lugar a SLN de alta calidad, con 2% de carga, 88% de eficiencia de encapsulamiento, 106 nm e IP de 0.28³⁰. La combinación del procedimiento de sonicación por sonda con extrusión a través de una membrana, permite disminuir el tiempo de sonicación y mejorar la calidad de las NL. Esta combinación disminuiría la degradación y/o volatilización de algunos aceites volátiles (como el β -elemeno) durante su encapsulación en SLN.⁸

La forma de adición de los tensioactivos juega un papel determinante en las características de las SLN. Cuando se adicionan en la fase lipídica, el tamaño de partícula resulta ser significativamente menor que cuando se adicionan en el agua⁸. Esto sería debido a la mayor velocidad de disgregación de la grasa y a la rapidez con que las gotas se recubren con el tensioactivo, la cual debe competir con la velocidad de coalescencia de las partículas lipídicas no recubiertas. La dispersión de los tensioactivos en la matriz lipídica facilita la formación de la película protectora, al orientar la parte hidrofílica del tensioactivo hacia la superficie. Este proceso es menos eficiente cuando los tensioactivos están disueltos en el agua, ya que estarían en menor concentración respecto al lípido, cuestión que no favorecería su adsorción en las nuevas superficies formadas durante la homogeneización, dando lugar a partículas más grandes.

La presencia del tensioactivo en el agua podría disminuir la eficiencia en la encapsulación de componentes altamente lipofílicos, ocasionando el reparto del fármaco en ambas fases y favoreciendo el depósito del fármaco sobre la superficie de las partículas. Este reparto no se observa cuando el tensioactivo se encuentra en la fase lipídica⁸. En la tabla 6 se muestra el efecto

de la forma de adición del tensioactivo en las características de SLN elaboradas con diferente porcentaje de lípido. El efecto de la forma de adición del tensioactivo sobre el potencial zeta de las partículas, no es significativo.

Efecto de la temperatura y de la concentración de lípidos

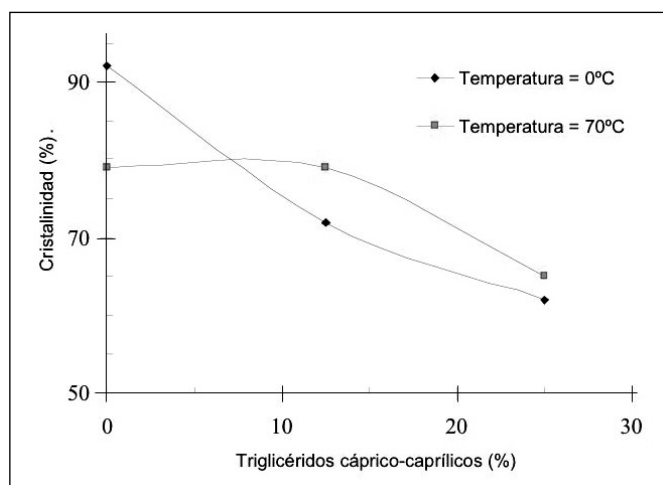
La temperatura de preparación de SLN y NLC modifica la energía cinética del sistema, por lo que afecta de forma importante el tamaño de partícula, la eficiencia de la encapsulación y la carga. El cambio es menos significativo en las NLC, ya que su capacidad de carga está determinada por el contenido de lípido líquido. Pocas veces se ha reportado que la temperatura ocasione un cambio importante en el tamaño de las SLN obtenidas por el método de emulsificación-difusión, lo cual es atribuido a la rápida difusión del disolvente.¹⁹

El método de homogeneización a alta presión en caliente generalmente se realiza a 10°C por arriba del punto de fusión del lípido; cuando se opera a temperaturas inferiores se obtienen partículas de mayor tamaño con gran dispersión. Si el sistema se mantiene a temperatura ambiente y se aumenta la presión de homogeneización, se podrían obtener partículas menores a 50 nm con un IP <0.3. Cuando se preparan SRMS homogeneizando en caliente y posteriormente enfriando en baño de hielo, se obtienen partículas de 400-800 nm con un IP de 0.87; en contraste con esto, si la homogeneización se lleva a cabo a temperatura ambiente, se obtienen partículas de 130 nm y un IP de 0.46.³¹

El efecto de la temperatura en las características físicas de las SLN va a variar dependiendo de la formulación. Dispersando una fase de monoestearina en acetona-etanol a 0°C en una disolución acuosa ácida de PVA y poloxámero 188, se obtienen

Tabla 7. Efecto de la temperatura y del contenido de lípido líquido en algunas características de NL cargadas con propionato de clobetazol

Temperatura (°C)		Contenido de lípido líquido (%)		
		0	12.5	25
0	Encapsulación (%)	45.14	60.12	67.17
	Carga (% p/p)	2.26	3.01	3.35
	Potencial zeta (mV)	-27.6	-25.1	-21.2
70	Eficiencia	52.7	59.24	69.91
	Carga (% p/p)	2.63	2.96	3.48
	Potencial zeta (mV)	-20.5	-20.7	-21.8



Gráfica 2. Efecto de la temperatura y del porcentaje de triglicéridos cáprico-caprílicos, en la cristalinidad de las SLN

