

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA

ESTUDIO BIOFARMACEUTICO DE UNA EMULSION DE
=====

VITAMINA A PALMITATO LIOFILIZADA
=====

Memoria presentada para optar
al Grado de Doctor por:

MARIA DEL CARMEN MOLINA MILLAN

Director:

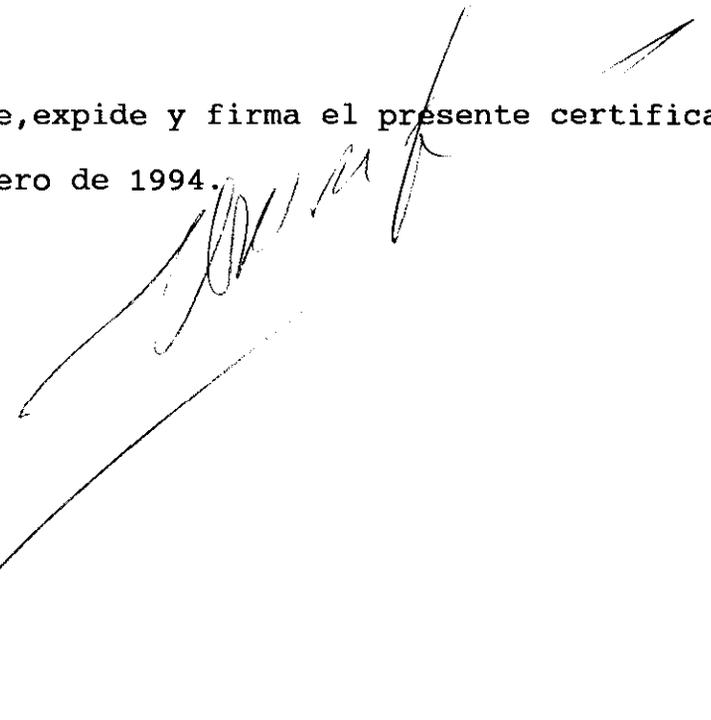
Prof. Dr. D. RAFAEL CADORNIGA

MADRID. 12 ENERO 1994

D.RAFANEL CADORNIGA CARRO, CATEDRATICO DE FARMACIA Y TECNOLOGIA FARMACEUTICA EN LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID .

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral, elaborada por la licenciada en Farmacia Dña Maria del Carmen Molina Millán sobre "ESTUDIO BIOFARMACEUTICO DE UNA EMULSION DE VITAMINA A PALMITATO LIOFILIZADA" ha sido realizada bajo la dirección del profesor que suscribe, en el laboratorio del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica y hallándose concluída se autoriza su presentación a fin de que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

y para que así conste, expide y firma el presente certificado en Madrid, a doce de enero de 1994.



A la Ciencia

porque puede ser algo enormemente
divertido si se está dispuesto a
comprometerse en cuerpo y alma.

A todos con los que comparto ésta idea

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al director de ésta Tesis, el profesor Dr. D.Rafael Cadórniga Carro por su constante estímulo, así como por sus valiosos consejos y orientaciones a lo largo de la realización de ésta memoria, sin olvidar la confianza que siempre depositó en mí y la oportunidad que me brindó al permitirme iniciar mi corta carrera investigadora.

Mi sincera gratitud al profesor Dr.D.Mariano Illera Martin, Catedrático de la Facultad de Veterinaria, quién con su ayuda desinteresada, su apoyo y colaboración, puso a mi disposición todo lo necesario para culminar ésta Tesis.

Hago extensivo mi agradecimiento al profesor Dr.D. Dieter Ballnet Brandau, de esa misma Facultad, su colaboración, con el único interés de ayudarme, fué alentadora en momentos difíciles y resultó imprescindible para la realización de ésta memoria.

A ambos: Dr.Illera, Dr.Brandau, gracias por permitir un trabajo en equipo, por reafirmar que la investigación no es fruto de un único individuo y por considerar que la labor conjunta se conseguiría al facilitar la conexión entre las dos Facultades .

Sin duda alguna, la amistad es el mejor apoyo, tanto mas si a és-

te sentimiento se le suma una colaboración científica, por todo -
ésto doy las gracias a la profesora Dra Carmen Rueda, a quién no
solo considero una amiga, si no que fué quién me abrió camino en
un campo totalmente desconocido para mí, me aconsejó y orientó -
para llevar a buén fin una parte de mi Tesis que sin su ayuda me
hubiese resultado dificil de realizar.

A la Dra. Concepción Arias por su amistad, su ayuda científica y
moral en cualquier momento que la necesitase.

A la Dra.Gloria Frutos por el apoyo personal y ayuda científica
que me prestó en los árduos tratamientos estadísticos.

A Ismael Gomez compañero de trabajo y amigo .

A todos mis compañeros de la Facultad de Veterinaria, quienes me
han ayudado, me han orientado, y han puesto todo el interés para
hacerme mas facil el desconocido para mí, mundo de los animales
Todo lo han hecho desinteresadamente y han conseguido durante -
mi corta estancia en esa Facultad, que me sintiese como uno de
ellos .

A mi amiga Cristina Barahona, con quién he compartido tanto mo -
mentos alegres como situaciones de desánimo. Su comprensión y pa -
ciencia me han ayudado a superarlas y por ello, desde aquí le a-

nimo a que continúe con el trabajo que ha comenzado para que pueda vivir y experimentar el final del comienzo de su actividad investigadora.

Mi gratitud al resto de compañeros, profesores y personal administrativo del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, son muchos con los que he compartido momentos difíciles, gracias por el ánimo y la ayuda que me han ofrecido, ellos lo saben. Gracias por todo.

INDICE:

Pg

PARTE TEORICA

1. INTRODUCCION	1
2. EMULSION .CONCEPTO FISICO-QUIMICO	3
2.1. ESTUDIO DEL EMULGENTE	
2.1.1. COMPOSICION QUIMICA DE LA BILIS	4
2.1.2. FUNCIONES FISIOLOGICAS DE LA BILIS	6
2.1.3. METABOLISMO DE LAS SALES BILIARES	9
2.2. CONCENTRACION CRITICA MICELAR .CONCEPTO Y METODOS DE DETERMINACION	
2.2.1. METODO TENSIOMETRICO	12
2.2.2. METODO DE SOLUBILIZACION	14
2.2.3. METODO CONDUCTIMETRICO	15
2.2.4. METODO REFRACTOMETRICO	15
2.2.5. METODO DE DIFUSION DE LUZ .LIGHT SCATTERING.	16
2.2.6. METODO ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE.	17
2.2.7. METODO DE ESPECTROSCOPIA RMN	17
2.2.8. METODO DE OSMOMETRIA DE PRESION DE VAPOR ...	18
2.2.9. METODO DE MEDIDAS DE DENSIDAD	19
2.3 ESTABILIDAD FISICA DEL SISTEMA EMULSIFICADO	
2.3.1. TEORIA DLVO	20
2.3.2. FLOCULACION	23
2.3.3. COALESCENCIA	24
2.3.4. CREMA .SEDIMENTACION INVERSA	24

2.3.5.DIFUSION MOLECULAR	25
2.3.6.FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA ESTABILIDAD DE UNA EMULSION	25
2.3.7.ESTUDIO GRANULOMETRICO	28
2.3.8.ESTUDIO DE VISCOSIDAD	37
3.LIOFILIZACION DE EMULSIONES	45
4.ESTUDIO DEL PRINCIPIO ACTIVO	
4.1.ESTRUCTURA QUIMICA.PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS	51
4.2.FARMACOCINETICA	53
4.3.METODOS DE ANALISIS	59

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 1 .FORMULACION :ENSAYOS

1.1. MATERIAL UTILIZADO.

1.1.1.COMPOSICION DE LA EMULSION	64
1.1.2.PREPARACION	65
1.1.3.LIOFILIZACION	67

1.2.CONTROLES

1.2.1.ASPECTO Y CAPACIDAD DE REGENERACION DEL PRODUCTO LIOFILIZADO	68
1.2.2.HUMEDAD DEL PRODUCTO LIOFILIZADO	71
1.2.3.ASPECTO Y SIGNO DE LA EMULSION	71

1.2.4.ESTABILIDAD FISICA DE LA EMULSION	72
1.2.5.CONTROL DE DENSIDADES DE LAS FASES	77
1.2.6.CONTROL DE pH	79
1.2.7.ESTUDIO GRANULOMETRICO DEL SISTEMA EMULSIFICADO	
1.2.7.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	82
1.2.7.2.DISPOSITIVO DE MEDIDA	83
1.2.7.3.CONDICIONES EXPERIENTALES	86
1.2.7.4.INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS	88
1.2.7.5.RESULTADOS	92
1.2.7.6.CONCLUSIONES	114
 1.2.8.VISCOSIDAD	
1.2.8.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	117
1.2.8.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA	118
1.2.8.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	120
1.2.8.4.RESULTADOS	122
1.INFLUENCIA DEL MOMENTO EN QUE SE LLEVA	
A CABO EL PROCESO DE ESTERILIZACION.....	149
2.INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE.	158
3.INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO..	163
4.INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION	163
5.INLUENCIA DEL PROCESO DE LIOFILIZACION....	165
6.ESTUDIO DEL TIPO DE FLUJO DEL SISTEMA	168
1.2.8.5.CONCLUSIONES.....	174

CAPITULO 2 ESTUDIO "IN VITRO" DE LA ESTABILIDAD DEL PRINCIPIO

ACTIVO

2.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	176
2.2.CONDICIONES EXPERIMENTALES	177
2.3.METODO ANALITICO	178
2.4. RESULTADOS	
2.4.A.ALMACENAMIENTO SIN ATMOSFERA DE NITROGENO	183
2.4.B.ALMACENAMIENTO CON ATMOSFERA DE NITROGENO	188
2.4.C.PRESENCIA DE RADIACION ULTRAVIOLETA	193
2.4.D.CONSTANTE DE DEGRADACION.TIEMPO DE VIDA MEDIA.	196
2.4.E.INTERPRETACION ESTADISTICA	197
2.5.CONCLUSIONES	207

CAPITULO 3 ESTUDIO DE TENSIONES SUPERFICIALES E INTERFACIALES

3.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	209
3.2.DISPOSITIVO DE MEDIDA	210
3.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	211
3.4.TECNICA DE MEDIDA	213
3.5.RESULTADOS	216
3.6.CONCLUSIONES	221

CAPITULO 4 MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS DE LOS COMPONENTES

DE LA FASE ACUOSA

4.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	223
--------------------------------	-----

4.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA	224
4.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	224
4.4.RESULTADOS	225
4.5.CONCLUSIONES	267

CAPITULO 5 MEDIDAS CONDUCTIMETRICAS

5.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	269
5.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA	270
5.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	270
5.4.RESULTADOS	271
5.5.CONCLUSIONES	277

CAPITULO 6 MEDIDAS DE DIFUSION DE LUZ

6.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	279
6.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA	280
6.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	288
6.4.RESULTADOS	289
6.5.CONCLUSIONES	299

CAPITULO 7 ENSAYO "IN VIVO"

7.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO	301
7.2.DISPOSITIVO DE MEDIDA	301
7.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES	
A.CONEJOS SIN SUFRIR OPERACION QUIRURGICA	302

B. CONEJOS SOMETIDOS A OPERACION QUIRURGICA	304
7.4. METODO ANALITICO	
7.4.1. METODO DE EXTRACCION DE RETINOL PLASMATICO ...	306
7.4.2. METODO DE VALORACION DE RETINOL PLASMATICO	
7.4.2.1. CONDICIONES CROMATOGRAFICAS	307
7.4.2.2. LINEALIDAD	307
7.4.2.3. PRECISION	308
7.4.2.4. EXACTITUD	309
7.4.2.5. LIMITES DE DETECCION	310
7.4.2.6. FACTORES DE RESPUESTA. CONCENTRACION DE RETINOL PLASMATICO	311
7.5. RESULTADOS	
7.5.1. CURVA PATRON DE RETINOL: LINEALIDAD	313
7.5.2. FACTORES DE RESPUESTA. TIEMPOS DE RETENCION.	317
7.5.3. EXACTITUD	317
7.5.4. PRECISION	319
7.5.5. LIMITES DE DETECCION	320
7.5.6. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL EN CONEJOS SANOS	322
7.5.7. INTERPRETACION ESTADISTICA	329
7.5.8. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL EN CONEJOS SOMETIDOS A OPERACION QUIRURGICA..	334
7.6. CONCLUSIONES	341
CONCLUSIONES	343
BIBLIOGRAFIA	347

PARTE TEORICA

1. INTRODUCCION

Se diseña una emulsión de vitamina A donde el agente tensioactivo desempeña dos misiones fundamentales: permite la emulsificación - del principio activo: (vitamina A palmitato) y actúa como promotor de su absorción.

Esta nueva formulación trata de solventar posibles problemas de - colestasis o colelitiasis, que motivan una hipoabsorción de principios activos liposolubles.

La emulsión como forma farmacéutica, supone un sistema termodinámicamente inestable a causa de su alto contenido energético.

La ruptura o tendencia a la separación de fases, se asocia a una pérdida de energía. Es por ello y debido al interés terapéutico de éste tipo de forma farmacéutica, por lo que nos interesa analizar los factores que contribuyen a aumentar su estabilidad; de aquí la importancia del proceso de liofilización.

La liofilización del sistema emulsificado, no solo supone una mayor estabilidad física, si no que resulta ser por si misma una - técnica de conservación, con la consiguiente ventaja de no tener que incorporar ningún tipo de conservante y con ello evitar posibles efectos secundarios .

La capacidad de regeneración del sistema liofilizado, permite recuperar la emulsión al estado líquido y con ello, las ventajas que a nivel de biodisponibilidad de principios activos, supone el administrarlos en forma de emulsión.

El sistema liofilizado y regenerado, se comporta desde el punto de vista físico-químico, de forma diferente a la emulsión de partida, de aquí el interés del presente trabajo que analiza de forma comparativa ambos sistemas

Como forma farmacéutica nueva, interesa investigar las condiciones mas adecuadas de conservación, a fin de garantizar la actividad vitamínica del principio activo.

Los fenómenos de tensiones superficiales e interfaciales, así como el estudio de la concentración crítica micelar, se consideran imprescindibles a la hora de evaluar la formación y la estabilidad física del sistema emulsificado.

El estudio de biodisponibilidad realizado en conejos, a los que se les inhibe su secreción biliar, trata de confirmar la hipótesis de partida.

2. EMULSION .CONCEPTO FISICO-QUIMICO

La emulsión es un sistema termodinámicamente inestable. El elevado contenido energético que se almacena al tratar de dispersar - fases líquidas inmiscibles, es la causa de su inestabilidad física.

Es por ello, por lo que se hace imprescindible la presencia de - sustancias tensioactivas, capaces de disminuir la tensión superficial y la propia tensión interfacial.

La disminución de la tensión superficial se debe a que las moléculas de emulgente se adsorben en la superficie de la fase líquida, formando una capa de adsorción elástica y coherente.

El balance hidrofilia-lipofilia del emulgente, explica la mayor o menor afinidad por una de las fases y con ello, el signo de la emulsión resultante.

La fase de mayor tensión interfacial; a causa de una menor afinidad química con el emulgente, tiende a presentar una menor superficie de contacto y el mínimo contenido energético, es por ello, por lo que se dispersa en forma de pequeñas gotículas en el seno de la fase externa, constituyendo la fase interna de la emulsión.

2.1. ESTUDIO DEL EMULGENTE

A la hora de elegir el tipo de emulgente, existen ciertos criterios de toxicidad, exigencias de la fase oleosa, compatibilidad, valor de BHL, e incluso, como es en nuestro caso, el carácter y efecto biológico que desempeñan las sales biliares .

2.1.1 COMPOSICION QUIMICA DE LA BILIS

La bilis es un líquido elaborado por las células poligonales del hígado, circula a lo largo de los conductos biliares y desde éstos, a través de los conductos hepático y cístico alcanza la vesícula biliar donde se almacena.

El vaciado por contracción de la vesícula, se estimula por la colecistoquinina segregada por el duodeno .

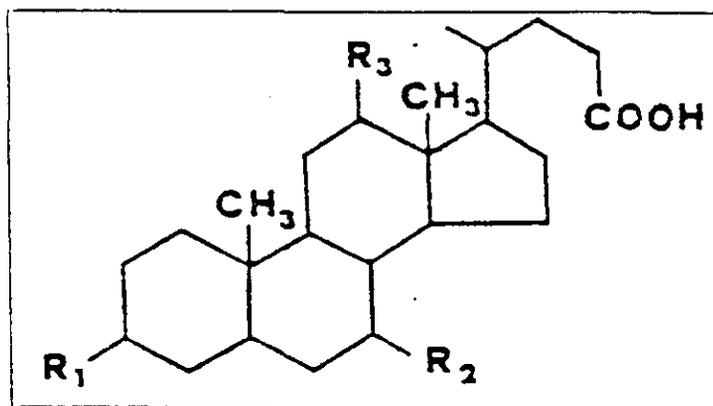
La composición cualitativa y cuantitativa de la bilis, depende de la especie animal, pero fundamentalmente dispone de: ácidos biliares, colesterol, lecitina, pigmentos biliares, cationes: sodio, potasio, etc.

Según la zona donde se sintetizan los ácidos biliares, se clasifican en primarios y secundarios.

Los primarios, se sintetizan en el hígado a partir del colesterol (1)(2): Acido Cólico, Quenodesoxicólico. Los secundarios, se sin-

tetizan en el intestino grueso a nivel del ciego, proceden de sales biliares que no se reabsorben en el intestino delgado y sufren procesos de desconjugación e hidrólisis: Ácidos Desoxicólico y Litocólico.

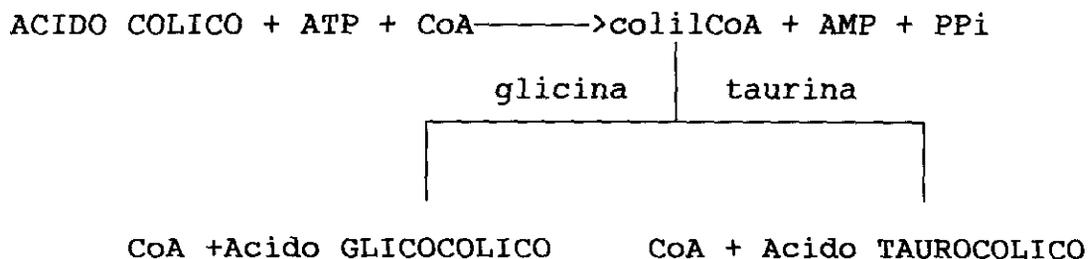
ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS PRINCIPALES ACIDOS BILIARES



ACIDO BILIAR	R ₁	R ₂	R ₃
Acido Cólico.....	OH	OH	OH
Acido Quenodexosicólico.....	OH	OH	H
Acido Desoxicólico	OH	H	H
Acido Litocólico	OH	H	H

En la bilis, éstos ácidos están enlazados por enlaces amídicos a los aminoácidos: glicina y taurina .(3)

La ruta de biosíntesis puede esquematizarse:



Se piensa que posiblemente de forma semejante, se sinteticen los derivados de otros ácidos: glicoquenodesoxicólico, glicodesoxicólico, etc.

Como resultado del pH alcalino de la bilis, éstos ácidos conjugados se presentan en forma de sales sódicas y potásicas.

2.1.2.FUNCIONES FISIOLOGICAS

La influencia de las sales biliares en la absorción de medicamentos, puede clasificarse en tres categorías.

1/Interacción fisico-química de las sales biliares con la mucosa gastro-intestinal

Debido al carácter tensioactivo de las sales biliares, interaccionan con los fosfolípidos de las membranas, modificando su permeabilidad(4).

El aumento de permeabilidad supone una modificación en la absorción (5), según la naturaleza química del principio activo.

Se demuestra cierta influencia del peso molecular, ésto es : compuestos de peso molecular bajo; capaces de difundir de forma pasiva, apenas se ven afectados, pero una difusión por transporte activo asociado a pesos moleculares grandes, se ve favorecido en presencia de las sales biliares.

Una concentración de sales biliares superior a la concentración crítica micelar, puede favorecer no solo a la absorción de moléculas ionizadas, los compuestos lipofílicos; introducidos en el interior de micelas, difunden fácilmente a través de la capa acuosa de la membrana gastro-intestinal (6)(7).

En éstos últimos años, (8)(9)(10), se está estudiando el efecto de las sales biliares en la absorción linfática de algunos principios activos.

La administración nasal puede ofrecer una alternativa en caso de compuestos de difícil absorción gastrointestinal, sin embargo, la mucosa nasal es solo moderadamente permeable a ciertas sustancias hidrosolubles, de aquí el interés de recientes estudios sobre la influencia de las sales biliares en el aumento de la permeabilidad de la mucosa nasal (11)(12). La presencia de micelas mixtas de sales biliares y ácidos grasos, ejercen un papel fundamental como adyuvantes.

Actualmente se ha puesto de manifiesto que la interacción de sales biliares y lisofosfatidilcolina con membranas biológicas, es la causa de ciertos desórdenes gastrointestinales, úlceras, cancer de colon, debido al aumento de permeabilidad (13)(14).

La presencia de fosfatidilcolina e incluso otros fosfolípidos contrarrestan y reducen éstos daños(15).

2/Efectos fisiológicos de las sales biliares

Las sales biliares pueden actuar disminuyendo la velocidad de vaciamiento gástrico(16), con el consiguiente efecto sobre la bio - disponibilidad del principio activo.

Se observa en algunos casos (17), una posible influencia de las sales biliares en la distribución de medicamentos.

3/Fenómeno de solubilización de las sales biliares

Las sales biliares como sustancias anfifílicas, son solubles en agua hasta una cierta concentración a partir de la cuál, no se dispersan al estado molecular, pero se asocian en agregados micelares.

El fenómeno de la solubilización micelar, fué estudiado con profundidad en los años sesenta (18),(19). Una vez alcanzada la concentración crítica micelar, el principio activo; por su coefi -

ciente de reparto, se encontrará disperso en la fase acuosa y solubilizado en el interior de la micela.

La estructura micelar favorece la solubilidad de compuestos liposolubles. El balance hidrofilia-lipofilia de las sales biliares, permite emulsificar lípidos, triglicéridos(20), en la fase interna de emulsiones oleo-acuosas.

La presencia de sales biliares junto a un cosurfactante, permite disminuir la tensión interfacial (21), hasta un valor tal, que es posible obtener microemulsiones (22)(23)(24).

2.1.3 METABOLISMO DE LAS SALES BILIARES

El metabolismo de las sales biliares, se asocia a un proceso de circulación enterohepática (25)(26), que a su vez regula su propia biosíntesis.

La reabsorción de los ácidos biliares en diferentes zonas del intestino delgado y grueso, permiten disponer de ácidos biliares en sangre (27)(28)(29), que a través de la vena porta, alcanzan el hígado y vuelven a formar parte de la bilis.

Son el yeyuno y el íleon, las zonas donde se dan los procesos de reabsorción pasiva y activa respectivamente, mientras que a nivel del intestino grueso y concretamente en la zona del ciego, se producen fenómenos de hidrólisis y desconjugación, como consecuencia

los ácidos desoxicólico y litocólico alcanzan el colon, una vez allí pueden reabsorberse o eliminarse por heces .

La reabsorción en el íleon (25), es superior a la que sucede en el yeyuno, así como, la reabsorción del ácido desoxicólico es mayor - que la del ácido litocólico.

Este hecho tiene interés fisiológico a la hora de evitar el efecto catartico de los ácidos biliares.

En caso de la enfermedad ilíaca, la disminución de la reabsorción, supone un aumento en la concentración de éstos ácidos a nivel de colon. La presencia de grupos (OH), motiva la disminución de la - reabsorción de agua y electrolitos, cuya primera consecuencia son las múltiples diarreas (30), junto al hecho de que al disminuir el ciclo enterohepático, el colesterol no emulsificado aumenta, lo que origina la presencia de cálculos biliares.

2.2. CONCENTRACION CRITICA MICELAR : CONCEPTO Y METODOS DE ----- DETERMINACION. -----

Se conoce como concentración crítica micelar de un tensioactivo la concentración mínima a la que las moléculas se asocian en micelas.

Son las interacciones intermoleculares que se establecen entre moléculas de emulgente, las causas de la formación de diferentes agregados micelares. En ellos, los restos lipofílicos e hidrofílicos de la molécula de tensioactivo, se orientan de acuerdo a las fuerzas de Van der Waals .

Las primeras teorías sobre la formación de la micela, datan de los años treinta con Hartley y McBain(31). Actualmente diferentes técnicas, tales como: difusión de rayos X (32), microscopia electrónica(33)...etc, aportan el conocimiento de diferentes parámetros que intervienen en la formación micelar .

En el presente trabajo, se pretende emulsificar Vitamina A Palmitato en el interior de las micelas de sales biliares. Técnicas - como la ultracentrifugación (34), procesos de gel filtración (35), e incluso medidas de difusión de luz :Light Scattering (36), permiten detectar éste tipo de agregados en función de su concentración.

El interés por conocer la concentración crítica micelar se pone de manifiesto en todo proceso de emulsificación, en cuanto que la

presencia de micelas justifica la disminución de la tensión interfacial.

Los métodos mas utilizados para determinar la concentración crítica micelar son:

2.2.1. METODO TENSIOMETRICO

Las medidas de la tensión superficial de un agente tensioactivo en el seno de una disolución, así como su variación respecto a la concentración de emulgente, permiten conocer el valor de la concentración crítica micelar.

Según Gibbs, en una disolución las moléculas de emulgente se sitúan en la superficie (interfase), a concentración superior a la que tienen en el interior de la disolución.

Ese exceso de concentración superficial (γ) contribuye junto con el potencial químico (μ) de cada sustancia, a la disminución de la tensión superficial .

$$-d\gamma = \sum \gamma_i d\mu_i \quad (1)$$

El potencial químico se relaciona con la actividad termodinámica (a), a través de la expresión:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a \quad (2)$$

μ_0 = potencial químico en estado de referencia que se considera constante.

En caso de disponer de una fase acuosa con agua y emulgente (37), ambos contribuyen a la variación de la tensión superficial

$$-d\gamma = \sqrt{1} RT \ln a_1 + \sqrt{2} RT \ln a_2 \quad (3)$$

Al tratarse de una solución muy diluida en la que el porcentaje de disolvente es mucho mayor que el del emulgente, la superficie estará ocupada por éste último, lo que nos permite considerar - despreciable el término:

$$\sqrt{1} RT \ln a_1$$

y con ello, la variación de tensión superficial dependerá del emulgente exclusivamente .

$$-d\gamma = \sqrt{2} RT \ln a_2 \quad (4)$$

Así mismo, al ser muy diluida la solución; actividad termodinámica y concentración se asemejan

$$-d\gamma = \sqrt{2} RT \ln C_2 \quad (5)$$

De ésta expresión se deduce que al aumentar la concentración de tensioactivo, la tensión superficial va disminuyendo cada vez más hasta llegar a un valor concreto de concentración, en el que la - tensión permanece constante, ese valor se conoce como concentración crítica micelar (cmc). La interfase se satura y el emulgente se asocia en micelas.

Esta técnica es ampliamente utilizada (38),(39)(40), pero puede verse limitada en ciertas situaciones.

Las impurezas, son causa de la presencia de un mínimo en la gráfica: tensión superficial-concentración de emulgente. Ese mínimo;

cercano a la concentración crítica micelar, no corresponde a dicho valor, se debe a la competencia por la superficie que se establece entre las primeras micelas y las impurezas, ésto supone un retraso en la estabilización de la tensión superficial y un error al tratar de conocer el valor de la cmc.

En caso de disponer de una mezcla de emulgentes; la presencia de micelas mixtas dificulta la determinación de la concentración crítica micelar (41)(42) por ésta técnica de medida.

2.2.2. METODO DE SOLUBILIZACION

Este método se basa en el siguiente hecho experimental: La presencia de micelas en una solución acuosa de emulgente, permite la solubilización de sustancias liposolubles, motivo por el que se observa un aumento de absorbancia a partir de una concentración de emulgente; qué corresponde a la concentración crítica micelar.

Las sustancias liposolubles ensayadas suelen ser colorantes, a fin de facilitar la interpretación de los resultados por aplicación de técnicas colorimétricas.

Los primeros estudios basados en ésta técnica datan de los años cuarenta y sesenta (43). Actualmente sigue considerandose muy útil, independientemente de la naturaleza iónica o nó iónica del emulgente, e incluso en caso de disponer de micelas mixtas, ésta

técnica permite definir un valor de cmc y observar que resulta ser inferior a la concentración crítica micelar de cada emulgente por separado.(41),(42).

2.2.3.METODO CONDUCTIMETRICO

La conductividad de una solución acuosa de emulgente varia, a temperatura constante, con la concentración de agente tensioactivo. Al alcanzar la concentración crítica micelar, la presencia de micelas se manifiesta con un cambio de pendiente en la gráfica: conductividad-concentración.(44).

El estudio conductimétrico, ha permitido en muchos casos averiguar no solo el valor de la cmc (38)(39), si no que ha servido de base para profundizar en el análisis del desarrollo micelar (45),(46), (47).

2.2.4. METODO REFRACTOMETRICO

El índice de refracción, como constante física determinante de la identidad de un compuesto, resulta interesante a la hora de analizar los agregados coloidales y de forma análoga, en el estudio de la formación de micelas.

Entre los primeros trabajos, destacan los estudios debidos a -

Klevens (1948), quién determina el valor de la concentración crítica micelar por medidas de índice de refracción. Demuestra una relación lineal del índice de refracción con la concentración de emulgente (temperatura constante) y observa un cambio de pendiente que corresponde a la cmc.

2.2.5.METODO DE DIFUSION DE LUZ .LIGHT SCATTERING

La intensidad de luz difundida por una muestra depende, entre otros factores, del tamaño de la partícula sobre la que incide la radiación.

La asociación de moléculas de emulgente, suponen modificaciones estructurales, que explican pequeñas variaciones en la intensidad de la luz. Al alcanzar la concentración crítica micelar, la presencia de micelas son la causa de un aumento brusco en la intensidad de luz (48),(49) dispersada.

Las bases físicas de ésta técnica son ampliamente estudiadas por Dimiter (50) y actualmente son muchos los investigadores que la aplican a fin de conocer la concentración crítica micelar de diferentes emulgentes (38),(51),(52).

La difusión de luz resulta ser sensible a la presencia de agregados micelares de tamaño grande .

2.2.6. METODO DE ESPECTROSCOPIA U.V

Una variación en la concentración de emulgente, supone modificaciones en la longitud de onda de máxima absorción y en los valores de absorbancia obtenidos.

Existe una relación lineal: absorbancia-concentración de emulgente, de la que puede determinarse la concentración crítica micelar en el punto de intersección de las rectas obtenidas a concentración inferior y superior a la cmc.

Jaoa Pscabral (37), considera el valor de la cmc en el punto de inflexión de la curva: longitud de onda de máxima absorción -concentración.

Los espectros correspondientes a la primera y segunda derivada, aportan información sobre cambios estructurales que se suceden al modificarse la concentración de emulgente (41)(42).

2.2.7. METODO DE ESPECTROSCOPIA RMN

La estructura tridimensional de la micela es distinta de otras asociaciones moleculares debidas a variaciones en la concentración de emulgente, es por ésto que cada tipo de micela presenta un espectro RMN propio y característico .

La interpretación del espectro obtenido con diferentes concen -

traciones de tensioactivo, permiten detectar el valor de cmc (37) (46)(53)(54).

2.2.8. METODO DE OSMOMETRIA DE PRESION DE VAPOR

Existe una relación directa entre la respuesta del osmómetro y la concentración de emulgente.

De la representación gráfica: respuesta -concentración, se obtiene el valor de la concentración crítica micelar, correspondiente al punto de intersección de los tramos rectilíneos, obtenidos a concentraciones superiores e inferiores a la cmc (55).

A fin de evitar errores en el cálculo de la cmc, hay autores que aconsejan introducir ciertas consideraciones (56) en caso de disponer de tensioactivos iónicos en disolución, que puedan alejarse de la idealidad a bajas concentraciones e incluso, al detectar asociaciones moleculares a concentraciones menores a la concentración crítica micelar (55).

La osmometría de presión de vapor resulta ser sensible al número de agregados y no depende de su tamaño (56).

2.2.9. METODO DE MEDIDAS DE DENSIDAD

En el cuarto Congreso de Farmacia celebrado en 1986, se presentó un trabajo basado en medidas de densidad en soluciones acuosas de tensioactivos, a fin de conocer la concentración crítica micelar (57).

La densidad de una solución varia en función de la concentración de emulgente y se relaciona con el volumen específico parcial a través de la siguiente expresión (58)

$$x = d + (1 - \bar{V}_2 d) C$$

x=densidad de la solución

d=densidad del solvente

C=concentración de tensioactivo

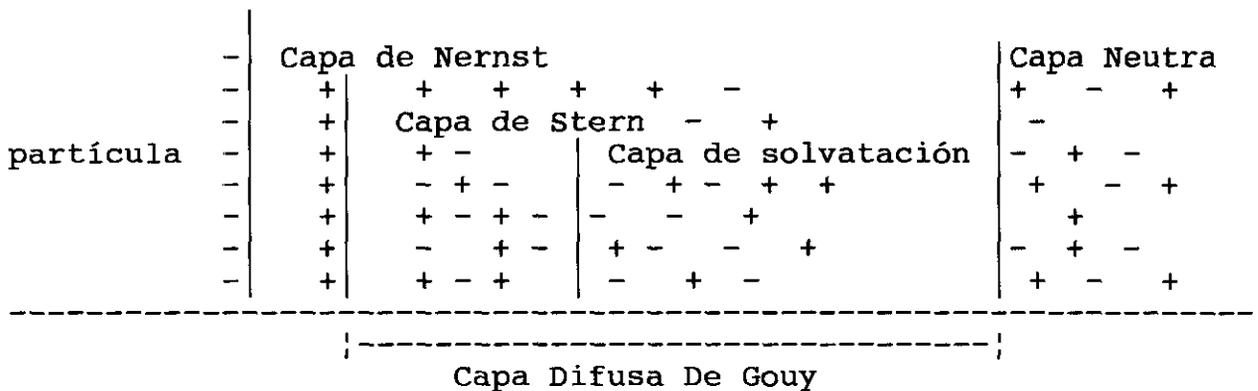
\bar{V}_2 =volumen específico parcial

La representación gráfica de la densidad frente a la concentración de emulgente, permite detectar un cambio de pendiente en la recta obtenida, que se atribuye a una modificación estructural y a la presencia de micelas.

2.3. ESTABILIDAD FISICA DEL SISTEMA EMULSIFICADO

2.3.1 TEORIA DLVO

Debido a la presencia de cargas en la partícula dispersa, cada glóbulo de fase interna queda rodeado de una doble capa eléctrica.



Desde el punto de vista electrostático, la teoría DLVO trata de explicar la estabilidad de las partículas dispersas.

La distribución de iones es la causa de una diferencia de potencial que decrece con la distancia, resulta ser máxima en la superficie de la partícula y se anula al alcanzar la neutralidad en la solución.

Cuando dos partículas se aproximan, se superponen sus capas difusas y se origina una redistribución de las cargas en cada capa. Surgen interacciones atractivas debidas a fuerzas de Van Der Waals entre los iones de signo contrario y a su vez, repulsiones entre

iones con carga del mismo signo.

Como resultado de ambas fuerzas, se crea una barrera energética que fija el grado de atracción o de repulsión.

Las expresiones matemáticas que rigen ambos tipos de potenciales son las siguientes:

$$V_r = \frac{1}{2} \epsilon_r \Psi \ln(1 + e^{-KH}) \quad \text{.....potencial de repulsión}$$

ϵ =constante dieléctrica del medio

r =radio de la partícula

Ψ =potencial de Nernst

H =distancia entre partículas

$1/K$ =espesor de la capa difusa = $\epsilon KT / 4 e^2 \Sigma (n z)^2$

K =constante de Boltzmann

T =temperatura absoluta

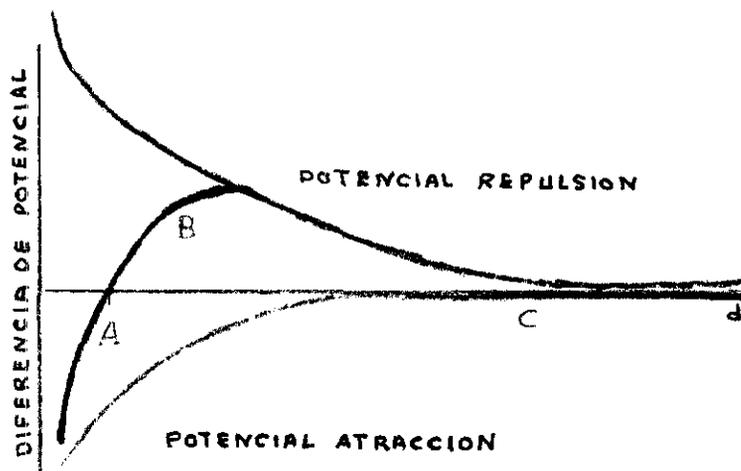
e =carga eléctrica

n =concentración de la especie iónica en la fase externa

z =valencia del ión

$$V_a = \frac{-A r}{12 H} \quad \text{.....potencial de atracción}$$

A =constante de Hamaker ($10^{-13} - 10^{-12}$ ergios)



A distancias cortas entre partículas, ambos potenciales: repulsión y atracción, son grandes, pero predomina la atracción: ZONA A. La consecuencia inmediata es la tendencia a la agregación.

La ZONA B, supone una distancia entre partículas en la que predomina el potencial de repulsión y con ello, la estabilidad del sistema.