SLN con una distribución bimodal y una capacidad de carga ligeramente menor que las obtenidas a 70°C (monomodal con bajo IP). Cuando la formulación contiene diferentes proporciones de lípido líquido (miglyol: triglicéridos cáprico-caprílicos), la temperatura no altera en forma significativa el tamaño y distribución de las partículas, aunque tiene un efecto en la capacidad de carga, de acuerdo al porcentaje de lípido líquido¹¹. El potencial zeta de las partículas obtenidas a 0°C es mayor y más dependiente de la proporción del aceite, que el de las partículas obtenidas a 70°C (tabla 7 y gráfica 2). La cristalinidad de la matriz lipídica y la distribución del líquido dentro de la matriz sólida, también se verá afectada con la temperatura, dando como resultado diferentes perfiles de liberación *in vitro*, con un perfil bifásico a partir de las NLC elaboradas a 70°C.¹¹

Cuando la termorregulación y las condiciones de homogeneización son insuficientes para controlar las características de las NL, la adición de un aceite menos viscoso (como el miglyol) facilita la dispersión de la fase oleosa y mejora la distribución del tamaño de partícula. Grandes cantidades de lípido líquido originan un incremento en la viscosidad superficial y una disminución del potencial zeta de las NL, aumentando la velocidad de crecimiento durante el almacenamiento a 25°C.⁵

Con un incremento de temperatura de 20°C por arriba del punto de fusión y aumentando la concentración del lípido, es posible obtener dispersiones de SLN de consistencia semisólida, con partículas coloidales formando un retículo lipídico estructurado. Dispersiones al 30%-50% de palmitato de cetilo homogeneizadas a 85°C, durante 3 ciclos a 500 bar, dan lugar a nanoemulsiones o/w de alta viscosidad, que preservan su tamaño coloidal debido a la recrystalización de los lípidos y a su baja

posibilidad de difusión³². Se puede obtener un retículo interno con alta concentración de partículas, homogeneizando 50% de lípidos mediante alta presión y adicionando cantidades sucesivas de 20% del lípido sin dejar de agitar a alta velocidad, hasta alcanzar una concentración total de 95% (figura 2). Dispersiones de este tipo son más fáciles de concentrar y pueden ser utilizadas como agentes granulantes o humectantes en la elaboración de pellets o tabletas.¹

Efecto de las condiciones de secado, diálisis, ultrafiltración y centrifugación

Dado que las dispersiones de SLN o NLC usualmente contienen una baja proporción de partículas, requieren de un tratamiento de secado, ultrafiltración y/o centrifugación, que permita obtener un producto final más concentrado.

Para la obtención de un polvo con tamaño de partícula controlado se ha propuesto un método de secado en frío, de bajo costo, que puede ser utilizado como un proceso alternativo a la liofilización, el cual no requiere etapa de congelamiento y disminuye el fenómeno de aglomeración³³. El equipo consiste en un minidesecador de plexiglas formado por dos cámaras, una de las cuales contiene alúmina básica como sustancia desecante y la otra contiene pequeñas bandejas donde se colocan las dispersiones de NL. Funciona a vacío y está termorregulado dentro de un intervalo de temperatura de 2°C a 20°C, con una mezcla de agua-propilenglicol.

Se ha reportado que la cinética de secado de dispersiones al 20% de SLN en este equipo, no se altera con la eliminación previa de los tensoactivos y co-tensoactivos (Epicuron 200 y taurocolato) ni con el uso de crioprotectores. Si el proceso se lleva a cabo a temperaturas inferiores a 10°C, el tamaño de las partículas permanece casi igual al que tenían originalmente; a mayores temperaturas se presenta un aumento importante en el tamaño (tabla 8), pero relativamente menor al producido durante la liofilización. La temperatura incrementa marcadamente la velocidad de secado como consecuencia del aumento en la presión de vapor (0.4 Pa a 20°C). El proceso muestra una cinética que se aproxima al orden cero con respecto al contenido de agua.³³

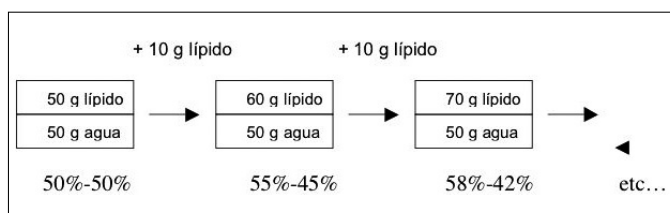


Figura 2. Proceso de producción de dispersiones semisólidas con elevadas concentraciones de NL

Tabla 8. Efecto de la temperatura en el diámetro promedio y en el IP de dispersiones de SLN desecadas

Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Diámetro (nm)		Índice de polidispersión	
		Inicial	SLN secas	Inicial	SLN secas
2	96	65	72	0.18	0.12
5	88	69	76	0.20	0.13
8	70	72	84	0.15	0.10
10	56	71	80	0.08	0.04
15	48	72	224	0.20	0.20
20	24	70	390	0.15	0.38

Las dispersiones de NL usualmente se concentran evaporando el exceso de agua a presión reducida (10-30 mbar, 30 min) o por filtración a través de membranas de 0.45 μm . Cuando el producto se obtiene mediante el proceso de emulsificación-evaporación, debe filtrarse inmediatamente después de la evaporación del disolvente y enfriar enseguida a 0-2°C para lograr la solidificación de las SLN.²¹

La técnica más popular empleada en la separación de NL es la ultracentrifugación, ya que las partículas contenidas en la fase acuosa sedimentan a la misma velocidad que la mayoría de los coloides (40,000-100,000 g durante 0.5 a 1.5 h). Para cierto tipo de productos puede ser de utilidad la centrifugación en condiciones menos drásticas (20,000 rpm/3min).

La ultrafiltración se emplea principalmente para eliminar el exceso de tensoactivos y co-tensoactivos cuya presencia podría provocar la inestabilidad de las NL durante la esterilización, y para que las dispersiones cumplan con la regulación sanitaria. Generalmente se realiza la ultrafiltración centrífuga o ultrafiltración a baja presión, utilizando diferentes tipos de membranas con poros entre 10 y 20 nm. Los sistemas más recomendados son:

- TCF2 ó TCF10A con membrana Diaflo YM 100, 100,000 Da. Usualmente 100 mL de la dispersión original se concentran a un volumen de 20 mL, a los cuales se les adiciona el mismo volumen de agua y se reconcentran nuevamente a 20 mL, repitiendo 3 veces el lavado. Este proceso también elimina casi la totalidad del alcohol bencílico utilizado en el método de emulsificación-difusión, dejando un residuo cercano a 30 ppm.^{7,24,33,34}

- Minitan equipado con membrana de polisulfona de 300,000 Da (PTMK). Permite la obtención de una microemulsión estable que puede ser sometida a liofilización.²⁵

- Equipo Millipore con membrana de PM 100,000 PXB100C50.

No es efectivo en la purificación de dispersiones con nanopartículas lipídicas muy pequeñas o de baja densidad.⁶

En la purificación de las dispersiones de NL también se ha utilizado la diálisis contra agua, durante 5 días a temperatura ambiente, en un tubo Visking (18/32 in) de 12,000-14,000 Da.²³

La liofilización pudiera ser una mejor opción para muchas dispersiones conteniendo nanopartículas lipídicas muy pequeñas o de baja densidad que no pueden ser separadas completamente por ultracentrifugación o ultrafiltración. Tal es el caso de dispersiones preparadas por el método de difusión de disolvente en medio acuoso con PVA, cuyas SLN se quedan en alta proporción en el medio acuoso. El secado por liofilización podría dar lugar a la retención adicional de otros componentes como el exceso de PVA.⁶

Efecto de las condiciones de liofilización

La liofilización permite transformar las dispersiones líquidas de NL en polvos con buenas propiedades físicas, químicamente estables y fácilmente redispersables en agua. El tratamiento generalmente requiere de la adición de crioprotectores, sustancias hidrofílicas que mejoran la velocidad de liofilización y previenen el crecimiento ocasionado por la presión que ejerce el agua congelada en el interior de las partículas. Su eficiencia depende de la matriz lipídica de las NL y de las condiciones del proceso de liofilización.¹⁰

El crioprotector es efectivo cuando protege a las nanopartículas durante el congelamiento, que es la primera etapa de la liofilización. Su presencia disminuye la actividad osmótica del agua en las muestras congeladas favoreciendo el estado amorfo, a la vez que forma barreras que previenen el contacto entre las partículas e interaccionan con las cabezas polares de los tensoactivos, actuando como una envoltura pseudohidratada. Los crioprotectores más usuales son: manitol al 10%, glucosa al 5%, trehalosa

de 5-15%, fructosa, y poloxámero 188. La trehalosa se ha reportado como la más efectiva, sin embargo, la fructosa ha mostrado mejores resultados después de la reconstitución del polvo^{10,34}. En algunos sistemas cierto tipo de ésteres de ácidos grasos y la alta concentración de tensoactivos favorecen la estabilidad durante la liofilización, ya que pueden formar una barrera estérica alrededor de las partículas.¹⁸

La velocidad de enfriamiento es un parámetro crítico en la liofilización, efecto que depende del crioprotector usado. En general un congelamiento rápido (sumergiendo el vial dentro de nitrógeno líquido o goteando la dispersión en el nitrógeno) favorece la formación de cristales pequeños de estructura heterogénea o amorfa, que permiten el escape de vapor de agua a gran velocidad al inicio del proceso, y más lentamente a medida que se va produciendo una masa sólida con poros finos. Un enfriamiento lento dejaría una estructura cristalina con grandes poros que favorecerían la rápida sublimación del agua durante el proceso de secado.

La formación de cristales más grandes con una estructura más homogénea y la transformación de una forma metaestable o amorfa en una cristalina estable, puede lograrse congelando a una temperatura suficientemente baja y enseguida elevándola rápidamente hasta que las partículas sólidas empiecen a colapsar. La temperatura se mantiene constante por un tiempo y nuevamente se enfría hasta alcanzar las condiciones del proceso de secado. Para evitar el deshielo de la muestra es aconsejable determinar la temperatura óptima mediante análisis por DSC³⁵. El uso de temperaturas extremadamente bajas (-196°C) durante el congelamiento da lugar a la formación de mayor número de agregados durante la reconstitución del polvo.

La liofilización de dispersiones de NL generalmente se lleva a cabo en las siguientes condiciones: congelación de -25°C a -75°C, secado a 20°C, a una presión de 3 mm Hg o 45 mbar durante 24-36 h. El proceso de liofilización generalmente afecta la cristalinidad de algunos lípidos que forman las partículas, tal como se mostró en la tabla 5.