Al aumentar la distancia entre las partículas: ZONA C, vuelve a predominar la atracción, sin embargo no son fuerzas demasiado intensas, es por ello, por lo que pueden aparecer fenómenos de floculación, pero basta una agitación para recuperar el sistema disperso.

El potencial electrostático no puede medirse directamente, el único potencial capaz de ser medido es el potencial de repulsión Zeta o potencial electrocinético, que es la diferencia de potencial entre la superficie de la partícula dispersa y la capa de iones adsorbidos

Existe una relación directa entre el potencial Zeta y la movilidad electroforética, de tal forma que dicho potencial se calculará una vez conocida la movilidad por estudios de electroforesis (59)(60).

El cálculo del potencial Zeta, es un factor a tener presente a la hora de evaluar la estabilidad física de una emulsión, factores como: pH, tamaño de partículas, viscosidad, presencia de electrolitos, suponen modificaciones del potencial Zeta que sirven de pauta en el control de estabilidad del sistema disperso (61), (62), (63).

2.3.2.FLOCULACION

Puede definirse como un proceso de agregación reversible de partículas de fase dispersa.

La velocidad de floculación sigue una cinética de segundo orden

$$V_f = K_f N^2$$

K_f =constante de velocidad de floculación

N =concentración de partículas de fase interna

Todo factor que favorezca la colisión entre gotículas es causa de un aumento en el valor de K_f ; es por ello, por lo que se deduce que un aumento de viscosidad al igual que un descenso de temperatura, contribuyen a disminuir la floculación al aumentar el potencial de superficie de repulsión.

La presencia de electrolitos, favorece la floculación, tanto mas a medida que aumenta su concentración (64)(65).

2.3.3.COALESCENCIA

Es un fenómeno de agregación irreversible de partículas de fase interna.

Su velocidad se ajusta a una cinética de orden uno, puesto que - depende de la concentración de glóbulos de fase interna

$$V_c = K_c M$$

Resulta ser la temperatura, el factor mas importante a la hora de controlar la coalescencia; interesan bajas temperaturas a fin de disminuir la energia térmica.

2.3.4.CREMA.SEDIMENTACION INVERSA

Se considera un proceso de inestabilidad en el grado de dispersión, en base a lo cuál y de acuerdo a la ley de Stokes, las partículas mas grandes sedimentan mas rapidamente que las pequeñas. Es la diferencia de densidades entre las dos fases: continua y - dispersa, la causa de que éste fenómeno tenga lugar.

La presencia de crema y suero, no supone en un principio ruptura de la emulsión, sin embargo durante el almacenamiento, se ven favorecidos procesos de floculación e incluso coalescencia.

2.3.5. DIFUSION MOLECULAR

Es posible que entre los componentes de una emulsión exista un cierto grado de miscibilidad, en ese caso existe transferencia de moléculas entre gotas dispersas.

Según el efecto Kelvin, la materia se transfiere de los glóbulos pequeños a los grandes, lo que origina una disminución en el número de glóbulos de fase interna y un aumento en el tamaño de éstos, cuya consecuencia es la inestabilidad del sistema (66).

2.3.6. FACTORES QUE CONTRIBUYEN A LA ESTABILIDAD DE UNA EMULSION

Todos éstos fenómenos que desencadenan la inestabilidad física del sistema emulsificado (67), están justificados desde el punto de vista termodinámico.

La emulsificación supone un aumento en el área interfacial respecto al área de contacto que presentan las fases sin emulsificar, esto explica un aumento en la energía libre total del sistema y por ello, la tendencia termodinámica a la separación de fases .

El agente emulgente al incorporarse en la interfase aceite-agua ,

reduce la tensión interfacial y con ello la energía libre superficial.

Se ha podido observar qué en caso de emulsiones de fase externa acuosa, los tensoactivos iónicos colaboran en su estabilidad al

contribuir en la disminución de la constante de floculación . La orientación de los grupos polares y su disociación, favorecen un potencial de repulsión.

Este fenómeno no se observa ni con tensioactivos nó iónicos ni en caso de emulsiones de fase externa oleosa.

La agitación suministra energía mecánica, capaz de reducir el tamaño de glóbulos de fase interna y compensar la espontanea tendencia a reducir la energía libre de la emulsión.

La presencia de macromoléculas, puede considerarse un factor importante a la hora de estabilizar la emulsión. Sustancias tipo: goma arábica, gelatina, metilcelulosa, alginato sódico, propilén-glicol, permiten la formación de una película multicapa con propiedades visco-elásticas que rodea la gotícula oleosa y con ello se impide la coalescencia.

A ésta acción, le suma el efecto viscosizante mas o menos acusado de éstas sustancias, lo que origina una menor velocidad de sedimentación y por ello una mayor estabilidad física.

El control de temperatura es un factor imprescindible, no solo con el fin de aumentar la estabilidad física del sistema emulsificado, si no para evitar una posible inversión de fases.

En una emulsión de fase externa acuosa, un aumento de temperatura por encima de la temperatura de inversión de fases del emulgente

utilizado (PIT), produce modificaciones en la fuerza de hidratación del agente tensioactivo y se modifica el valor del HLB. Aumenta el caracter lipofílico y la interfase cambia de concavidad, todo esto motiva un cambio de signo en la emulsión resultante.

En una emulsión O/A, el emulgente deberá tener una PIT superior al de la temperatura de formación del sistema emulsificado.

En cualquier caso, una disminución de la temperatura durante el almacenamiento de una emulsión, mejora su estabilidad en cuanto que frena el movimiento browniano de las partículas que la componen (68).

A la hora de controlar el signo de la emulsión que se pretende obtener, otro factor a tener presente es la proporción de fases. Desde el punto de vista geométrico, Ostwald consideró que el máximo volumen que puede interponerse; aceptando gotículas esféricas, es de un 74.02 % pero, debido a posibles presiones las gotículas se deforman y en los intersticios libres se acomodan otras menores, es por ello por lo que la proporción de fase dispersa puede ser superior al 74%.

Según el tipo de fase oleosa, existe un límite crítico de la fase acuosa (CLWP), esto es: el porcentaje de fase acuosa que puede actuar como fase dispersa.

Una emulsión tipo A/O supone :

fase acuosamáximo	25%
fase oleosamínimo	75%

Una emulsión tipo O/A supone :

fase acuosamínimo 49.25%
fase oleosamáximo 50.75%

2.3.7. ESTUDIO GRANULOMETRICO

El análisis del tamaño de glóbulo de la fase interna, así como su evolución a lo largo del periodo de almacenamiento, permiten evaluar la estabilidad física de un sistema emulsificado.

El aspecto que presenta la emulsión está relacionado con el tamaño de glóbulo de fase interna

tamaños >1 micrómetro.....	blanco lechoso
" 1-0.1 "blanco azulado
" 0.05-0.1 "gris semitransparente (emulsiones finas)
" < 0.05 "transparente (microemulsiones)

La estabilidad termodinámica de las microemulsiones, se atribuye a un tamaño de partícula del orden del nanómetro; lo suficientemente pequeño como para que el sistema presente un alto valor de entropía que justifica su estabilidad.

En la etapa de emulsificación los factores con mayor influencia en la granulometría final son: el sistema, la intensidad y la du-

ración del proceso de agitación, además de la temperatura, que es el factor mas importante durante el almacenamiento del sistema emulsificado.

En la etapa de homogeneización no basta con el convencional molino coloidal, debido a que se obtienen muestras polidispersas e interesa no solo reducir el diámetro del glóbulo si no llegar a la mayor homogeneidad posible.

En algunas ocasiones, se ha podido comprobar que es mas conveniente llevar a cabo una preagitación, como fase previa, con un agitador eléctrico y posteriormente una homogeneización .(69).

Con homogeneizadores mecánicos, la granulometria depende de las revoluciones utilizadas, tiempo y número de veces que se repite la agitación.

La utilización del ultrasonidos en la preparación de la emulsión, (70) (71),(72), ha sido estudiada a fin de comparar la granulometria obtenida por ésta y otras técnicas .

Estos mismos autores confirman una polidispersión en el tamaño de glóbulos y comprueban la influencia no solo del número de veces , si no también del tiempo y tipo de vibraciones ultrasónicas a las que se somete la muestra a emulsificar.

Durante el almacenamiento, se ha de mantener el sistema emulsificado a temperaturas bajas, a fin de evitar aporte energético que favorezca la agregación de las partículas y pueda ser desencade -

nante de procesos de floculación e incluso coalescencia; fenómenos que serian causa de una reducción en el número de glóbulos y aumento en el diámetro medio.

El estudio granulométrico tiene interés no solo a la hora de evaluar la estabilidad física del sistema emulsificado, si no por su influencia en la biodisponibilidad de la formulación.

Una reducción en el tamaño de glóbulo supone una mayor superficie específica, lo que justifica una mejor absorción del principio activo. Por otro lado, se ha podido comprobar la influencia del tamaño de glóbulo en la distribución del medicamento en el organismo (73) (74) .

El interés se acentua en caso de emulsiones para administración parenteral. Partículas con diámetro superior a 5 μm , nó pueden ser admitidas clínicamente debido a la posibilidad de producir embolia pulmonar (75). Al inyectar emulsiones por via intravenosa e intraarterial, se observa como en función del tamaño y carga eléctrica del glóbulo, los macrófagos del sistema retículo endotelial se fijan a las partículas con mayor o menor intensidad.

Las emulsiones groseras (3-10 μm), quedan retenidas en el SRE en un 97% (su retención en el pulmón es de un 45%). Las emulsiones finas (1 -3 μm), se distribuyen en un 88% (en el pulmón 16%). En caso de emulsiones ultrafinas (0.7 μm), solo un 11% queda retenido en el sistema retículo endotelial (74).

De todo ello se deduce un menor grado de toxicidad y mayor eficacia al disminuir el tamaño de glóbulo de fase interna .

En caso de emulsiones utilizadas como medios de contraste en tomografía axial computerizada, se requieren tamaños entre 10 nm - 1 μ m.

Breve revisión de algunas técnicas aplicadas al estudio granulométrico .

La Espectroscopia de Correlación Fotónica, conocida también como Difusión de Luz Cuasielástica (Quasielastic Light Scattering), - permite la determinación de un amplio margen de tamaño, desde 10 Å a varias micras, lo que la hace útil en caso del análisis de macromoléculas, coloides, micelas (76), microemulsiones(77), emulsiones intravenosas (78),(79), asociaciones de fármacos(80). Se basa en la fluctuación de la radiación dispersada por las partículas, al incidir sobre la muestra una radiación electromagnética.

Como resultado de la interacción: materia -energía, cada partícula se convierte en un centro dispersor y de acuerdo a su tamaño y a la longitud de onda de la radiación incidente, se producirá una dispersión isotrópica o anisotrópica.

La intensidad de la radiación dispersada es el resultado de las interferencias existentes entre las partículas. Se observa un centelleo: alternancia entre oscuridad y luminosidad como consecuencia de interferencias destructivas y constructivas respectivamente

(81).

El tiempo que se precisa para pasar de un tipo a otro de interferencia, depende del coeficiente de difusión de las partículas, lo que a su vez se relaciona con el tamaño .

En emulsiones, al tratarse de partículas esféricas, el coeficiente de difusión viene dado por la ley de Stokes-Einstein .

$$D = \frac{K_b T}{6 \eta R_h}$$

K_b =cte de Boltzmann

T

=temperatura absoluta

R_h =radio hidrodinámico de la partícula

η

=viscosidad

Los equipos disponen de una fuente de radiación laser:(He -Ne fundamentalmente, aunque puede emplearse Argón o Kriptón)(82),(83),- un goniómetro (como medidor del ángulo de trabajo), una célula - para muestra, un detector o fotomultiplicador que va unido a un contador electrónico de fotones y un correlador (ordenador para - procesar la señal).

La medida de las fluctuaciones de la intensidad, se realiza por una función de autocorrelación.

Se trata de un método matemático a fin de extraer los valores de una determinada característica física que varia con el tiempo.

Al aumentar el tiempo, la correlación entre una señal y la producida en un tiempo posterior va disminuyendo de forma tal, que el

tiempo de caída de la función de correlación está relacionado con el coeficiente de difusión.

En una muestra monodispersa, la función de correlación es exponencial, mientras que muestras polidispersas se ajustan a funciones de segundo orden o polinomiales .

El Coulter se basa en el fenómeno de difracción de la radiación - emitida por un rayo laser.

El ángulo de difracción varia de acuerdo con tamaño de las partículas .Partículas menores, suponen mayores ángulos difractados . Esta tecnología permite medir en el rango desde 0.1-800 micrómetros, según la longitud de onda de la radiación incidente y el uso o nó de detectores multiángulo.

El principio del Tiempo de Transición, se utiliza en analizadores de partículas, a fin de determinar su granulometria.

Se basa en examinar un rayo laser rotatorio, que incide en una zona de medida a una frecuencia determinada.

El rayo enfocado al interactuar con las partículas produce unos - pulsos de interacción que son detectados por un fotodiodo. La anchura del pulso representa el tiempo de interacción, la altura, la reducción de la intensidad de luz detectada a causa de la oscuridad del haz de rayos por la presencia de la partícula.

La información sobre el tamaño, viene dado por la medida del tiempo de interacción, que a su vez es independiente del índice de re-

fracción de la partícula y de la atenuación de la fase continua

Partículas cuyo tamaño está comprendido entre 1 micrómetro a 100 micrómetros, pueden ser analizadas por el microscopio óptico, e incluso por estudios de velocidad de sedimentación.(84),(85).

La ultracentrifugación y la utilización del microscopio electrónico, ermiten el análisis de partículas del orden de angström. La tamización, resulta util en caso de partículas con tamaño superior a 10 micrómetros.

Los estudios granulométricos tienen como finalidad, no solo determinar el tamaño de la partícula, si no que a su vez, pretenden dar una idea lo mas completa posible de la distribución de esos tamaños (86)(87)(88)(89).

El tamaño de la partícula se expresa en términos de diámetro. En partículas nó esféricas, en las que hay que considerar un cierto grado de asimetría, no puede hablarse de un único diámetro, si no mas bién de un Diámetro Equivalente Esférico, en el que se relaciona el tamaño de la partícula con el diámetro de una esfera . Estos diámetros equivalentes esféricos, varían según el parámetro a analizar:

D_s = DIAMETRO DE SUPERFICIE :diámetro de una esfera que tiene igual area superficial que la partícula a analizar

D_v = DIAMETRO DE VOLUMEN :diámetro de una esfera que tiene igual volumen que la partícula a analizar

En una muestra polidispersa, se habla de diámetro medio de partícula.

En caso de disponer de una distribución normal, ese diámetro será un diámetro medio aritmético. Una distribución logarítmica normal, se expresa en forma de diámetro medio geométrico.

La ecuación de Edmundson, expresa el diámetro medio

$$D \text{ medio} = \left(\frac{\sum n d^{p+f}}{\sum n d^f} \right)^{1/p}$$

n=número de partículas

d=diámetro equivalente a estudiar

p=índice relacionado con la dimensión de la partícula a analizar

p=1	longitud
p=2	superficie
p=3	volumen

y a su vez, expresa el tipo de diámetro con el que se trabaja

p>0	aritmético
p=0	geométrico
p<0	armónico

f=índice de frecuencia

f=0	la distribución se expresa en número
f=1	la distribución se expresa en longitud
f=2	la distribución se expresa en superficie
f=3	la distribución se expresa en volumen

De acuerdo con esto, los diámetros estadísticos mas comunes son:

$d_{ln} = \Sigma nd / \Sigma n$	$p > 0$	$p = 1$	$f = 0$
$d_{sn} = \sqrt{\Sigma nd^2} / \sqrt{\Sigma n}$	$p > 0$	$p = 2$	$f = 0$
$d_{vs} = \sqrt[3]{\Sigma nd^3} / \sqrt[3]{\Sigma n}$	$p > 0$	$p = 3$	$f = 0$
$d_{sl} = \Sigma nd^2 / \Sigma nd$	$p > 0$	$p = 1$	$f = 1$
$d_{vs} = \Sigma nd^3 / \Sigma nd^2$	$p > 0$	$p = 1$	$f = 2$
$d_{wm} = \Sigma nd^4 / \Sigma nd^3$	$p > 0$	$p = 1$	$f = 3$

La representación logarítmica del tamaño de partícula frente a la distribución de frecuencias acumuladas, permite observar una relación lineal, de la que se conoce: el diámetro medio geométrico y su desviación standar.

El diámetro correspondiente al 50% de probabilidad, representa el diámetro medio geométrico.

La desviación standar viene dada por el cociente de diámetros - correspondientes al 50% y 16% de probabilidad de frecuencias; en caso de considerarse una curva de distribución de frecuencias acumulativas "underside". El cociente de diámetros correspondientes al 50% y 84%, en caso de una distribución "overside".

Conocido el diámetro geométrico y su desviación standar, pueden

conocerse los diámetros medios: (dln, dsn, dvn, dvs, dwm) correspondientes a una distribución en número, a partir de ellos, se podrá calcular el diámetro medio geométrico correspondiente a una distribución en peso, tras aplicar las ecuaciones de Hatch-Choate (85).

DIAMETRO MEDIO	DISTRIBUCION EN NUMERO	DISTRIBUCION EN PESO
dln	$\log dln = \log dg + 1,151 \log^2 \sigma g$	$\log dln = \log dg' - 5,757 \log^2 \sigma g$
dsn	$\log dsn = \log dg + 2,303 \log^2 \sigma g$	$\log dsn = \log dg' - 4,606 \log^2 \sigma g$
dvn	$\log dvn = \log dg + 3,454 \log^2 \sigma g$	$\log dvn = \log dg' - 3,454 \log^2 \sigma g$
dvs	$\log dvs = \log dg + 5,757 \log^2 \sigma g$	$\log dvs = \log dg' - 1,151 \log^2 \sigma g$
dwm	$\log dwm = \log dg + 8,059 \log^2 \sigma g$	$\log dwm = \log dg' - 1,151 \log^2 \sigma g$

De todos éstos diámetros, es el diametro volumen-superficie el de mayor interés desde el punto de vista farmacéutico, puesto que su inverso se relaciona con la superficie específica y por ello, con la biodisponibilidad del principio activo .

2.3.8. VISCOSIDAD

El estudio reológico y con ello, el control de la viscosidad de un sistema emulsificado, tiene interés no solo desde el punto de vista de su estabilidad física(90), si no por la posible contri-

bución al efecto biológico (91).

Un aumento en la viscosidad del sistema contribuye a una menor - velocidad de sedimentación y a su vez, dificulta la floculación y coalescencia entre glóbulos de fase externa .

La reología estudia las propiedades de flujo que adquiere una e - mulsión tras someterla a la acción de una fuerza de cizalla.

El distinto comportamiento ante esa fuerza de deformación, permi - te clasificar los fluidos en Newtonianos y nó Newtonianos (92) (93)(94).