Efecto de las condiciones de esterilización

Los productos para administración parenteral o pulmonar tienen que ser estériles, para lo cual las dispersiones de NL que van a ser utilizadas con este propósito, se someten a un proceso de esterilización después de su concentración y purificación, o bien, se producen en condiciones estériles. El proceso de esterilización no deberá cambiar las propiedades físicas, la estabilidad química ni la cinética de liberación de las NL, razón por la cual algunas formulaciones no pueden ser esterilizadas por los métodos usuales.

La esterilización por calor es sin duda el método más aplicado para las dispersiones de NL, a pesar de que el calentamiento en

autoclave a 121°C, 2 bar, durante 15 min, deteriora las partículas en mayor o menor grado, dependiendo de sus componentes y del medio en el cual se encuentren dispersas. Los lípidos presentes en las matrices de NL funden durante el calentamiento y podrían modificar el tamaño de partícula durante el enfriamiento, debido a la coalescencia que pudieran presentar las nanogotas antes de su solidificación. La recrystalización en aquellas NL a las que se les ha impartido características especiales dirigidas a modular el perfil de liberación, mediante el control de los parámetros de producción, estaría fuera de control después del proceso de esterilización en autoclave y se perderían dichas características; este problema disminuye si el enfriamiento es lento³⁴. La pérdida de estabilidad física de las partículas causada por el proceso de esterilización con calor, se presenta con mayor frecuencia cuando previamente se ha eliminado el exceso de emulsificantes en las dispersiones, mediante diálisis o ultrafiltración.

La temperatura afecta la movilidad e hidrofiliidad de los emulsificantes y de los estabilizantes poliméricos, por lo deben ser seleccionados en forma cuidadosa, de tal forma que garanticen la estabilidad física de las NL después de ser esterilizadas por calor. La temperatura que se alcanza durante la esterilización en autoclave puede ser mayor que la temperatura crítica de floculación de algunos polímeros del tipo del poloxámero (75.5°C), lo que causa la deshidratación de las moléculas poliméricas adsorbidas, provocando que la capa de recubrimiento colapse y facilite la agregación de las partículas. Disminuyendo la temperatura y aumentando el tiempo de exposición, podría reducirse este fenómeno en forma importante. Una temperatura de 110°C disminuiría sustancialmente la posibilidad de agregación de las SLN que contengan poloxámero en ausencia de iones.³⁶

Tabla 9. Efecto de la estearilamina en el tamaño y en el potencial zeta de SLN cargadas con clozapina, antes y después de su esterilización por calor

Formulación de SLN	Tamaño (nm)		Potencial zeta (mV)	
	Antes	Después	Antes	Después
Trimiristina	225	516	1.1	-3.9
Tripalmitina	223	536	0.2	-5.7
Triestearina	266	616	4.1	-4.3
Trimiristina-estearilamina	150	289	33.2	-6.0
Tripalmitina-estearilamina	163	354	23.2	0.7
Triestearina-estearilamina	97	287	21.3	-7.2

La presencia de electrolitos en la formulación de NL, puede influenciar fuertemente la temperatura crítica de los poloxámeros y las características de las partículas al modificar su potencial zeta, por lo que los iones se consideran como agentes deteriorantes de la estabilidad. Ciertos fármacos como la tetracaina y el etomidato pueden provocar una distorsión en las propiedades mecánicas de la película interfacial de tensoactivos en las NL durante la esterilización por calor³⁶. La presencia de estearilamina utilizada en algunas formulaciones como estabilizante de la carga, puede provocar un aumento en el tamaño hasta de tres veces, en SLN conteniendo clozapina, y dependiendo del triglicérido, modificar considerablemente su potencial zeta (tabla 9)²⁸. Por otro lado, dispersiones de NL esterilizadas por vapor, a las cuales se les ha adicionado algunos estabilizantes como la lecitina, solamente muestran un ligero incremento en el tamaño y en el número de micropartículas.³⁶

El efecto de la temperatura en el crecimiento de las partículas durante la esterilización, puede disminuirse modificando la superficie de los viales de vidrio y utilizando una baja concentración de lípidos (2%), cuestión que evita la gelificación de la dispersión. El uso de una atmósfera inerte que elimine el dióxido de carbono y aumente el pH del medio, también genera un efecto protector, lo cual sugiere que ciertas reacciones químicas llevadas a cabo en medio ácido pueden contribuir a la desestabilización de las partículas³⁶. Así, SLN conteniendo ácido behémico y ácido esteárico aumentan al doble su tamaño al ser esterilizadas por vapor, problema que no se presenta cuando las SLN se elaboran con otro tipo de componentes.³⁶

Tabla 10. Características de diferentes tipos de homogeneizadores utilizados en el escalamiento de dispersiones de NP

Característica	Lab 40	Lab 60	Gaulin 5.5
Número de pistones/válvulas	1/1	2/2	3/2
Presión de operación (bar)	100-1500	50-500	50-500
Capacidad	40 mL/ciclo ----	60 L/h 10 L (max)	150 L/h 50 L (max)
Tipo de lote	Discontinuo	Continuo	Continuo
Escala de operación	Laboratorio	Lote clínico	Lote producción