Una relación lineal entre la fuerza de cizalla y la velocidad de deformación, permite definir un fluido Newtoniano como aquél en el que la viscosidad es constante.

La nó linealidad aporta caracter nó Newtoniano .

A su vez, los fluidos no Newtonianos, pueden subdividirse en: - pseudoplásticos, plásticos y dilatantes.

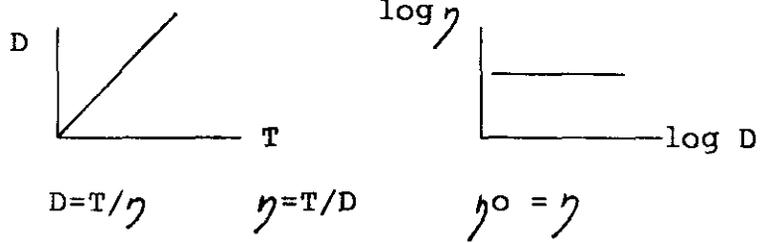
Un aumento en la fuerza de cizalla, supone una disminución de la - viscosidad en un fluido pseudoplástico, a diferencia del aumento de viscosidad que caracteriza a un fluido dilatante.

En caso de un fluido plástico, es necesario aplicar una tensión de empuje mínima a fin de provocar el flujo. Ese valor de ruptura, se conoce como umbral de flujo.

Un cuerpo plástico puede comportarse como un fluido Bingham o - Casson, según sea constante o nó la relación entre la velocidad de deformación y la fuerza aplicada a partir del punto de ruptura.

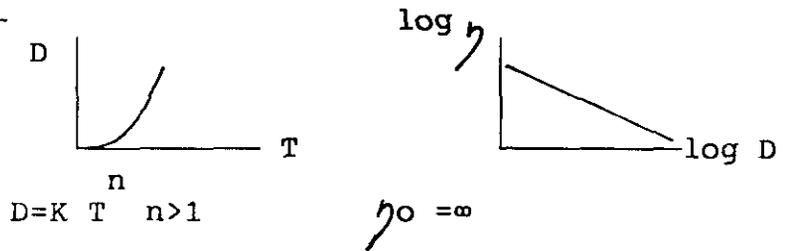
A continuación se muestran las expresiones matemáticas que representan los distintos tipos de flujo.

FLUIDO NEWTONIANO.



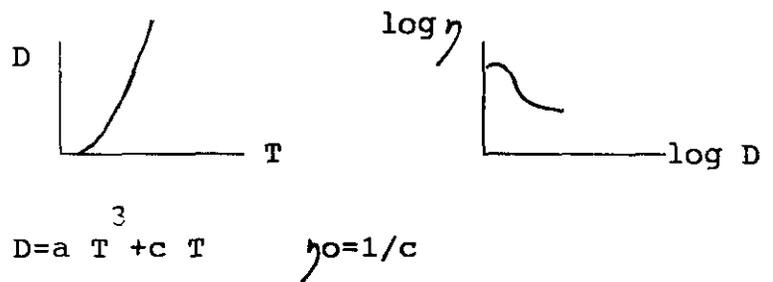
FLUIDO PSEUDO-PLASTICO

OSWALD



FLUIDO PSEUDO-PLASTICO

STEIGER/ORY



un valor $\phi_m=0,6$; como máxima fracción a la que el sistema todavía fluye.

La viscosidad intrínseca es directamente proporcional al espesor de la capa de tensoactivo que rodea el glóbulo(δ), e inversamente proporcional al radio (a)

$$[\eta] = 2.5 \left(1 + \frac{\delta}{a}\right)^3$$

La presencia de una doble capa eléctrica deformable por la acción de la fuerza de cizalla, justifica la existencia de carga en la superficie de la partícula y con ello el aumento de la viscosidad intrínseca.

La influencia del tamaño de glóbulo, es tanto mayor cuanto mayor es el grado de dispersión de las partículas .

La polidispersidad de tamaños, supone una mayor densidad de empaquetamiento. Las partículas pequeñas, pueden ocupar los huecos entre partículas grandes y con ello, se explica el descenso en el valor de viscosidad.

La ecuación de Maron y Pierce, relaciona la forma de la partícula (A), con el valor de viscosidad intrínseca (99).

$$\eta_r = 1 / (1 - \phi/A)^2$$

En caso de esferas $A=0,68$

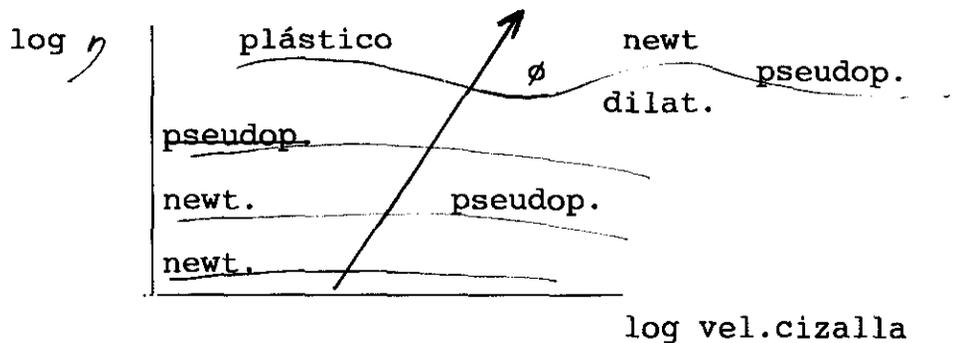
Un aumento en la fracción volumétrica, puede suponer un cambio en el comportamiento reológico y el fluido puede pasar de ser Newtoniano a ser no Newtoniano, observandose una dependencia con la -

concentración y la velocidad de cizalla .

A concentraciones altas y velocidades de cizalla no muy elevadas, el fluido presenta comportamiento plástico, en el que la viscosidad es inversamente proporcional a la velocidad de cizalla (100). A partir de una concentración crítica, que en caso de partículas esféricas es aproximadamente un 40%, aparece un comportamiento dilatante, que se hace mas pronunciado al aumentar la concentración.

A altas concentraciones y velocidades de cizalla, el caracter dilatante desaparece, presentandose comportamientos pseudoplásticos e incluso newtonianos.

La pseudoplasticidad se manifiesta con fracciones volumétricas no muy grandes y crecientes velocidades de cizalla.



En caso de emulsiones concentradas, puede observarse un aumento en la viscosidad relativa al aumentar la concentración, lo que se acompaña de cambios en el comportamiento reológico. El flujo pasa de ser newtoniano a pseudoplástico, para posteriormente adquirir pro-

piedades plásticas e incluso de viscoelasticidad .

La viscosidad continua aumentando hasta alcanzar un valor máximo , a partir del cual, sufre un descenso rápido, la explicación se debe a fenómenos de inversión de fase.

La floculación, como proceso previo a la posible ruptura de la emulsión, afecta a las propiedades reológicas. Los agregados resultantes, inmovilizan la fase continua en los huecos entre gotículas y con ello aumenta la viscosidad.

En caso de observarse problemas de floculación y a fin de evitar éstos resultados erróneos, es más exacto someter al sistema durante un cierto tiempo a una determinada velocidad de cizalla capaz de romper los posibles flóculos .

De todo esto, se comprende la importancia del estudio de viscosidad a la hora de analizar el sistema físico emulsificado, así como su relación con la composición química de las fases (101).

3.LIOFILIZACION DE EMULSIONES

La liofilización es un proceso tecnológico ampliamente utilizado en la industria farmacéutica a fin de disponer no solo de un medio de conservación, si no también como fase intermedia en la obtención de ciertas formas farmacéuticas: nanoesferas, microcápsulas (102).

La aplicación de ésta técnica en el campo de las emulsiones, pretende evitar la inestabilidad termodinámica de un sistema emulsificado

El interés por sus aplicaciones, justifica el profundo estudio de todos aquellos factores que afectan a cada una de las fases del proceso de liofilización (103),(104).

El producto liofilizado, presenta propiedades fisico-químicas diferentes a las del sistema sin liofilizar.

-La masa sólida liofilizada presenta gran afinidad por el agua La mayor o menor tendencia a captar la humedad, depende del soporte empleado durante el proceso de liofilización. Al utilizar sustancias cristalinas tipo: manitol, glicina, urea.etc, se observa una menor capacidad de captación de agua, comparada con la que se detecta al disponer de soportes coloidales: alginato sódico, polivinilpirrolidona. etc

-La regeneración del sólido liofilizado supone:

-Aumento de pH por pérdida de CO_2

-Modificaciones en la viscosidad del sistema emulsificado que dependen entre otras variables del agente viscosizante utilizado.

Con carboximetilcelulosa sódica o alginato sódico, la viscosidad disminuye, a diferencia del aumento que se observa al trabajar con goma tragacanto, pectina, o goma arábiga.

-Mayor tendencia a la formación de crema

La calidad de un producto liofilizado, no solo depende del control de cada etapa del proceso de liofilización, si no también de la composición cualitativa y cuantitativa de la formulación.

- Porcentaje de fase oleosa

Con un 5-10% de fase oleosa se consiguen liofilizados de aspecto pulverulento.

La masa liofilizada adquiere textura grasa con porcentajes mayores al 15% .

Porcentajes superiores al 25% de la fase oleosa, impiden llegar a un liofilizado con caracteres morfológicos aceptables.

- Presencia de sustancias de carga

Se trata de soportes de diversa naturaleza química: manitol, glu-

cosa, sorbitol, maltosa, lactosa, dextrano, glicina, que desempeñan un efecto protector(105), consistente en una menor variación de la granulometria al descongelar la emulsión congelada.

La mayor o menor efectividad de éstas sustancias depende:

a/Duración de la fase de congelación. Al aumentar el tiempo de congelación, el efecto protector disminuye.

b/Granulometria de la emulsión sin liofilizar. Estas sustancias son mas efectivas en emulsiones ultrafinas: (diámetro de glóbulo de fase interna ϕ menor de 0.3 micrómetro), que en emulsiones groseras ($\phi \approx 3$ micrómetros) y emulsiones finas ($\phi \approx 1$ micrómetro).

c/Tipo de congelación utilizado.(106). En una congelación ultralenta, la protección es mayor que en caso de una congelación semirápida y ultrarápida.

El interés por controlar la fase de congelación durante el proceso de liofilización se debe a:

1/La temperatura de congelación no solo influye en el tamaño del cristal si no también en el número de cristales obtenidos .

2/El modo de congelación en cada momento depende no solo de la granulometria inicial si no también del porcentaje de fase oleosa de que se disponga.

Una congelación semirápida, supone descender la temperatura de la

muestra desde 0°C hasta -30°C, como consecuencia, la velocidad de nucleación no es elevada y se obtienen pocos cristales de gran tamaño.

En una congelación ultrarápida, la muestra se congela desde -30°C hasta -130°C, en éste caso la velocidad de nucleación es mayor y se llegan a formar muchos cristales de pequeño tamaño.

La congelación ultralenta se consigue a temperaturas de -30°C, utilizando el fenómeno de subfusión. Este último proceso de congelación, permite la formación de muchos cristales de pequeño tamaño y con ello, se respeta la homogeneidad de la muestra.

Con respecto al modo mas idóneo de llevar a cabo el proceso de congelación, éstos mismos autores consideran que la congelación ultralenta, solo puede aplicarse al caso de emulsiones ultrafinas y puede observarse un aumento en la granulometria final al aumentar el porcentaje de fase oleosa.

Las congelaciones semirápidas y ultrarápidas, pueden aplicarse a cualquier tipo de emulsión (grosera, fina ultrafina), pero se detecta un aumento de granulometria final, tanto mayor a medida que disminuye la granulometria inicial (emulsión ultrafina) y aumenta el porcentaje de fase oleosa.(107).

Otro aspecto a tener en cuenta a la hora de evaluar la calidad de un liofilizado se relaciona con la facilidad de transferencia de masa, ésto es: la posibilidad de salida del vapor de agua sublimada.

Esta transferencia se ve afectada no solo por el vacío aplicado - durante la sublimación, si no también por otros muchos factores tales como la distancia interparticular (108).

La expresión matemática que rige el proceso es la siguiente:

$$X = \left[\left(\frac{A}{a} \right)^{1/3} - 1 \right] d$$

d=diámetro de glóbulos de fase interna

a=% fase oleosa

A=tipo de empaquetamiento

X=distancia interparticular

Interesa trabajar con distancias interparticulares lo suficientemente grandes como para que se vea favorecida la salida del vapor, lo que supone disponer de porcentajes pequeños de fase oleosa.

Esta fórmula admite una distribución granulométrica monodimensional, en la que el diámetro de glóbulos es constante, de aquí que su uso quede restringido a emulsiones monodispersas.

Por otro lado, los valores calculados de distancia interparticular no son totalmente representativos de los resultados reales, puesto que como ya se ha comentado, la congelación modifica la granulometría.

A pesar de éstas consideraciones, la fórmula es muy útil para analizar la influencia de algunos factores en la calidad del liofilizado.

Estos mismos autores (109), adoptan un modelo de bolas de vidrio para estudiar el fenómeno de transferencia de masa, simulan diferente granulometria con el uso de bolas de distinto diámetro.

Relacionan la cinética y el tiempo de sublimación, con la mayor o menor facilidad de pérdida del vapor de agua, lo que consideran - relacionado con la cantidad de agua sublimada en cada momento, la temperatura de sublimación, el tiempo transcurrido y la porosidad del material (110).

Establecen una relación entre la porosidad de la masa a sublimar (P) y su granulometria(d), a través de una constante que depende del tipo de empaquetamiento.

$$P=0.705 d$$

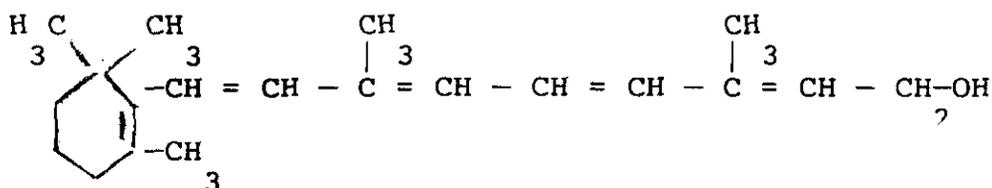
Un aumento de porosidad, disminuye el tiempo de sublimación por favorecer la transferencia de vapor, lo que se traduce en un mejor aspecto del liofilizado.

De todo ésto se deduce que un estudio detallado de las fases en el proceso de liofilización, permite controlar la granulometria de la emulsión, a fin de que se modifique lo menos posible durante la - fase de congelación, factor que se hace imprescindible a la hora de asegurarnos una mejor biodisponibilidad del principio activo (111)

4. ESTUDIO DEL PRINCIPIO ACTIVO

4.1. ESTRUCTURA QUIMICA. PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

La vitamina A1 :Retinol, presenta en su estructura química una serie de dobles enlaces conjugados. La presencia de numerosos isómeros geométricos se justifica debido a las posibles configuraciones cis-trans de la cadena lateral.



Modificaciones estructurales, sin que con ello se destruya su actividad biológica, permiten disponer de derivados de vitamina A . El resto alcohol, se oxida parcialmente a la forma aldehído:Retinal. Una oxidación total origina Acido Retinoico, de cuya esterificación se obtienen: Palmitato y Acetato de vitamina A como formas vitamínicas de mayor estabilidad .

La estructura anular del retinol: Betadiona(común en todos ellos), e incluso el anillo 3-dehidro betadiona, son esenciales para justificar la actividad vitamínica. Los cambios estructurales causan una acción y potencia biológica diferente.

Una mayor actividad biológica "in vivo"(112), se observa con los isómeros "trans" de las formas alcohol y aldehído, pero son -

muchos los factores que contribuyen a la pérdida de riqueza vitamínica, los mas considerables son los siguientes:

-Todos los derivados de vitamina A sufren degradación en presencia de luz, fundamentalmente radiación ultravioleta(113),(114), (115) (116).

-El oxígeno y los peróxidos, producen reacciones de oxidación (117).

-Las trazas de metales catalizan su descomposición

-El pH ácido es causa de isomerización a las formas "cis", con la consiguiente pérdida de actividad .

La esterificación permite disponer de estructuras con mayor estabilidad química y en cuya degradación, se identifican: retinol y Anhidrovitamina .

De forma general son: la esterificación, los antioxidantes, la atmósfera de nitrógeno, la ausencia de luz y los medios oleosos; los factores que hay que tener presente a la hora de controlar y favorecer la estabilidad de éstos derivados vitamínicos.

Se trata de una vitamina liposoluble, miscible con disolventes orgánicos: cloroformo, isoprpanol, eter sulfúrico, eter de petroleo, metanol.

Los análisis espectrofotométricos, permiten diferenciar isómeros por su diferente longitud de onda de máxima absorción(118), así como la fluorescencia verde clara, típica de la forma palmítato,

verde azulada en el derivado acetato, distinguen éstos compuestos del propio retinol, en el que la fluorescencia adquiere tonalidades verdes oscura.

4.2 FARMACOCINETICA

4.2.1.ABSORCION

Las células de la mucosa del intestino delgado, permiten la absorción de los β - carotenos (procedentes de las plantas), a través de un proceso dependiente de las sales biliares, sin embargo, los ésteres de retinol (procedentes de los tejidos animales), sufren hidrólisis en el duodeno, por la acción de una hidrolasa presente en el jugo pancreático o en las vellosidades de las células en cepillo de la mucosa intestinal.

La hidrólisis se favorece con la presencia de sales biliares, lecitina y vitamina E. El retinol así formado, es capaz de absorberse por las células de la mucosa del intestino delgado, proceso en el que influyen varios factores:

-La cantidad ingerida: solo se absorbe un poco mas de lo que se necesita, una ingesta excesiva supone una eliminación de la vitamina en heces.

-El contenido lipídico: la presencia de bilis y la dieta proteica, favorecen la absorción, mientras que: patologías hepáticas,

infecciones intestinales o fibrosis quística, son causa de una mala absorción.

Tras absorberse los β -carotenos, son oxidados por un sistema enzimático: β -carotenos 15,15'-dioxigenasa y se obtienen dos moléculas de retinal, sobre las que actúan dos sistemas enzimáticos: por un lado, retinol-dehidrogenasa, que reduce el aldehído a alcohol y oxigenasas que lo oxidan a ácido retinoico.

Otra fuente de ácido retinoico en esta zona, procede del derivado glucoronado a través de la circulación enterohepática .

En las células de la mucosa intestinal, parte del retinol es fosforilado e interviene en la síntesis de mucopolisacáridos, pero la mayor parte del retinol se esterifica por un sistema enzimático: acil-CoA retinol acil-transferasa (ARAT), (119). Los ácidos grasos que intervienen (fundamentalmente: palmitoil CoA), son saturados, de cadena larga y previamente activados.

4.2.2.DISTRIBUCION

Los ésteres así formados, se incorporan a quilomicrones sintetizados en el propio intestino y tras reconocer los receptores específicos de la apoproteína E , son captados por las células parenquimatosas hepáticas.