La filtración puede ser un proceso de esterilización aplicable a las dispersiones de SLN, de manera similar a como se emplea en las microemulsiones para nutrición parenteral. Las nanodispersiones deben ser filtradas en estado líquido mediante el uso de presión, de tal modo que todas las partículas puedan pasar por el filtro, independientemente que después del enfriamiento adquieran un tamaño mayor al de los poros. No deben ser filtradas dispersiones con partículas mayores de 0.2 μm .¹

La esterilización por radiación con rayos γ representa una alternativa para productos que no pueden ser tratados con otros métodos. Este proceso origina un incremento en el tamaño de SLN elaboradas con poloxámero y estabilizadas con lecitina, menor que el causado por el vapor de agua a 121°C y similar al producido a 110°C. Se ha dicho que la esterilización por rayos γ puede provocar cambios químicos en los componentes debido a la formación de radicales libres y causar inestabilidad en las partículas, hecho que no ha sido completamente comprobado. La formación de especies como lisofosfátidos o ácidos grasos libres, actuarían a favor de la conservación de partículas pequeñas, aunque podrían originar algunos problemas toxicológicos.³⁶

Presentación final de las dispersiones de SLN y NLC

La incorporación de las dispersiones de NL en geles o en cremas o/w de aplicación tópica, facilita su administración y mejoran su estabilidad física a largo plazo, al mismo tiempo que le imparten características de liberación controlada a la presentación farmacéutica.⁴

El acondicionamiento de dispersiones de SLN en hidrogeles de dextrano-metacrilato, da lugar a un sistema de administración oral que no presenta las características típicas de las nanosuspensiones; es más estable, fácil de liofilizar sin la adición de crioprotectores y puede ser utilizado en la preparación de tabletas o cápsulas para la administración sostenida de fármacos.²⁹

Las dispersiones de NLC acondicionadas en hidrogeles de carbopol mejoran su estabilidad cuando son neutralizados con trietanolamina, en comparación con los neutralizados con electrolitos, ya que disminuye el efecto iónico sobre el potencial zeta. Sin embargo, la trietanolamina puede inducir la precipitación de los tensoactivos no iónicos y de otros componentes que se encuentren en alta proporción. La disminución del potencial zeta favorece el crecimiento de las partículas y la formación de un pseudogel altamente dependiente de la cristalinidad de la fase lipídica.^{22,37}

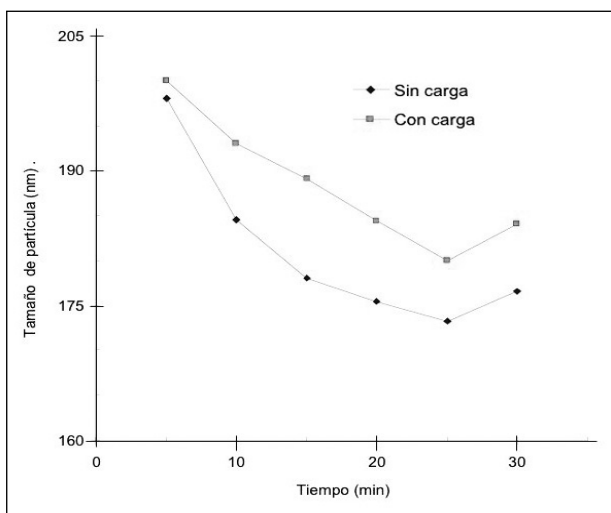
Escalamiento del proceso de obtención de nanopartículas lipídicas

El escalamiento es una parte importante del desarrollo del producto, cuando va a ser elaborado en escala industrial. El escalamiento de los procesos de obtención de NL por homogeneización a alta presión y microemulsificación, ha sido exitoso y cumple con

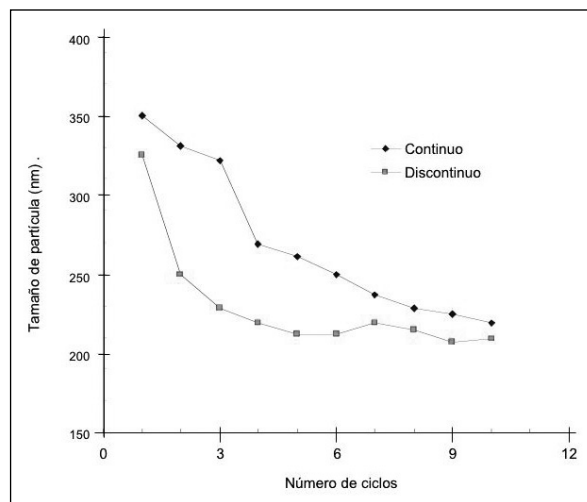
la regulación sanitaria de las Buenas Prácticas de Fabricación, lo que hace posible emplearlos para la producción de dispersiones de NL hasta un nivel medio². Diferentes formulaciones han sido escaladas mediante el uso de homogeneizadores de pistón de diferente capacidad (Lab 40, Lab 60 y Gaulin 5.5) que operan en condiciones de temperatura y presión controlada. Sus características principales se muestran en la tabla 10.^{38,39,40}

La homogeneización en el Lab 40 durante varios ciclos requiere alimentar el producto en cada ocasión. En el Lab 60 la dispersión pasa a través de dos válvulas de homogeneización mediante un sistema de alimentación continua. La primera opera a una presión de 500 bar y la segunda a 50 bar, lo cual genera una presión de rebote que redispersaría las gotas que han presentado coalescencia o agregación. El ajuste de la temperatura en el tanque de alimentación (temperatura de producción) y en el recipiente del producto (temperatura de enfriamiento) se realiza de manera independiente.