Los ésters de retinol acumulados en el hígado constituyen hasta un 90% de todos los retinoides del organismo (120).

En éstas células ,los ésteres sufren procesos hidrolíticos por la acción de: hidrolasas y posteriores esterificaciones a través del mismo enzima: retinol aciltransferasa (ARAT).

Estos ésteres pueden acumularse en forma de vesículas lipídicas o alcanzar otro tipo de células: Ito, lipocitos, ó células estrelladas, situadas en los espacios perisinusoidales, las cuales están especializadas para el acúmulo de retinoides. No se conoce con exactitud el mecanismo que interviene, pero se admite que es imprescindible la previa hidrólisis del ester a la forma de retinol libre.

Se dice que un 70%-80% de la masa lipídica de éstas células estrelladas corresponden a ésteres de retinol y triglicéridos (121). (122), aunque dicho contenido depende de la dieta.

En éstas células existe enzimas del tipo: retinol - palmitato hidrolasa y ARAT, que originan los procesos de hidrólisis y reesterificación.

Es la forma de retinol libre la que sale a circulación sanguínea asociada a una proteína plasmática: RBP (proteína plasmática que enlaza retinol), sintetizada fundamentalmente en las células parenquimatosas (123). Se trata de una proteína formada por una sola cadena polipéptidica de unos 21000 daltons de peso molecular y con un solo sitio de unión a la molécula de retinol. Las concen-

traciones plasmáticas de RBP dependen no solo del estado nutricional del individuo, si no también de ciertas patologías

-Una deficiencia prolongada de vitamina A, se traduce en una disminución de los niveles plasmáticos de RBP, puesto que a pesar de que se continúa su síntesis a nivel hepático, su secreción está bloqueada por falta de retinol libre.

-Enfermedades: kwashiorkor (enfermedad parenquimatosa hepática), situaciones de fibrosis quística, proteinuria, infecciones febriles, estrés, causan concentraciones plasmáticas insuficientes de RBP, lo que origina niveles plasmáticos de retinol muy bajos, a pesar de que existen reservas normales en el hígado .

La síntesis y liberación de RBP puede verse aumentada con la administración de estrógenos y anticonceptivos orales.

Al complejo formado: vitamina A-RBP, se le asocia en proporción 1:1 otra proteína plasmática, prealbúmina; llamada Transretina (TTR). Se trata de un tetrámero simétrico compuesto por subunidades de igual peso molecular 54980 daltons.

No es el hígado el único lugar de síntesis de estas proteínas. Se ha detectado mRNA del RBP en otros tejidos extrahepáticos: riñón, pulmón, bazo, cerebro, estómago, corazón y músculo esquelético. A su vez, el mRNA de RBP y TTR se ha demostrado en la placenta, lo que explica el control de transporte y reciclaje del retinol entre los tejidos y el feto.

A fin de que la RBP transporte el retinol hepático al resto de células y tejidos del organismo, se comprende la necesidad de receptores específicos para la RBP en éstas células.

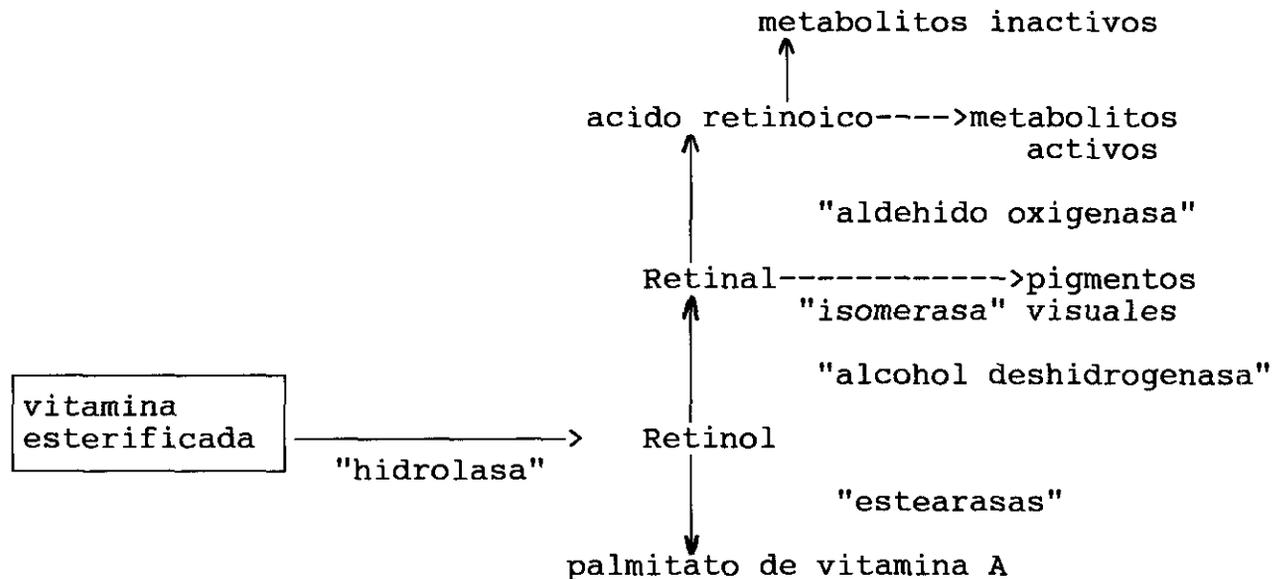
Una vez que el retinol se ha incorporado, la proteína RBP queda libre, retornando a la circulación en forma de apo-RBP sin apenas afinidad por TTR, eliminándose por filtración glomerular y excreción renal.

El retinol intracelular, ya sea en forma de alcohol o en forma de ácido retinoico, se encuentra unido respectivamente a proteínas: (CRBP) y (CRABP), constituidos por una cadena única de 134 (CRBP) ó 136 aminoácidos (CRBP), cuyos pesos moléculares son 15700-15500 - daltons respectivamente.

Cada una tiene un único sitio de unión a la molécula vitamínica, no se conoce muy bien la misión de tal unión aunque se cree que faciliten la interacción del retinoide con su respectivo ligando para desencadenar su función (124).

Esta proteína celular ligadora de retinol CRBP se encuentra en : hígado (125), riñón (126) , intestino delgado, pulmón, bazo, ojos, testículos, sin embargo no se ha encontrado en encéfalo, músculo, timo, tejido adiposo y corazón (127).

4.2.3. METABOLISMO (128)



4.2.4-EXCRECION

La administración de vitamina A marcada a ratas, ha permitido en -
contrar radiactividad en bilis, orina y heces.

En orina se detectan los derivados: ácido retinoico (libre y con-
jugado) y el ácido oxaretinoico, e incluso, en caso de nefritis se
observan pérdidas de retinol.

La ingesta vitamínica excesiva, motiva la presencia de vitamina
en heces.

4.3.METODOS DE ANALISIS

La espectrofotometria, la fluorimetria, la cromatografia líquida de alta resolución, así como la cromatografia en capa fina, son las técnicas utilizadas en el análisis del retinol y sus derivados(129).

Los métodos fotométricos cuantifican la intensidad de color que se produce al reaccionar la vitamina A con determinados reactivos:

-4.3.1.METODO DE CARR PRICE

La formación de cationes retinilo y retinilo anhidro, al hacer reaccionar el Retinol y sus ésteres con tricloruro de antimonio, ácido trifluoracético (TFA) ó ácido tricloroacético (TCA) (130), son causa de un color azul en la disolución y se detectan a 620 nm

Son varias las consideraciones a tener presente al utilizar éste método: (131)(132)

- El color fugaz que se origina al trabajar con tricloruro de antimonio, obliga a una rápida lectura, es por ésto y por el hecho de evitar la turbidez debida a la presencia de agua, por lo que suele reemplazarse por los otros reactivos.

-La presencia de β -carotenos son causa de coloraciones similares, es imprescindible corregir su contribución con la lectura obtenida a 450 nm.

-A fin de evitar posibles interferencias, el retinol sérico

se cuantifica con ésta técnica previa precipitación de las proteínas en etanol y extracción con hexano.

-No interesa que el suero permanezca congelado mas de seis semanas.

-4.3.2.METODO DE SOBEL-WERBIN

El color azul obtenido al reaccionar retinol y sus ésteres con DCP (diclorhidrina-glicerol) 1,3-dicloro-2-propanol, se cuantifica a 550 nm.

La interferencia de los β -carotenos se corrige a 450 nm

La ventaja respecto al método de Carr-Price es la mayor estabilidad del compuesto coloreado (134), sin embargo la sensibilidad de la técnica es menor y dependiente del grado de pureza del reactivo.

Al utilizar ésta técnica en la determinación de retinol sérico, la forma alcohólica y esterificada de la vitamina A es extraída en eter de petroleo, posteriormente se evapora a sequedad, se disuelve en cloroformo y se hace reaccionar con DCP .

-4.3.3.METODO DE BESSY-LOWRY

La extracción del retinol con un solvente orgánico por ejemplo queroseno con xileno, permite medir la absorbancia del retinol a 328 nm.

A fin de evitar interferencias de fitoflueno y aumentar la especificidad de la técnica, se mide el retinol antes de la destrucción de la vitamina y después de ésta con una lámpara de mercurio ó ácidos fuertes .

- 4.3.4.METODO DE BUDOWSKI Y BONDI

Se basa en la conversión del retinol en anhidrovitamina por pérdida de una molécula de agua, en presencia de p-toluensulfónico en medio bencénico anhidro.

Esta técnica obliga a una saponificación de los ésteres así como, a una ausencia total de humedad.

Las lecturas se realizan a 377 nm y 399nm.

-4.3.5.METODO DE MORTON Y STUBB

La potencia vitamínica expresada en unidades internacionales se calcula a través de medidas de absorbancia. La longitud de onda de máxima absorción depende del derivado vitamínico, pero en cualquier caso, la extinción a esa longitud de onda es directamente proporcional a su concentración.

$$UI/g = \frac{E}{c * d} \quad F$$

E:coeficiente de extinción:densidad óptica

c:concentración(g/100ml)

d:espesor de cubeta

F:factor internacional:1830 (retinol), 1900 (ésteres de retinol)

Es un método muy preciso, pero posibles interferencias aconsejan la corrección de Morton y Stubb a través de un tratamiento matemático .

Por ser ésta técnica la utilizada en ésta memoria en el estudio de la estabilidad química del palmitato de vitamina A, es en ese capítulo donde se describe con mas detalle.

-4.3.6 METODO FLUORIMETRICO

Por fluorimetria se consigue una sensibilidad dos ó tres veces mayor que la obtenida por espectrofotometria.

Su aplicación en el análisis de suero, supone en primer lugar la precipitación de proteínas en etanol y el retinol se extrae en hexano. La fluorescencia se lee a una longitud de onda (excitación= 340 nm, emisión= 480-490 nm)

El mayor inconveniente es la presencia de fitoflueno. Su eliminación se consigue previa retención en columna de ácido silícico - (135).

-4.3.6.METODO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION

La alta especificidad de los métodos por HPLC junto al hecho de - que no requieran correcciones para β -carotenos ni fitoflueno, justifican su gran aplicación en éstos últimos años (136)(137)(138) (139).

Modificaciones en cuanto al método de extracción, tipo de columna, longitud de onda de detección y composición cuali-cuantitativa de la fase móvil, permiten detectar diferentes tipos de retinoides . (140)(141), mezclas de vitaminas A y E (142)(143), isómeros (144) ésteres (145), e incluso fijar criterios de estabilidad de la vitamina A (146).

PARTE EXPERIMENTAL

CAPITULO 1
FORMULACION : ENSAYOS

1.FORMULACION :ENSAYOS

1.1.MATERIAL UTILIZADO

1.1.1.COMPOSICION DE LA EMULSION

1.1.2.PREPARACION

1.1.3.LIOFILIZACION

1.2.CONTROLES

1.2.1.ASPECTO Y CAPACIDAD DE REGENERACION DEL PRODUCTO LIOFILIZADO.

1.2.2.HUMEDAD DEL PRODUCTO LIOFILIZADO

1.2.3.ASPECTO Y SIGNO DE LA EMULSION

1.2.4.ESTABILIDAD FISICA DEL SISTEMA EMULSIFICADO

1.2.5.CONTROL DE DENSIDADES DE LAS FASES

1.2.6.pH DEL SISTEMA EMULSIFICADO

1.2.7.ESTUDIO GRANULOMETRICO DEL SISTEMA EMULSIFICADO

1.2.8.ESTUDIO REOLOGICO DEL SISTEMA EMULSIFICADO

1.1 MATERIAL UTILIZADO.

1.1.1.COMPOSICION DE LA EMULSION

Los constituyentes de la fase acuosa son:

Sales biliares:(0,5%), suministradas por ADSA MICRO, utilizadas como emulgente.

Carboximetilcelulosa sódica:(1,3%) SIGMA, como agente vis -
cosizante

Manitol: (6%) MERCK, como sustancia de carga en el proceso
de liofilización y con el fin de evitar la captura de humedad del
producto liofilizado .

Agua destilada: (82%), como vehiculo acuoso dispersante.

La fase oleosa está constituida por:

Oleato de etilo:(10%) CODEX, como vehiculo oleoso dipersado.

Vitamina A Palmitato (1.700 UI/g) , como principio activo
suministrada por los laboratorios Alcon.

1.1.2 .PREPARACION

La elaboracion de la fase externa se lleva a cabo por incorpora-
ción de los componentes: sales biliares, manitol, carboximetilce-
lulosa sódica al agua destilada y filtrada.

En una cierta cantidad de agua, se disuelven las sales biliares y
a continuación, se incorpora poco a poco la carboximetilcelulosa.
Un homogeneizador tipo Politron PT 3000, (diametro stator/rotor -
20:15), permite una dispersión homogenea tras agitación durante -
tres minutos a 12000 rpm.

Posteriormente se incorpora el manitol disuelto en el resto del

agua y se mantiene la agitación hasta observar una perfecta dispersión de los componentes de la fase acuosa.

A continuación se lleva a cabo el proceso de esterilización de la fase acuosa. Se pretende con ello evitar posibles contaminaciones que dificulten el estudio de estabilidad del principio activo. Ha de tenerse en cuenta, que no se incorpora conservante alguno a la formulación y es únicamente el proceso de liofilización, el medio de conservación utilizado.

El sistema esterilizado se deja enfriar hasta alcanzar la temperatura ambiente y a continuación tras agitar con politrón durante un minuto a 12000 rpm se incorpora la fase oleosa, previamente preparada por disolución de la vitamina A palmitato en oleato de etilo.

La fase oleosa se añade lentamente en la fase acuosa. La agitación se lleva a cabo en un homogeneizador Politrón a 25000 rpm durante tres minutos. Se repite el proceso de agitación por triplicado con intervalos de treinta minutos.

Durante la emulsificación se controlan los siguientes factores:

- Agitar con o sin corriente de nitrógeno
- Proteger o no al sistema de la luz solar
- esterilizar o no la emulsión preparada.

Parte de la emulsión se distribuye en placas petri para posterior

liofilización. El resto se reparte en recipientes destinados a - estudiar la influencia que la temperatura de almacenamiento:(45°C, ambiente y 5°C), tiene en :

- Estabilidad física del sistema emulsificado
- Variación granulométrica
- Reología
- Estabilidad química del principio activo

1.1.3. LIOFILIZACION

Se realiza en un liofilizador Telstar L-3

La fase de congelación se lleva a cabo de forma progresiva lentamente a fin de evitar una congelación rápida que causaría aumento granulométrico.

La etapa de sublimación se mantiene durante tres días en las siguientes condiciones de ensayo:

- Temperatura del condensador:(-70°C)
- Temperatura de la cámara :(-40°C , -30°C)
- Vacio en cámara: 20 micrones
- Vacio en bomba: 10 micrones

La etapa de desecación secundaria se mantiene durante cinco horas a temperatura inferior a 40°C.

El producto liofilizado se trasvasa a recipientes herméticamente cerrados que se almacenan a temperaturas de 45°C, ambiente y 5°C,

a fin de estudiar la influencia que la temperatura tiene en :

-Variación granulométrica

-Reologia

-Estabilidad química del principio activo

En aquellas situaciones en las que el proceso de emulsificación se ha realizado en corriente de nitrógeno y con protección de la luz solar, los envases liofilizados se conservan en idénticas condiciones.