Para lotes de 2 kg resultaría más efectivo el proceso de circulación continua, debido a que en el discontinuo el volumen muerto es relativamente alto. Las variables que afectan el tamaño de partícula en este proceso son: el tiempo, la presión de homogeneización y el número de ciclos (gráficas 3 y 4). Generalmente el tamaño de partícula se estabiliza después de 15 min y después de 4 ciclos; en estas condiciones la carga del fármaco solamente tiene un pequeño impacto³⁸. El procesamiento de lotes de 10 kg mediante circulación continua en el Lab 60, se realiza en el doble de tiempo. La homogeneización de lotes mayores de 20 kg, requiere un tiempo de exposición muy alto, presentándose el sobrecalentamiento de las grasas en el tanque de alimentación,



Gráfica 3. Efecto del tiempo de homogeneización y de la carga del fármaco en el tamaño de partícula de NL obtenidas en un proceso continuo, a una presión de 500 bar



Gráfica 4. Efecto del número de ciclos de homogeneización en el tamaño de partícula en un proceso continuo y en uno discontinuo

ya que se requiere alcanzar una temperatura 10°C por arriba del punto de fusión y posteriormente enfriar hasta temperatura ambiente. Este problema no se presenta cuando se utiliza el Gaulin 5.5 en el cual no recircula el producto, disminuyendo el tiempo de calentamiento y de producción.

El equipo Gaulin 5.5 opera con 3 pistones, tiene dos homogeneizadores en serie, cuenta con agitación en atmósfera inerte durante el enfriamiento y durante la recristalización. Las variables de operación son el tiempo, la presión y la velocidad de enfriamiento. Cuando el Lab 60 se combina con el Gaulin 5.5 se disminuye la variabilidad en la presión, se evita la realimentación y se reduce el tiempo de almacenamiento después de un ciclo. Cuando se utilizan 500 bar en cada homogeneizador, el tamaño de partícula y la distribución se encuentran dentro de un rango altamente aceptable.

La velocidad de enfriamiento es un parámetro crítico. Si se realiza mediante circulación de agua a 18°C, el producto presenta tamaño de partícula pequeño con poca distribución; si el agua se encuentra a 8°C, el enfriamiento es drástico en los primeros litros de la dispersión, originando la separación del lípido, su depósito en las paredes del contenedor y un número importante de partículas micrométricas.³⁹

El proceso de homogeneización en caliente a gran escala en estos equipos, presenta buena reproducibilidad, encontrándose entre lotes una variación de 10 nm en el tamaño de partícula y una variación mínima en la carga.³⁹

El proceso de secado en lotes de 1 L de dispersiones de SLN preparadas por microemulsificación, mediante un equipo que

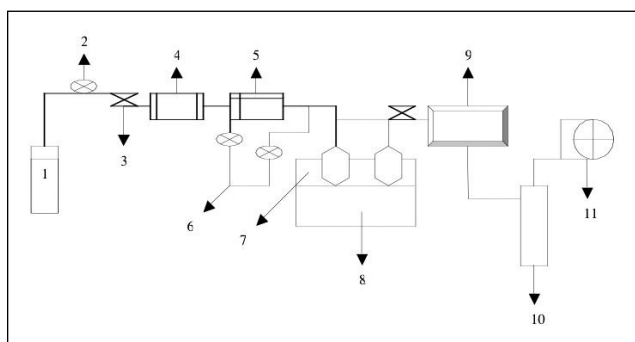


Figura 3. Representación esquemática de un equipo de secado a vacío

Donde: 1: tanque de N₂; 2: válvula; 3: regulador de presión; 4: filtro 4-8 μm; 5: plato perforado; 6: calibrador diferencial de presión; 7: tanque de evaporación; 8: baño termostático; 9: alúmina; 10: filtro de 5 μm; 11: bomba de vacío

utiliza alúmina como sustancia desecante, se ha llevado a cabo con mínima variación en el tamaño de partícula. El equipo cuenta con 12 recipientes de vidrio dentro de un baño regulado a 20-60°C donde se coloca la dispersión, funciona en atmósfera inerte y baja presión (1.5 mbar)⁴¹. En la figura 3 se describe el aparato.