1.2.CONTROLES

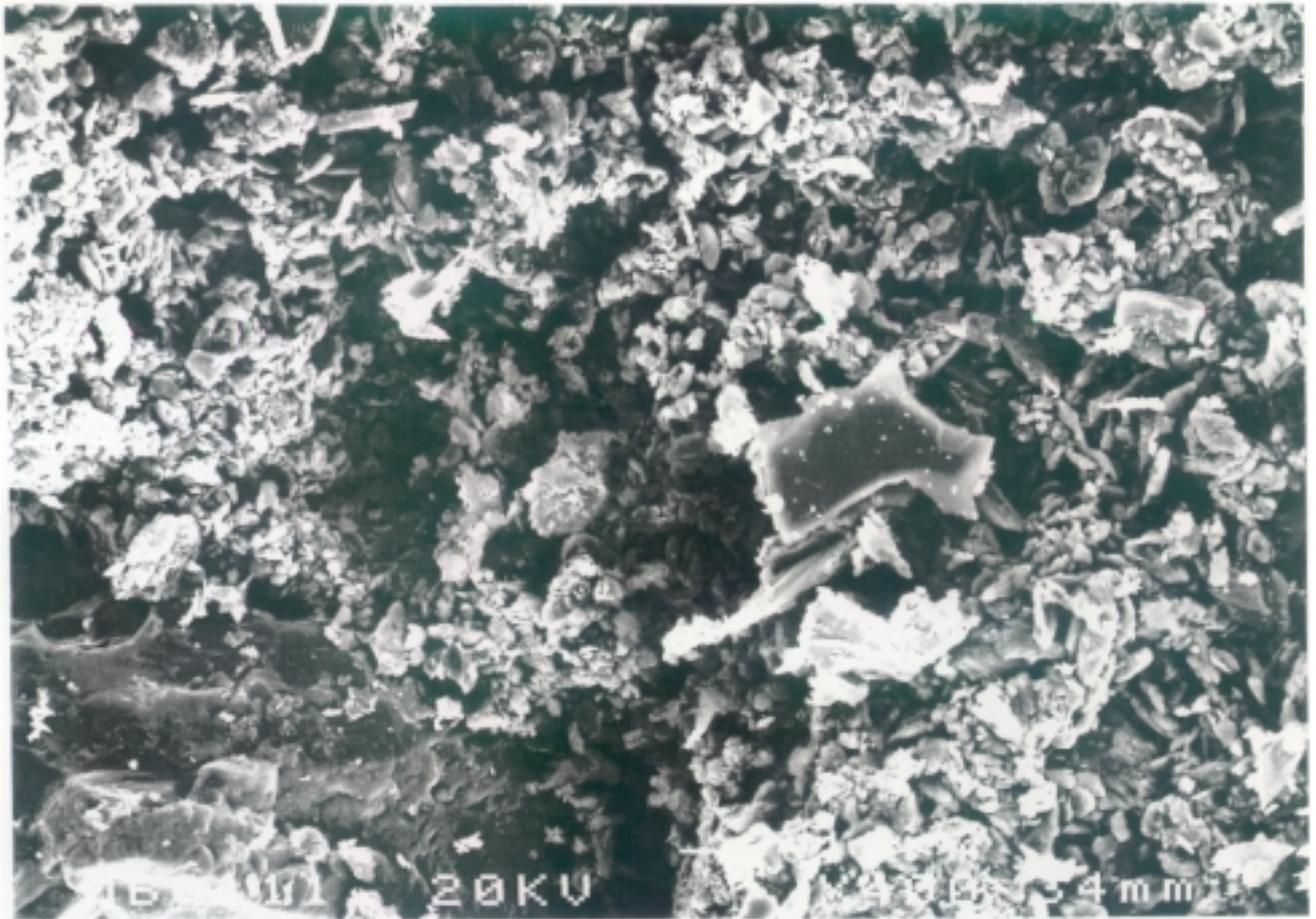
1.2.1.ASPECTO Y CAPACIDAD DE REGENERACION DEL PRODUCTO LIOFILIZADO

Desde el punto de vista morfológico, el sistema liofilizado presenta un aspecto fibroso, quebradizo al tacto y de color blanco (fotografías 1-2)

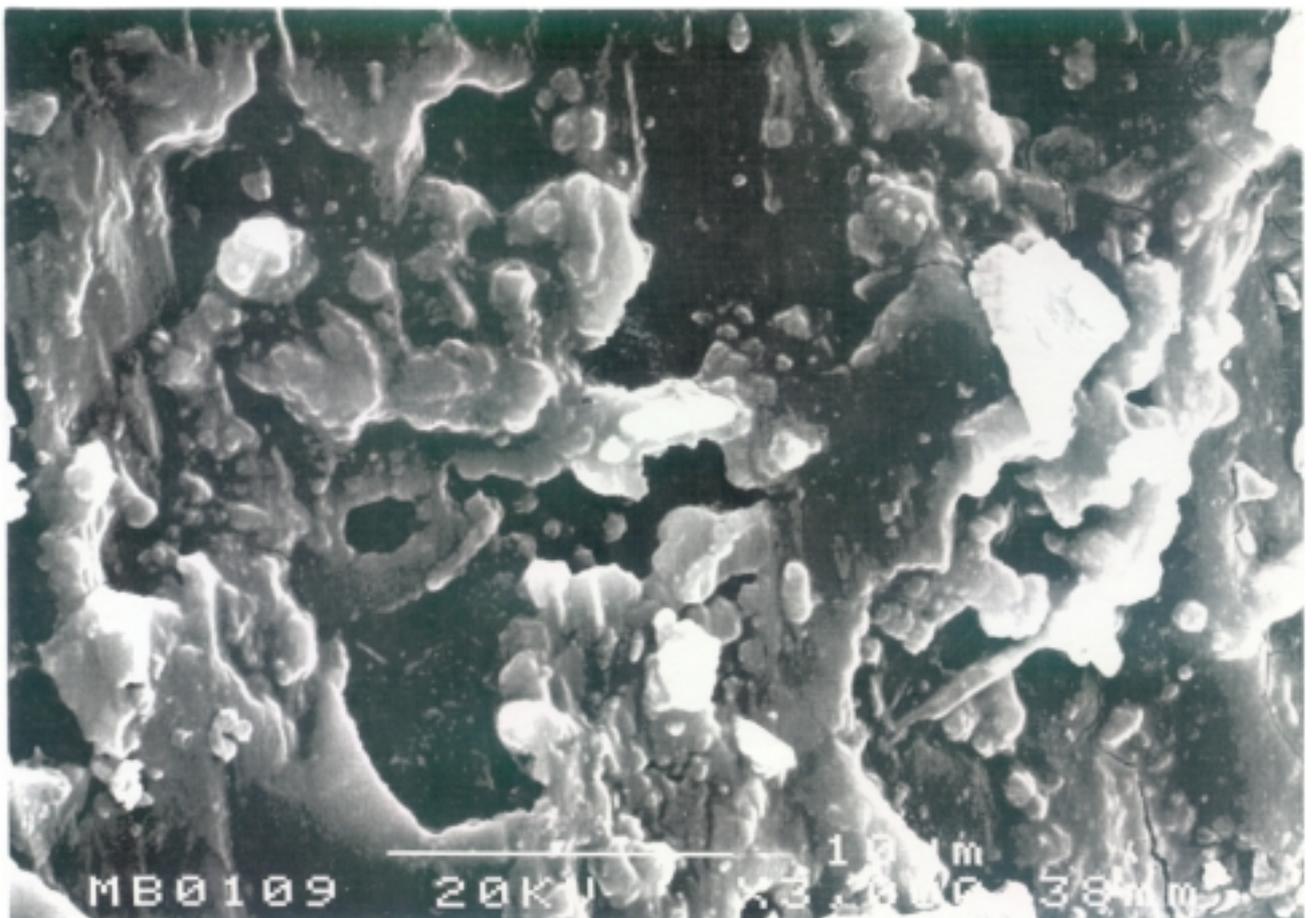
La regeneración se logra por simple incorporación de agua, una debil agitación magnética permite reconstituir el sistema emulsificado.

Al conservar el producto liofilizado en recipientes herméticamente cerrados a temperatura ambiente y a 50C, no se observan modificaciones morfológicas al cabo de dos años. A temperatura de 45 0C aparecen signos de oxidación a los tres meses.

EMULSION LIOFILIZADA

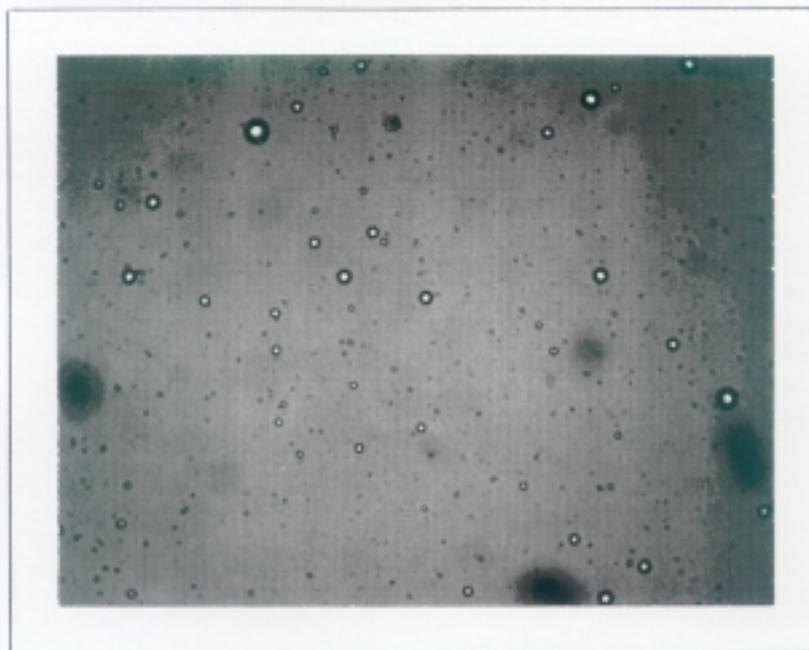


FOTOGRAFIA 1



FOTOGRAFIA 2

EMULSION SIN LIOFILIZAR



objetivo de inmersión

La exposición de la masa liofilizada a las condiciones atmosféricas (luz directa y humedad ambiental), permite observar al cabo de un cierto tiempo (mas de una semana), retracción de la masa e inicios de coloración amarillenta, atribuibles a procesos de oxidación

1.2.2.HUMEDAD DEL PRODUCTO LIOFILIZADO

Las medidas, se llevan a cabo por la técnica de Karl Fischer, modelo Metrohm, que dispone de un procesador 658 KF.

Previamente el producto liofilizado se pulveriza con agitación magnética en un recipiente herméticamente cerrado, con el fin de evitar la captura de humedad .

El contenido de humedad oscila entre valores de: 1,1 % - 1,5 %

1.2.3.ASPECTO Y SIGNO DE LA EMULSION

La emulsión sin liofilizar presenta un aspecto lechoso semejante al que se observa al regenerar la emulsión liofilizada.

Se trata de una emulsión de fase externa acuosa. Su signo queda - confirmado por los siguientes hechos:

- dilución en agua.
- tinción con azul de metileno
- medidas conductimétricas (capítulo de conductividad)

La presencia de gotas de grasa que se observan al tratar de dis -

persar el sólido liofilizado en el agua perdida durante el proceso de liofilización, nó se atribuyen a una inversión de fases si no más bién, a una insuficiente velocidad de agitación en el momento de la regeneración.

1.2.4. ESTABILIDAD FISICA DEL SISTEMA EMULSIFICADO

La emulsión sin liofilizar se deposita en unas probetas graduadas idénticas en cuanto a su forma, altura y diametro interno.

El volumen de llenado de cada una de ellas: H_0 , es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar la velocidad de formación de crema .

Una vez llenas se almacenan a tres diferentes temperaturas : 45°C ambiente y 5°C , a fin de analizar la influencia que la temperatura tiene en la estabilidad física del sistema emulsificado.

La tabla (E-1), gráfica (E-I), muestran los resultados obtenidos durante un año de almacenamiento y observación.

La estabilidad física es menor a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento. La inestabilidad supone la presencia de suero, pero no por ello ruptura de la emulsión puesto qué el sistema se recupera por simple agitación manual.

Esa inestabilidad en el grado de dispersión permite detectar inicios de suero al cabo de una semana a temperatura de 45°C , al -

disminuir la temperatura, la estabilidad aumenta y los primeros indicios de suero se observan a partir del primer mes a temperatura ambiente y de los nueve meses a temperatura de 5°C.

Otros estudios realizados nos han permitido observar lo siguiente:

-La estabilidad física a esas tres temperaturas aumenta al aumentar el porcentaje de carboximetilcelulosa sódica hasta un 1.5%.

-La estabilidad disminuye en caso de esterilizar la emulsión una vez preparada.

La estabilidad física de la emulsión liofilizada y regenerada, depende de las condiciones de agitación durante el proceso de regeneración.

La tabla (E-2), gráfica (E-2), muestra los resultados obtenidos de una emulsión regenerada al incorporar el agua perdida durante el proceso de liofilización y en la que la agitación se ha realizado en politron a 3700 rpm durante tres minutos.

En todos los casos, salvo que se agite de idéntica manera a como se hace al preparar la emulsión, la regeneración del producto liofilizado nos permite disponer de un sistema inestable y al cabo de una semana hay signos muy claros de presencia de suero.

ESTABILIDAD-TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

TIPO. Emulsión sin liofilizar

TIPO DE RECIPIENTE: Probeta graduada de 25 ml

VOLUMEN DE LLENADO: Ho =23 ml

TIEMPO ALMACENAMIENTO (días)	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO		
	45°C	ambiente	5°C
1	estable	estable	estable
7	"	"	"
11	inicio suero	"	"
19	5.0ml suero	"	"
21	7.0 ml "	"	"
26	9.0 ml "	"	"
28	9.0 ml "	inicio suero	"
35	9.5 ml "	"	"
57	10.5 ml "	1.0 ml suero	"
71	10.7 ml "	1.5 ml "	"
88	11.0 ml "	2.0 ml "	"
100	11.0 ml "	2.0 ml "	"
118	11.0 ml "	2.3 ml "	"
148	11.0 ml "	2.5 ml "	"
178	11.0 ml "	3.0 ml "	"
208		3.5 ml "	"
235		4.2 ml "	"
295		5.3 ml "	0.5 ml suero
355		7.1 ml "	1.0 ml "

(tabla E-1)

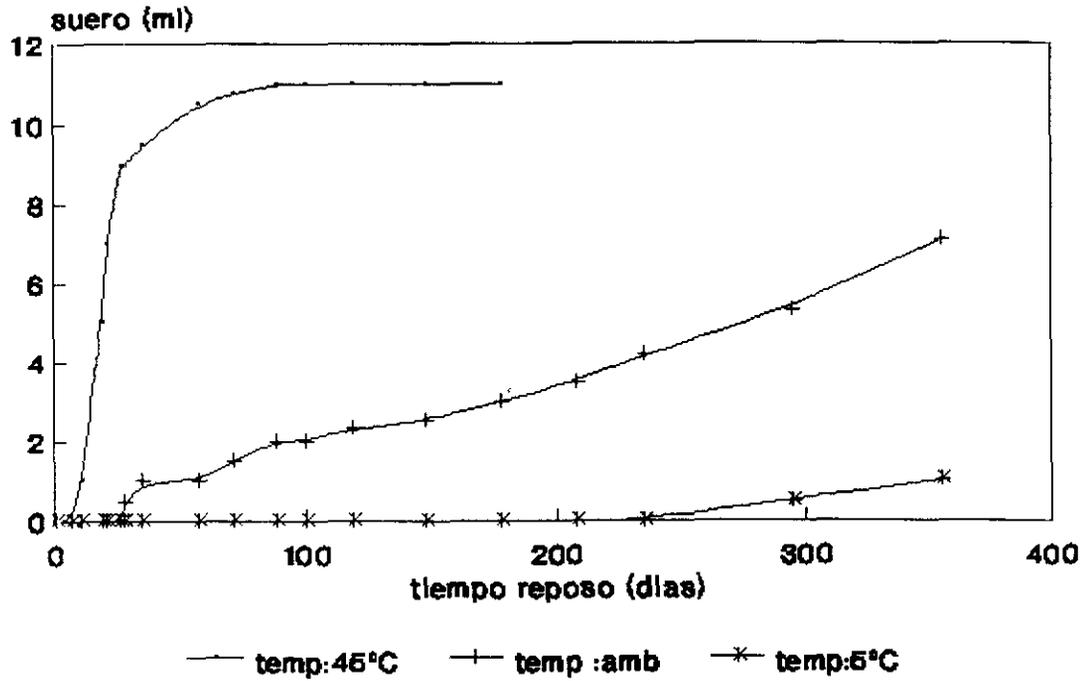
ESTABILIDAD FISICA -TEMPERATURA AMBIENTE

TIPO: Emulsión liofilizada regenerada
TIPO DE RECIPIENTE: Probeta graduada de 25 ml
VOLUMEN DE LLENADO: Ho=26 ml

TIEMPO ALMACENAMIENTO (días)	TEMPERATURA ALMACENAMIENTO (ambiente)
1	estable
2	estable
3	inicios suero
7	0.5ml "
9	2.0ml "

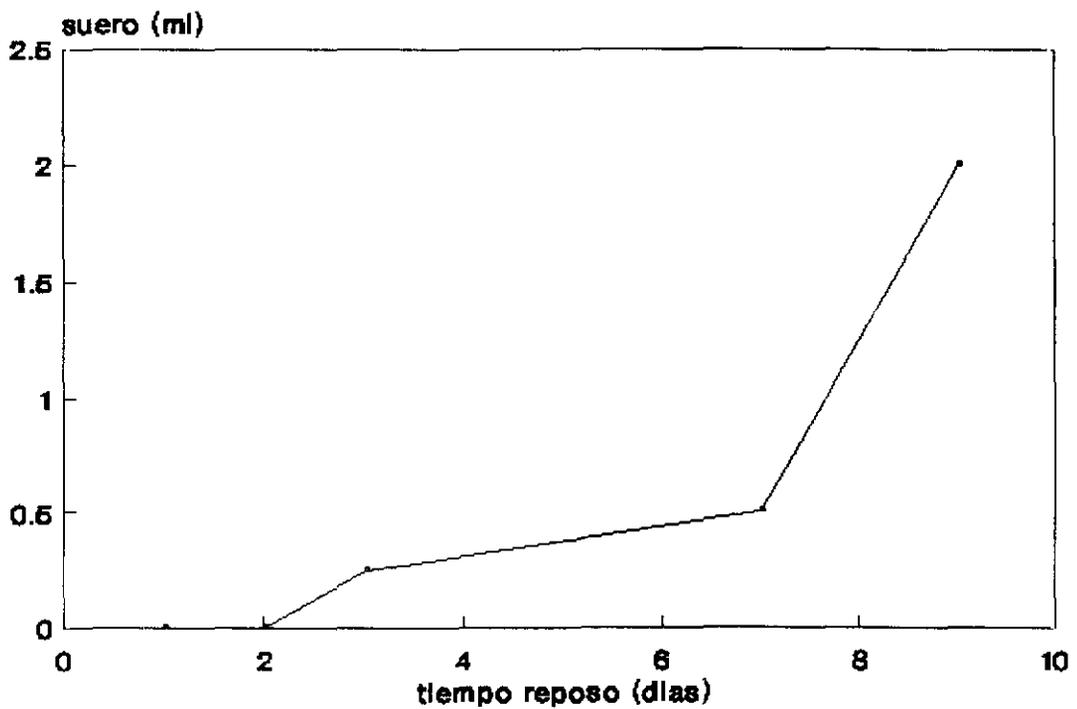
(tabla E-2)

EMULSION SIN LIOFILIZAR ESTABILIDAD FISICA



(gráfica E-I)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA ESTABILIDAD FISICA



T° amb

(gráfica E-II)

1.2.5. CONTROL DE DENSIDADES DE LAS FASES

Según la ley de Stokes, la diferencia de densidades entre fases, externa e interna del sistema emulsificado es un factor a tener presente a la hora de evaluar la estabilidad física, es por ello por lo que se plantea el siguiente esquema de trabajo:

Se preparan las fases oleosa y acuosa por separado y se almacenan a tres diferentes temperaturas :45°C, ambiente, 5°C, en recipientes herméticamente cerrados. Se calculan las densidades de las fases a las veinticuatro horas de su preparación (tabla D-1) y a los quince días de su almacenamiento (tabla D-2), para ello se utiliza un picnómetro de líquidos.

El intervalo de tiempo estudiado corresponde al periodo en el que se manifiestan signos de suero en la emulsión almacenada a 45°C , mientras que en el resto de las temperaturas ensayadas, el sistema permanece estable.

Se pretende analizar si la presencia de crema y suero se corresponde con una variación considerable en las densidades de las fases

FASES	DENSIDADES(g/cc) .TEMPERATURA		
	45 °C	21° - 23°C	5°C
Acuosa	1.2054	1.0303	1.0325
Oleosa	0.8591	0.8683	0.8801
DIFERENCIA ACUOSA-OLEOSA	0.1663	0.1620	0.1524

(tabla D-1)

DENSIDADES (g/cc).TEMPERATURA			
FASES	45°C	20° -21°C	5°C
Acuosa	1.0292	1.0319	1.0390
Oleosa	0.8612	0.8686	0.8772
DIFERENCIA ACUOSA-OLEOSA	0.1680	0.1633	0.1618

(tabla D-2)

De éstos resultados se deduce:

1/La diferencia de densidades entre fases aumenta al aumentar la temperatura y el periodo de almacenamiento, pero las diferencias son lo suficientemente pequeñas como para esperar que no influyan en la estabilidad física, al menos de forma considerable, e incluso pueden estar incluidas en el propio error de medida.

2/La presencia de suero no puede justificarse por una gran diferencia de densidades, es por ello, por lo que se considera el factor que menos contribuye en la ecuación de Stokes a la hora de justificar la estabilidad o inestabilidad de nuestro sistema emulsificado y en el periodo de tiempo ensayado.

1.2.6. pH DEL SISTEMA EMULSIFICADO

No solo se pretende averiguar si el pH es un factor relacionado o no con la pérdida de actividad vitamínica, si no que a su vez se quiere analizar si el periodo y temperatura de almacenamiento, así como el proceso de regeneración del sistema liofilizado, originan cambios en el valor de dicho parámetro.

Las medidas de pH se realizan con pHmetro modelo Crison 2002

El pH inicial, medido inmediatamente después de preparar la emulsión es de 7.789 ± 0.01 a temperatura de 58°C . Durante el proceso de emulsificación no se trabaja en atmósfera de nitrógeno ni tampoco se protege al sistema de la luz solar. Los recipientes herméticamente cerrados se almacenan a 45°C , ambiente y 5°C .

La tabla (pH-1), muestra los resultados obtenidos durante un periodo de 120 días, tiempo suficiente en el que hemos detectado la pérdida total de potencia vitamínica.

TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO-PH

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)	T _a 40°C pH / T _a		T _a ambiente pH / T _a		T _a 5°C pH / T _a	
1	7.346	40.0	7.385	19.3	7.346	5.1
8	7.179	39.5	7.254	20.0	7.391	5.9
12	7.381	39.1	7.295	18.7	7.902	5.3
22	7.410	38.7	7.244	19.0	7.166	5.5
28	7.536	38.7	6.804	16.9	7.243	5.4
35	7.762	39.2	7.177	12.2	7.632	4.2
60	7.751	39.6	7.167	13.1	7.612	4.2
120	7.699	39.7	7.177	13.7	7.621	4.6

(tabla pH-1)

De éstos resultados podemos concluir:

-No se observa en la emulsión sin liofilizar una variación considerable del pH ni con la temperatura ni con el periodo de almacenamiento .

Una vez finalizado el proceso de liofilización se regenera la emulsión . El pH medido a t_a de 32°C es de 7.758

El sistema liofilizado se conserva a temperatura ambiente y sin atmósfera de nitrógeno. Al cabo de once meses;(tiempo suficiente como para asegurar la degradación de la vitamina), se regenera la emulsión y se mide el pH. Los valores que se obtienen son los

siguientes:

pH=7.748	Ta=27.10C
pH=7.745	Ta=22.10C

de lo que se concluye:

-El proceso de liofilización así como, su regeneración y su almacenamiento no afectan al valor del pH

-La pérdida de actividad vitamínica no se acompaña de modificaciones en el valor del pH.

1.2.7. ESTUDIO GRANULOMETRICO DEL SISTEMA EMULSIFICADO

1.2.7.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

1.2.7.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

1.2.7.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

1.2.7.4. INTERPRETACION DE RESULTADOS OBTENIDOS

1.2.7.5. RESULTADOS

1.2.7.6. CONCLUSIONES

1.2.7.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

1/ Analizar la granulometria del sistema emulsificado, asi como su evolución a lo largo del periodo de almacenamiento.

2/ Evaluar la influencia del proceso de liofilización en los resultados obtenidos.

3/ Comparar los sistemas liofilizado y sin liofilizar.

4/ Estudiar la influencia de las diferentes condiciones de regeneración del sistema liofilizado.

1.2.7.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

Se ha utilizado un analizador de partículas GALAI, modelo CIS 1 - referencia 5150, en el que se combinan dos técnicas: análisis de tamaño y análisis de forma, mediante dos canales diferentes de adquisición de datos .

El canal laser utiliza un rayo laser He-Ne (2mw, 632,8 nm), tras atravesar un prisma recorre circular y a velocidad constante la muestra de medida.

Se basa en la teoria del tiempo de transición, relacionada con el tamaño de partícula, los resultados obtenidos no se ven afectados por variaciones en la viscosidad del sistema, asi como tampoco por el índice de refracción, ni por el propio movimiento browniano.

La interacción laser-partícula proporciona una señal que es detectada por un fotodiodo PIN de silicio y permite obtener directamente el tamaño de la partícula .

La muestra a medir se coloca en una cubeta de 5 ml con agitador - magnético a fin de asegurar una lectura representativa de todo el volumen objeto de medida. La cubeta se introduce en un módulo celular GCM-1.

La tarjeta de adquisición de datos GP 332, junto a un software de análisis, permiten registrar los resultados obtenidos mediante: gráficos de distribución de tamaños, areas y volúmenes, histogra-

mas, valores estadísticos, concentraciones, porcentajes de sólidos, e incluso, comparar gráficos entre si.

El intervalo de medida es de (0,5-600 μm) e incluso (2-1200 μm) según el módulo de medida a utilizar.

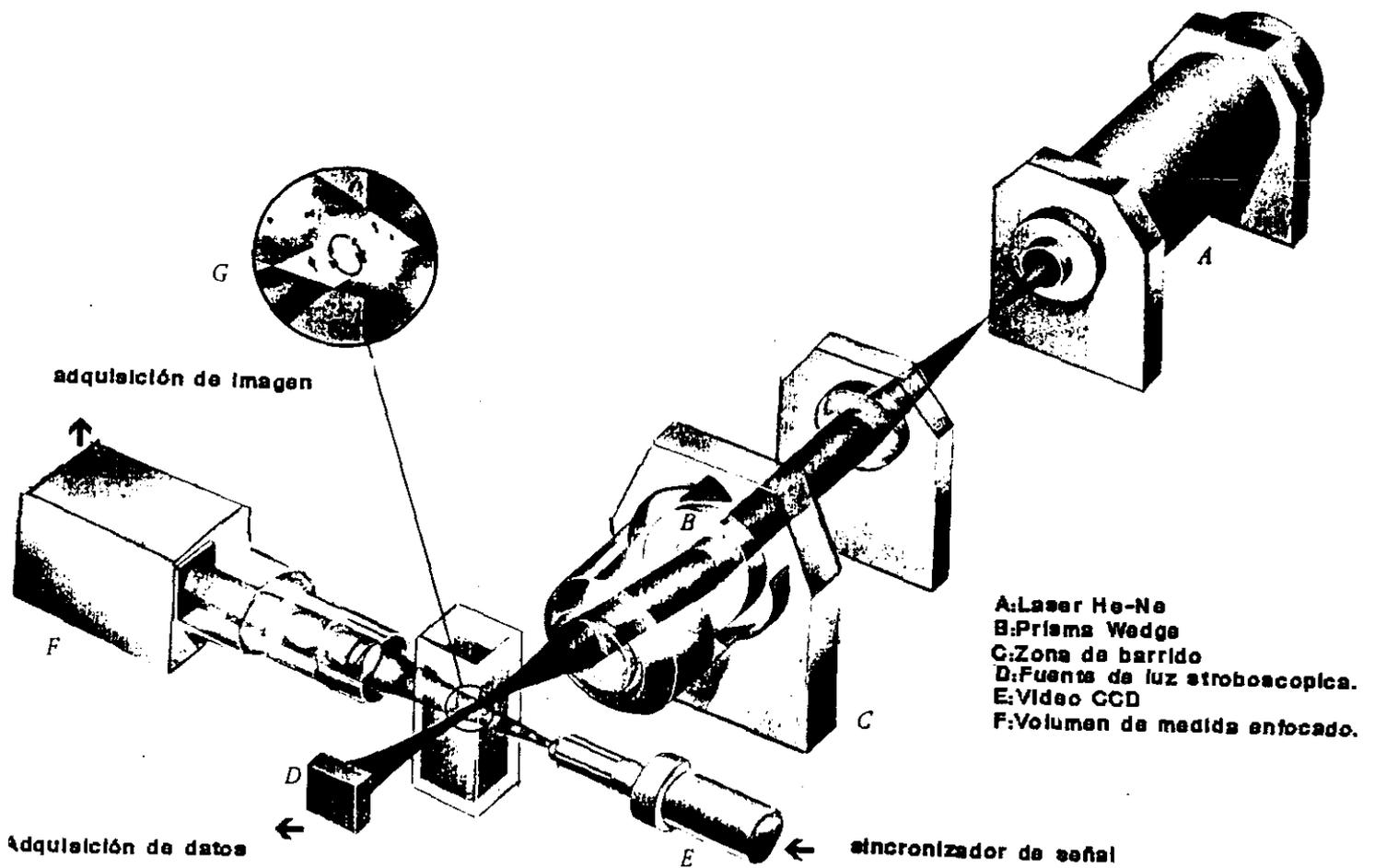
El canal de análisis de forma, dispone de una cámara de video CCD microscópica, donde la imagen queda detectada y se visualiza a través de un monitor de televisión.

Se utilizan lámparas de iluminación estroboscópica, donde los intervalos de luz y oscuridad quedan perfectamente sincronizados.

La tarjeta de adquisición de imágenes y el software, permiten obtener veintiocho parámetros para cada partícula junto con resultados estadísticos, gráficos e histogramas.

(esquema del analizador de partículas)

ESQUEMA DEL ANALIZADOR DE PARTICULAS GALAI CIS 1



1.2.7.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES

-Las emulsiones sin liofilizar se almacenan en recipientes herméticamente cerrados de igual forma y tamaño a tres temperaturas: 45°C, ambiente y 5°C.

En el momento previo a cada lectura y a fin de homogeneizar la muestra a medir, se agita por rotación manual el recipiente. La toma de muestra se lleva a cabo con una pipeta graduada, se pretende con ello extraer siempre de una misma zona y aproximadamente la misma cantidad (1 gota), se diluye en 400 ml de agua filtrada con agitación suave a través de una varilla de vidrio y se deposita en la cubeta de lectura.

El estudio a 45°C se lleva a cabo solamente durante los tres primeros meses de almacenamiento, periodo tras el cuál es nítida la presencia de crema y suero.

En caso de sistemas liofilizados, las muestras a medir se almacenan en recipientes herméticamente cerrados a temperaturas: ambiente y 5°C.

A fin de analizar la influencia que sobre la granulometria tienen las diferentes condiciones de regeneración del sistema liofilizado, se dispone de emulsión liofilizada conservada a 5°C a la que se le somete al siguiente esquema de estudio

1/Se le incorpora el agua perdida en el proceso de liofilización mediante agitación con politrón a 25000rpm durante tres minutos. La agitación se repite tres veces con intervalos de treinta minutos.

Se pretende con ello, reproducir las condiciones iniciales utilizadas al preparar la emulsión y analizar la capacidad de regeneración del sistema liofilizado.

2/La incorporación del agua perdida, se lleva a cabo con politrón a 3700 rpm durante tres minutos .
Posteriormente, tanto en (1) como en (2), se toma una gota de emulsión regenerada, se diluye en 400 ml de agua y se agita suavemente con una varilla de vidrio.

3/Se dispersan 0,5 g de sólido liofilizada en 400 ml de agua filtrada, mediante agitación magnética a velocidad constante. Se toman muestras a diferentes momentos: 20-30-40-50-60 minutos .

4/Se aumenta la velocidad de agitación magnética respecto al punto (3) y se toman muestras a los 20 y 60 minutos de agitación.
En los puntos (3) y (4), se pretende no solo acercarnos al modo biológico de regeneración, sino que además, se analiza:

-La influencia de la velocidad de agitación con agitador magnética.

-La influencia del tiempo de agitación

Por otro lado y con el fin de estudiar la posible variación granulométrica del sistema liofilizado con el tiempo y temperatura de almacenamiento, se toman muestras de sólido liofilizado 0,5 g y se dispersan en 400 ml de agua filtrada con agitación magnética a velocidad constante durante 10 minutos.

1.2.7.4. INTERPRETACION DE RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados experimentales muestran el valor del diametro de glóbulos de la fase interna a partir del cuál, se calcula: radio, superficie específica, superficie total, constante de desemeulsificación, tiempo de vida media y número de glóbulos de fase interna, para deducir con todo ello la estabilidad física del sistema emulsificado.

Según King Mukherjee, el factor de estabilidad de una emulsión viene dado por el valor inverso del tiempo necesario para que experimente una variación la interfaz específica inicial.

La variación que se observa en la superficie de la fase interna de una emulsión, se ajusta a una cinética de orden uno.

$$- \frac{dS}{dt} = k S_i$$

S=interfaz específica en el tiempo(t)

S_i =interfaz específica inicial

K=factor de inestabilidad, inverso del factor de estabilidad K_e

La superficie de fase interna (St) depende del número de glóbulos (N) y de la superficie de cada uno de ellos (Si).

$$St = S_i N$$

S_i=4 π r²donde (r) es el radio del glóbulo de fase interna

N=3 V / 4 π r³ donde (v) es el volumen de fase interna

Por todo esto se deduce:

$$St=(4 \pi r^2 \cdot 3 V) / 4 \pi r^3$$

$$St= (3 V)/r (\mu m) = (3 V)10^4 / r (\text{cm}^2)$$

Se conoce como interfaz específica, la superficie que presenta la unidad de peso de fase interna (P)

$$S_e = \frac{St}{P}$$

por lo dicho anteriormente, también se puede expresar en función del radio de los glóbulos de fase interna y de su densidad (d).

$$Se = (3 V)^4 / r^3 P = 3 \cdot 10^4 / r^3 d \quad (\text{cm}^2/\text{g})$$

La inestabilidad de la emulsión se manifiesta con un aumento en el radio del glóbulo y con ello se origina una disminución de la superficie específica y total.

La expresión matemática que expresa la variación con el tiempo de la superficie específica, se ajusta a una ecuación exponencial

$$Se_t = Se_{t=0} e^{-kt} \quad \log Se_t = \log Se_{t=0} - \frac{kt}{2,303}$$

Al conocer la interfaz inicial y su valor a diferentes periodos de almacenamiento, se puede calcular la constante de inestabilidad (k) y en función de ésta, el tiempo de semirrotura ($T_{1/2}$), momento en el que la interfaz específica se reduce a la mitad.

$$T_{1/2} = 0,6932 / K$$

De acuerdo con Smith y Grinling, otro factor a tener presente a la hora de establecer la estabilidad de una emulsión, es el cálculo del número de millones de glóbulos en el que se subdivide un $\frac{1}{3}$ mm de fase interna; concepto que definen como grado de emulsión.

$$N = 3 V / 4 \pi r^3$$

La relación entre ambos factores se demuestra en cuanto qué: una disminución en la interfaz específica, se acompaña de un menor número de glóbulos con el consiguiente aumento en el tamaño de éstos y se manifiesta una tendencia a la inestabilidad con posible ruptura del sistema .

La variación tanto de la superficie total como del número de glóbulos de fase interna, se ajustan a las siguientes expresiones:

$$\begin{array}{cc} St = S_o e^{-\frac{K}{1} T} & Nt = N_o e^{-\frac{K}{2} T} \end{array}$$

de lo que se demuestra:

$$\frac{r_o}{r_t} = e^{-\frac{K}{1} T} \quad \frac{(r_o)^3}{(r_t)^3} = e^{-\frac{K}{2} T}$$

al agrupar términos, se deduce que la variación en el número de glóbulos es aproximadamente tres veces mayor que la variación en su superficie

$$\frac{K}{2} = 3 \frac{K}{1}$$

Un descenso en un 10% del area interfacial, supone un descenso del 27% del nº de glóbulos de fase interna

1.2.6.5.RESULTADOS

1/La granulometria depende de las condiciones de regeneración ensayadas:

1a/Al aumentar la velocidad de agitación con un homogeneizador politrón, desde 3700 rpm hasta 25000 rpm, se observa una disminución en el tamaño y una mayor homogeneidad de glóbulos de fase interna (gráfica G-I),(tabla G-1)

1b/Con altas velocidades de agitación (25000rpm) en homogeneizador politrón, no se visualizan gotas de grasa en la superficie, a diferencia de lo que ocurre al agitar a 3700rpm, e incluso con agitación magnética durante una hora .

1c/Al aumentar la velocidad y el tiempo de agitación magnética, se observa una reducción en el tamaño de glóbulos de fase interna (gráficas:G-II,G-III,G-IV), (tablas:G-2,G-3)

1d/Al mantener constante el tiempo de agitación magnética se observa una reducción del diámetro de glóbulos al aumentar la velocidad de agitación.

Al cabo de 20 minutos se aprecia una reducción desde 12,52 μm a 5,92 μm . A los 60 minutos la variación del diámetro medio area/volumen va desde 9,42 μm a 6,0 μm . (tablas:G-2 G-3)(gráficas:G-II G-III).

1e/ Al mantener constante el tiempo de agitación magnética, se observa una menor homogeneidad en el tamaño de glóbulos al disminuir la velocidad de agitación. (tablas: G-2 G-3) (gráficas: G-II , G-III).

1f/ La influencia del tiempo de agitación es tanto mayor a medida que disminuye la velocidad de agitación magnética. A velocidades bajas el diámetro medio área/volumen tabla (G-3), disminuye desde 12,52 μm a los 20 minutos de agitación, hasta 9,42 μm al cabo de una hora.

Al aumentar la velocidad de agitación magnética, el diámetro medido a los 20 minutos, se mantiene prácticamente constante durante 60 minutos, en un valor de aproximadamente 6 μm (tabla G-2).

1g/ Durante el primer año de almacenamiento, la emulsión liofilizada mantiene la capacidad de regeneración a las dos temperaturas ensayadas (tablas: G-4a, G-4b).

1h/ La temperatura de almacenamiento del sistema liofilizado - influye en la variación de la granulometría que se obtiene tras su regeneración.

-Al disminuir la temperatura de almacenamiento, la granulometría tiende a mantenerse en aproximadamente 21 micras de diámetro medio área/volumen al cabo de un año (tabla G-4a).

En ese mismo periodo, al alcanzar la temperatura ambiente, se observa una variación granulométrica desde 16, hasta 30 micras, (tabla G-4b).

2/El estudio granulométrico llevado a cabo en la emulsión sin liofilizar aporta los siguientes resultados: (tablas:G-5 a G-10)

2a/El radio medio area /volumen en el momento de preparar la emulsión es de $0,725 \mu\text{m}$ (tabla G-7)

2b/Al cabo de un año de almacenamiento a las dos temperaturas ensayadas: (5°C), (ambiente), no se observa una variación considerable en el tamaño de glóbulos de fase interna (gráfica G-VII) y el diámetro medio área/volumen apenas supera $2\mu\text{m}$ (tablas:G-5,G-7)

2c/Puede apreciarse al cabo de tres meses, un ligero aumento en la granulometria al aumentar la temperatura de almacenamiento . (gráfica G-V). A temperatura de 5°C el valor del diámetro medio area/volumen permanece practicamente constante en $1,45 \mu\text{m}$.A temperatura ambiente alcanza $1,51 \mu\text{m}$, mientras que en ese mismo periodo de tiempo a temperatura de 45°C se dispone de glóbulos con $1,74 \mu\text{m}$ de diámetro medio.