Al inicio del proceso se optimiza el flujo de nitrógeno de acuerdo a la cinética de secado, a la temperatura y a la concentración de la dispersión. Todos los factores experimentales afectan el tiempo total de secado. La circulación del gas inerte contribuye como fuerza impulsora en la transferencia de calor, y su efecto en la aglomeración de partículas es imperceptible. El tamaño óptimo de las SLN se obtiene a la menor concentración inicial y a la máxima temperatura (durante 5 h aproximadamente), o bien, a alta concentración y menor temperatura, lo que incrementa el tiempo de operación (10 h) y la cantidad de partículas pequeñas. En este proceso la temperatura tiene un efecto 3 veces menor en comparación con el proceso de liofilización, y presenta menor aglomeración de partículas y menores costos de operación en un proceso de capacidad similar.⁴¹

El proceso de elaboración de SLN por el método de membrana de contacto ha sido escalado a nivel producción²⁶. La fase acuosa efluente se enfría hasta temperatura ambiente a una velocidad de 5°C/h. La optimización de la velocidad de flujo del lípido (J) se calcula en función de su volumen (V), del tiempo de interacción (t) y del área superficial de la membrana (A): $J = V/(\Delta t \cdot A)$. El flujo del lípido es proporcional al tiempo requerido para la formación de las SLN. Su valor permite comparar los resultados obtenidos con diferentes membranas y diferentes superficies⁴². La inyección de la fase acuosa a una velocidad de 1.7 m.s⁻¹ en una membrana de 0.0075 m², da una eficiencia de 1.2 L en 12 min. Extrapolando las condiciones

para una membrana de 0.34 m², se podrían preparar 55 L en el mismo tiempo.

Conclusiones

Los principales métodos de obtención de nanopartículas lipídicas reportados en años recientes son:

a) Homogeneización a alta presión. Es fácilmente escalable a nivel producción, puede ser llevado a cabo con calentamiento o en frío. La principal desventaja del método en caliente es que acelera la descomposición del fármaco. La homogeneización a alta presión en frío permite la encapsulación de fármacos termolábiles e hidrofílicos.

b) Emulsificación de disoluciones lipídicas mediante evaporación o difusión del disolvente. Se realiza en condiciones de temperatura más benignas y sin necesidad de equipo especial. Sus principales desventajas son la posible retención de residuos del disolvente y la baja concentración de NL en las dispersiones. La versatilidad del método de difusión permite obtener dispersiones de NL de alta calidad.

c) Microemulsificación. Se realiza mediante el uso de alta fuerza de corte, por agitación mecánica o ultrasonido. Con este método es posible la obtención de nanopartículas estables a partir de altas concentraciones de tensoactivos y co-tensoactivos, lo cual limita su uso para la administración de fármacos en humanos.

Generalmente la temperatura y las condiciones de homogeneización son los factores que más afectan las características de las NL, ya que determinan el grado de disgregación particular. La homogeneización a alta presión o con ultrasonido son los métodos más usuales. Las condiciones de operación muy drásticas favorecen la coalescencia de las partículas.

Las características del estado sólido al interior de las NL están determinadas por la temperatura y por el tipo lípidos utilizado en la formulación, condiciones que afectan la eficiencia de carga del fármaco y en algunas ocasiones el tamaño de partícula. Los emulsificantes, co-emulsificantes y los polímeros protectores en general presentan un efecto sinérgico, formando una capa con alta capacidad de recubrimiento. Pueden ser incorporados en la fase oleosa o en la acuosa. En la fase oleosa son más efectivos; facilitan la formación de las gotas y de la película protectora, originando partículas con mayor capacidad de carga.

Las dispersiones de NL generalmente tienen que someterse a un proceso que elimine el exceso de tensoactivos y que concentre las NL. Con este fin, usualmente se utiliza la ultrafiltración centrífuga o ultrafiltración a baja presión, utilizando diferentes tipos de membranas como la Diafo YM 100, 100,000 Da.

La esterilización de las dispersiones de NL en autoclave no siempre se puede llevar a cabo debido a que el calor facilita el crecimiento de las partículas, limitando el uso de productos destinados a la administración parenteral. La filtración por membrana es el proceso de esterilización alternativo. La liofilización en presencia de crioprotectores es aconsejable para incrementar la estabilidad del tamaño de partícula de las dispersiones durante el almacenamiento.

El escalamiento de los procesos ha sido exitoso para los métodos de homogeneización a alta presión y microemulsificación, y su implementación puede cumplir con las Buenas Prácticas de Fabricación.

Referencias

- Müller RH, Radtke M., Wissing SA. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242:121-128.
- Wissing SA., Kayser O., Müller RH, 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56:1257-1272.
- Castelli F., Puglia C., Sarpietro M.G., Rizza L., Bonina F. 2005. Characterization of indomethacin-loaded nanoparticles by differential scanning calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics*, 304:231-238.
- Souto E.B., Anselmi C., Centini M., Müller R.H. 2005. Preparation and characterization of *n*-dodecyl-ferulate-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 295:261-268.
- Jenning V., Thünemann A.F., Gohla S.H. 2000. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199:167-177.
- Hu F.Q., Yuan H., Zhang H.H., Fang M. 2002. Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization. *International Journal of Pharmaceutics*, 239:121-128.
- Trotta M., Debernardi F., Caputo O. 2003, Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257:153-160.
- Wang Y., Deng Y., Mao S., Jin S. Wang J., Bi D. 2005. Characterization and body distribution of β -elemene solid lipid nanoparticles (SLN). *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31:769-778.
- Freitas C., Müller RH. 1998. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions, *International Journal of Pharmaceutics*, 168:221-229.
- Yang S.C., Zhu J.B. 2002. Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(3):265-274.
- Hu F.Q., Jiang S.P., Du Y.Z. Yuan H., Ye Y.Q., Zeng S. 2006, Preparation and characterization of monostearin nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*, 314:83-89.
- Jores K., Mehnert W., Mäder K. 2003. Physicochemical investigations on solid lipid nanoparticles: A nuclear magnetic resonance and electro spin resonance study. *Pharmaceutical Research*, 20(8):1272-1283.
- Jores K., Haberland A., Wartewig S., Mäder K., Mehnert W. 2005. Solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded SLN studied by spectrofluorometry and raman spectroscopy. *Pharmaceutical Research*, 22(11):1887-1897.
- Reddy L.H, Vivek K., Bakshi N., Murthy R.S.R. 2006. Tamoxifen citrate loaded solid lipid nanoparticles (SLN): preparation, characterization, in vitro drug release and pharmacokinetic evaluation. *Pharmaceutical Development Technology*, 11:167-177.
- Friedrich I., Reichl S., Müller-Goymann C.C. 2005. Drug release and permeation studies of nanosuspensions based on solidified reverse micellar solutions (SRMS). *International Journal of Pharmaceutics*, 305:167-175.
- Almeida A., Runge S., Müller R.H. 1997. Peptide-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): influence of production parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 149:255-265.
- Kocbek P., Baumgartner S., Kristl J. 2006. Preparation and evaluation of nanosuspensions for enhancing the dissolution of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 312:179-186.
- Yegin B.A., Benoit J.P., Lamprecht A. 2006. Paclitaxel-loaded lipid nanoparticles prepared by solvent injection or ultrasound emulsification. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32:1089-1094.
- Hu F.Q., Hong Y., Yuan H. 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, 273:29-35.
- Shahgaldian P., Da Silva E., Coleman A.W., Rather B., Zaworotko M.J. 2003. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLN): a detailed study of preparation and stability parameters. *International Journal of Pharmaceutics*, 253:23-38.
- Liu J., Zhu J., Du Z., Quin B. 2005. Preparation and pharmacokinetic evaluation of tashinone IIA solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31:551-556.
- Joshi M., Patravale V. 2006. Formulation and evaluation of nanostructured lipid carriers, NLC-based gel of valdecoxib. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 32:911-918.
- Fontana G., Maniscalco L., Schillaci D., Cavallaro G., Giannona G. 2005. Solid Lipid nanoparticles containing tamoxifen characterization and *in vitro* antitumoral activity. *Drug Delivery*, 12:385-392.

24. Morel S., Ugazio E., Cavalli R., Gasco M.R. 1996. Thymopentin in solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 132:259-261.
25. Igartua M., Saulnier P., Heurtault B., Pech B., Proust J.E., Pedraz J.L., Benoit J.P. 2002. Development and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with magnetite. *International Journal of Pharmaceutics*, 233:149-157.
26. Charcosset C., El-Harati A., Fessi H. 2005. Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor. *Journal of Controlled Release*, 108:112-120.
27. Liedtke S., Wissing S., Müller R.H., Mäder K. 2000. Influence of high pressure homogenisation equipment on nanodispersion characteristics. *International Journal of Pharmaceutics*, 196:183-185.
28. Venkateswarlu V., Manjunath K. 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 95:627-638.
29. Casadei M-A., Cerreto F., Cesa S., Giannuzzo M., Feeney M., Marianecchi C., Paolicelli P. 2006. Solid lipid nanoparticles incorporated in dextran hydrogels: a new drug delivery system for oral formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 325:140-146.
30. Hou D., Xie C., Huang K., Zhu C. 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLN). *Biomaterials*, 24:1781-1785.
31. Friedrich I., Müller-Goymann C.C. 2003. Characterization of solidified reverse micellar solutions (SRMS) and production development of SRMS-based nanosuspensions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 56:111-119.
32. Lippacher A., Müller R.H., Mäder K. 2001. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 214:9-12.
33. Cavalli R., Gasco M.R., Barresi A.A., Rovero G. 2001. Evaporative drying of aqueous dispersions of solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27(9):919-924.
34. Cavalli R., Caputo O., Carlotti M.E., Trotta M., Scarnecchia C., Gasco M.R. 1997. Sterilization and freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 148:47-54.
35. Zimmerman E., Müller R.H., Mäder K. 2000. Influence of different parameters on reconstitution of lyophilized SLN. *International Journal of Pharmaceutics*, 196:211-213.
36. Mehnert W., Mäder K. 2001. Solid lipid nanoparticles. Production, characterization and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 165-196.
37. Mei Z., Wu Q., Hu S., Li X. 2005. Triptolide loaded solid lipid nanoparticle hydrogel for topical application. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31:161-168.
38. Dingler A., Gohla S. 2002. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *Journal of Microencapsulation*, 19(1):11-16.
39. Jennings V., Lippacher A., Gohla S.H. 2002. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *Journal of Microencapsulation*, 19(1):1-10.
40. Saupe A., Wissing S.A., Lenk A., Schmidt C., Müller R.H. 2005. Solid lipid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)-Structural investigations on two different carrier systems. *Bio-Medical Material and Engineering*, 15:393-402.
41. Marengo E., Cavalli R., Rovero G., Gasco M.R. 2003. Scale-up and optimization of an evaporative drying process applied to aqueous dispersions of solid lipid nanoparticles. *Pharmaceutical Development and Technology*, 8(3):299-309.
42. El-Harati A.A., Charcosset C., Fessi H. 2006. Influence of the formulation for solid lipid nanoparticles prepared with a membrane contractor. *Pharmaceutical Development and Technology*, 11:153-157.