2d/La distribución en porcentaje del número de partículas de acuerdo al tamaño (tablas:G-8,G-9,G-10), demuestra que el intervalo $[0-1] \mu\text{m}$, sufre variaciones considerables a lo largo del almacenamiento que afectan de forma significativa al valor del diámetro medio area/volumen.

2e/La variación de la superficie específica, es mas considerable a medida que la temperatura de almacenamiento aumenta (tablas G-8,G-9,G-10).

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA

 Condiciones de regeneración:

EMULSION A :Agitación con politrón 25000rpm 10 minutos

EMULSION B :Agitación con politrón 3700rpm 10 minutos

	EMULSION A	EMULSION B
Diametro medio (a/v)±SD(µm)	1,39 ± 0,42	5,79 ± 4,22
Superficie específica (cm ² /g)	43352,51	10407,59
Distribución en número de glóbulos de fase interna (intervalo µm)	%	%
0-1	42,54	29,37
1-2	55,83	27,13
2-3	1,44	10,70
3-4	0,17	12,23
4-5	0,02	8,45
5-6	0,0	5,78
7-8		1,63
8-9		0,89
9-10		0,41
10-20		0,28
20-30		0,0

(tabla G-1)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA

 Condiciones de regeneración:

 Agitación magnética a velocidades
 altas durante 60 minutos

TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA	20 MINUTOS	60 MINUTOS
Diametro medio (a/v)±SD(µm)	5,92 ± 4,49	6,00 ± 4,99
Superficie específica (cm ² /g)	10179,05	10044,00
Distribución en número de glóbulos de fase interna (intervalo µm)	%	%
0-1	48,80	68,66
1-2	32,89	29,35
2-3	6,03	0,36
3-4	4,61	0,25
4-5	3,36	0,40
5-6	1,84	0,30
6-7	1,01	0,18
7-8	0,48	0,12
8-9	0,34	0,07
9-10	0,27	0,06
10-20	0,35	0,22
20-30	0,02	0,01
30-40	0,00	0,00

(tabla G-2)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA

Condiciones de regeneración:

Agitación magnética a velocidades
bajas durante 60 minutos

TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA (minutos)	20	40	50	60
Diametro medio(a/v)±SD(µm)	12,52 ±12,74	12,19 ±13,38	9,23 ±11,60	9,42 ±9,27
Superficie específica (cm ² /g)	4813,09	4947,45	6528,71	6397,02
Distribución en número de glóbulos de fase interna (intervalo µm)	%	%	%	%
0-1	39,63	38,60	37,81	35,79
1-2	33,86	35,83	32,72	35,75
2-3	10,25	9,31	10,56	10,37
3-4	6,00	6,18	8,14	6,33
4-5	3,96	3,69	4,52	4,93
5-6	2,28	2,30	2,44	2,56
6-7	1,07	1,22	1,44	1,44
7-8	0,76	0,81	0,60	0,83
8-9	0,55	0,49	0,45	0,51
9-10	0,40	0,30	0,36	0,38
10-20	1,00	1,10	0,85	1,01
20-30	0,19	0,11	0,09	0,09
30-40	0,02	0,03	0,01	0,01
40-50	0,02	0,01	0,00	0,01
50-60	0,01	0,00	0,00	0,00

(tabla G-3)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA (Ta 50C)

 Condiciones de regeneración: agitación magnética 10 minutos

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (dias)	1	90	330	360
Diámetro medio(a/v)±SD(µm)	29,98 ±19,76	21,68 ±19,09	27,26 ±12,75	21,42 ±19,23
Superficie específica (cm ² /g)	2741,8	2741,8	2210,56	2815,88
Distribución en número del glóbulo de fase interna (intervalo µm)	%	%	%	%
0-1	38,22	34,65	38,34	45,37
1-2	39,61	40,48	37,05	32,31
2-3	7,71	8,24	8,11	7,14
3-4	5,20	5,60	5,92	4,52
4-5	3,05	3,98	3,28	3,82
5-6	1,83	2,26	2,21	2,09
6-7	1,27	1,02	1,33	1,29
7-8	0,65	0,72	0,82	0,74
8-9	0,50	0,54	0,58	0,49
9-10	0,38	0,45	0,36	0,55
10-20	1,14	1,50	1,45	1,28
20-30	0,26	0,36	0,30	0,24
30-40	0,09	0,10	0,09	0,09
40-50	0,03	0,08	0,03	0,05
50-60	0,01	0,02	0,01	0,02
60-70	0,00	0,00	0,01	0,01

(tabla G-4a)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA (T_a ambiente)

 Condiciones de regeneración: agitación magnética 10 minutos

TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (días)	1	90	330	360
Diametro medio(a/v)±SD(µm)	16,60 ±18,89	14,06 ±14,66	20,53 ±20,29	30,22 ±27,78
Superficie específica (cm ² /g)	3630,12	4285,91	2935,21	1994,04
Distribución en número de glóbulos de fase externa % (intervalo µm)	%	%	%	%
0-1	30,15	32,79	46,30	42,29
1-2	40,63	45,35	32,55	33,31
2-3	11,19	7,95	7,01	6,78
3-4	6,18	5,30	4,86	5,86
4-5	4,03	3,17	3,24	4,05
5-6	2,42	1,59	2,12	2,20
6-7	1,44	1,10	1,21	1,52
7-8	0,89	0,70	0,60	0,84
8-9	0,68	0,49	0,44	0,53
9-10	0,51	0,30	0,36	0,41
10-20	1,64	1,05	0,96	1,57
20-30	0,14	0,13	0,20	0,32
30-40	0,05	0,05	0,07	0,17
40-50	0,03	0,02	0,05	0,10
50-60	0,01	0,01	0,01	0,04
60-70	0,01	0,00	0,01	0,02
70-80				0,01
80-90				0,01

(tabla G-4b)

EMULSION SIN LIOFILIZAR

(Temperatura 5 0C)

T (mes)	d(a/v) ± SD (µm)	r 10 ⁻⁴ (cm ²)	Se (cm ² /g)	St (cm ²)	¹⁴ N 10 glóbulos
0,25	1,43±0,52	0,715	47674,12	9537902,09	1,281
0,50	1,37±0,48	0,685	49762,04	9955620,43	1,689
1,00	1,41±0,56	0,705	48350,35	9673191,48	1,549
3,00	1,45±0,50	0,725	47016,55	9406344,82	1,424
10,00	1,70±0,52	0,850	40102,35	8023058,82	0,880
11,00	1,81±0,52	0,905	37665,19	7535469,60	0,732
12,00	1,82±0,57	0,910	37458,24	7494065,93	0,721

(tabla G-5)

EMULSION SIN LIOFILIZAR

(Temperatura 350C)

T (mes)	d(a/v) ± SD (µm)	r 10 ⁻⁴ (cm ²)	Se (cm ² /g)	St (cm ²)	¹⁴ N 10 glóbulos
0,25	1,29±0,45	0,645	54139,53	10831162,79	2,07
0,50	1,47±0,58	0,735	47510,20	9504897,95	1,40
1,00	1,68±1,50	0,840	41571,43	8316785,70	0,94
3,00	1,74±0,83	0,870	40137,93	8030000,00	0,84

(tabla G-6)

EMULSION SIN LIOFILIZAR

(Temperatura ambiente)

T (mes)	d(a/v) ± SD (µm)	r 10 ⁻⁴ (cm ²)	Se (cm ² /g)	St (cm ²)	N 10 ¹⁴ glóbulos
0,00	1,45±0,39	0,72	47655,17	9533793,10	1,44
0,25	1,43±0,50	0,715	48321,67	9667132,86	1,50
0,50	1,42±0,54	0,710	48661,97	9735211,26	1,54
0,75	1,43±0,49	0,715	48321,67	9667132,86	1,50
1,00	1,43±0,50	0,715	48321,67	9667132,86	1,50
3,00	1,51±0,50	0,755	45761,58	9154966,88	1,28
10,00	1,81±0,90	0,905	38176,79	7637569,06	0,74
11,00	1,84±0,92	0,920	37554,34	7513043,47	0,70
12,00	1,91±0,90	0,959	36027,1	7207507,82	0,62
13,00	2,01±0,53	1,005	34378,10	6877611,94	0,54

(tabla G-7)

EMULSION SIN LIOFILIZAR.TABLAS DE DISTRIBUCION EN NUMERO

DE GLOBULOS DE FASE INTERNA (%)

(Temperatura 50C)

Intervalo (µm)	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)						
	0,25	0,50	1,00	3,00	10,00	11,00	12,00
0-1	40,73	43,09	42,02	36,51	39,95	38,69	41,69
1-2	56,82	55,32	56,17	60,87	52,91	52,58	50,54
2-3	2,33	1,52	1,67	2,50	6,45	7,67	6,61
3-4	0,11	0,03	0,12	0,11	0,57	0,89	0,97
4-5	0,02	0,04	0,02	0,02	0,09	0,11	0,18
5-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,00
6-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,02	0,00

(tabla G-8)

EMULSION SIN LIOFILIZAR.TABLAS DE DISTRIBUCION EN NUMERO

DE GLOBULOS DE FASE INTERNA (%)

(Temperatura ambiente)

Intervalo (µm)	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)						
	0,25	0,50	1,00	3,00	10,00	11,00	12,,0
0-1	36,96	40,33	40,26	36,40	40,67	36,22	37,08
1-2	60,76	57,73	57,67	60,04	50,93	53,96	51,40
2-3	2,17	1,77	2,00	3,37	7,29	8,76	9,64
3-4	0,08	0,11	0,05	0,18	0,98	0,82	1,65
4-5	0,03	0,04	0,00	0,00	0,07	0,24	0,15
5-6	0,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,03	0,03
6-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00

(tabla G-9)

EMULSION SIN LIOFILIZAR. TABLAS DE DISTRIBUCION EN NUMERO

DE GLOBULOS DE FASE INTERNA (%)

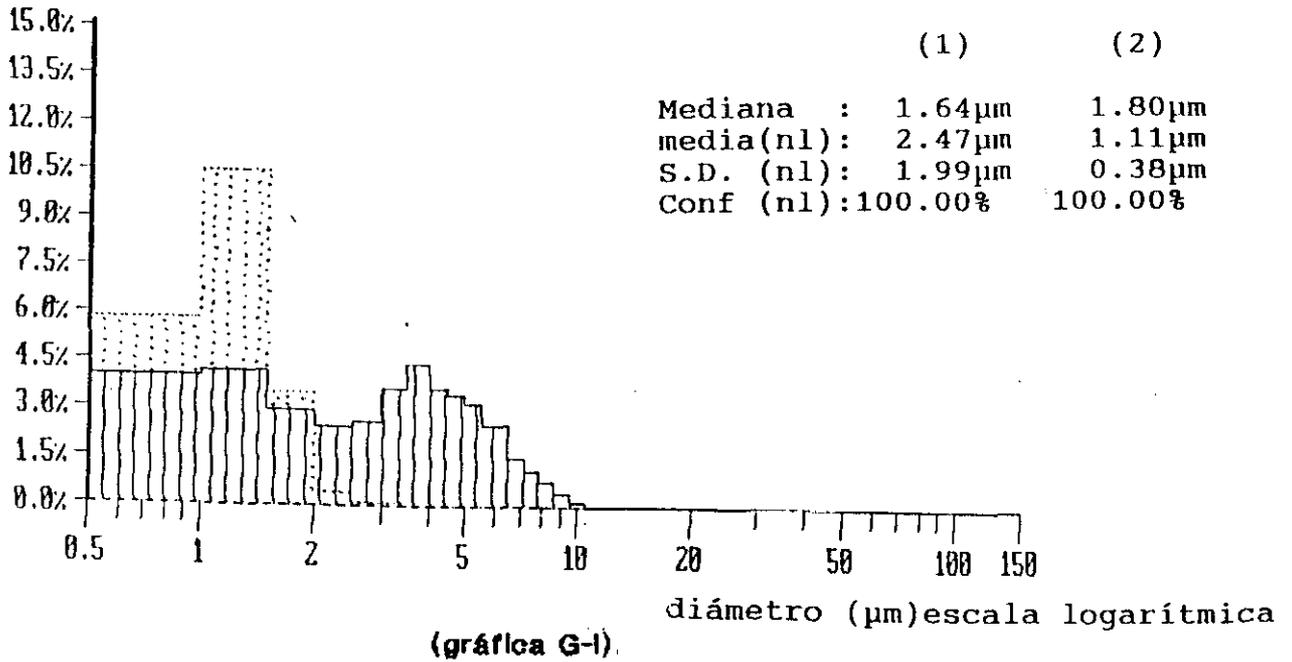
(Temperatura 45°C)

Intervalo (μm)	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (meses)			
	0,25	0,50	1,00	3,00
0-1	51,13	38,11	34,51	32,35
1-2	47,92	59,36	61,35	59,81
2-3	0,84	2,33	3,92	7,00
3-4	0,12	0,14	0,17	0,73
4-5	0,00	0,04	0,03	0,08
5-6	0,00	0,01	0,00	0,00
6-7	0,00	0,00	0,01	0,00

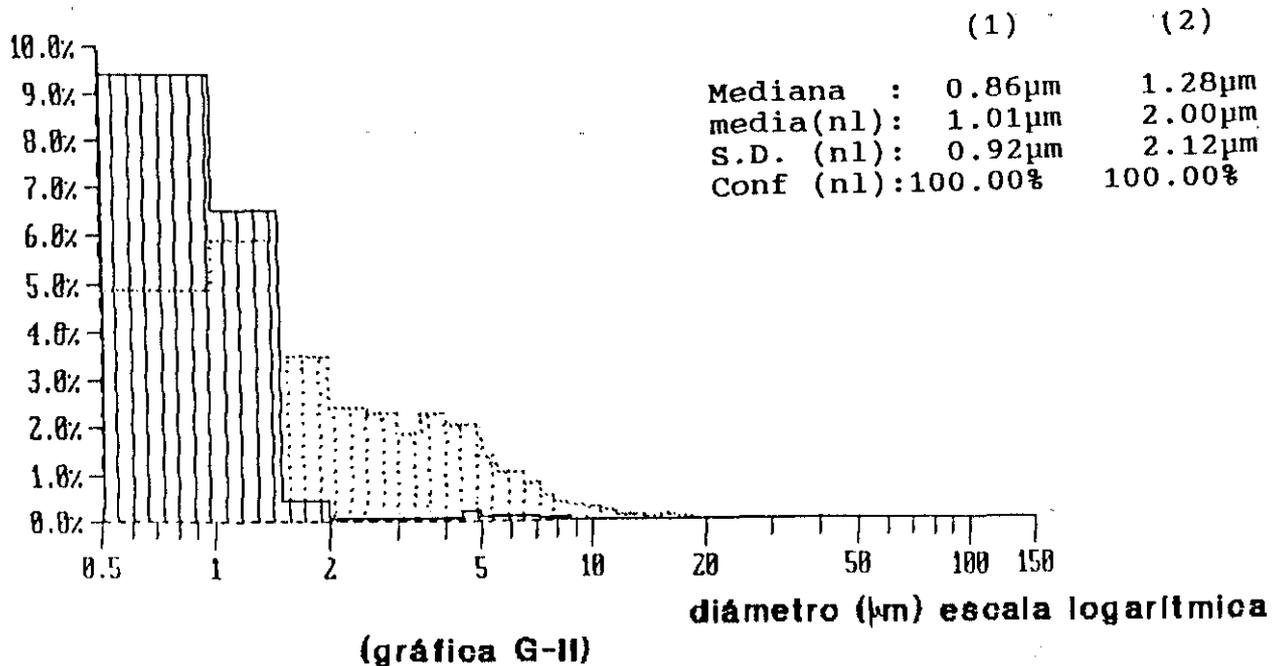
(Tabla G-10)

GRAFICA DENSIDAD.PROBABILIDAD EN NUMERO

---EMULSION LIOFILIZADA.POLITRON 3700 rpm 3 minutos (1)
EMULSION LIOFILIZADA.POLITRON 25000 rpm 3 minutos (2)

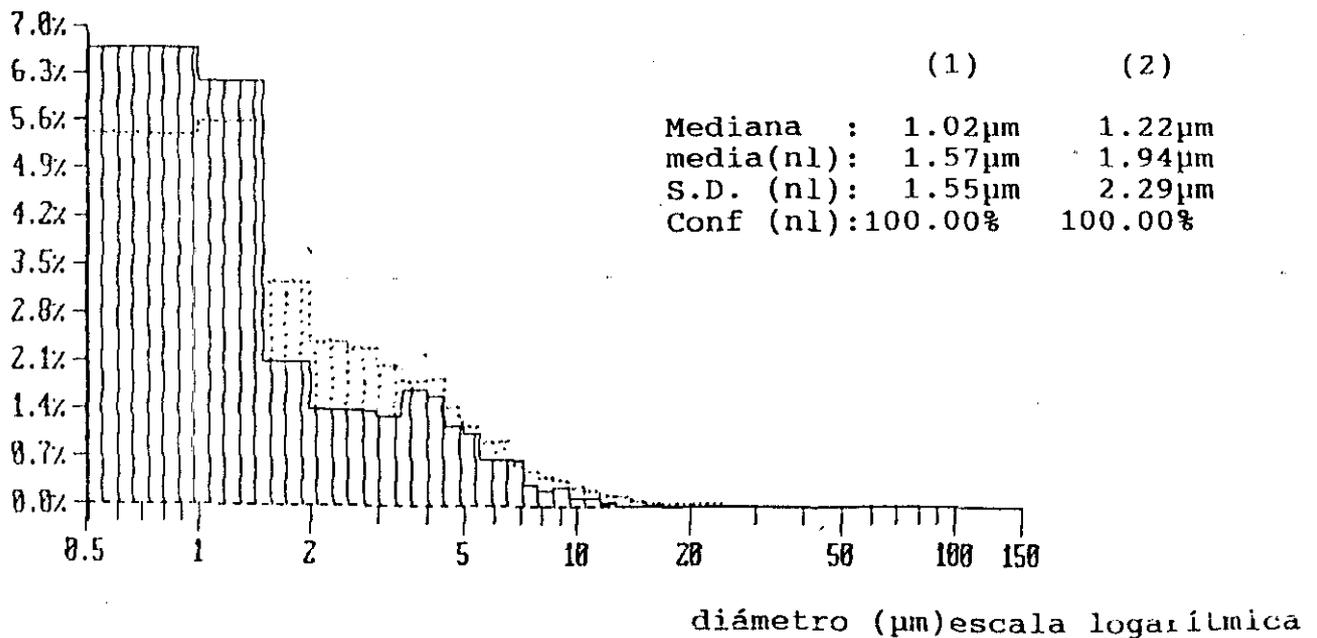


—EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA 60 minutos vel max (1)
EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA 60 minutos vel min (2)



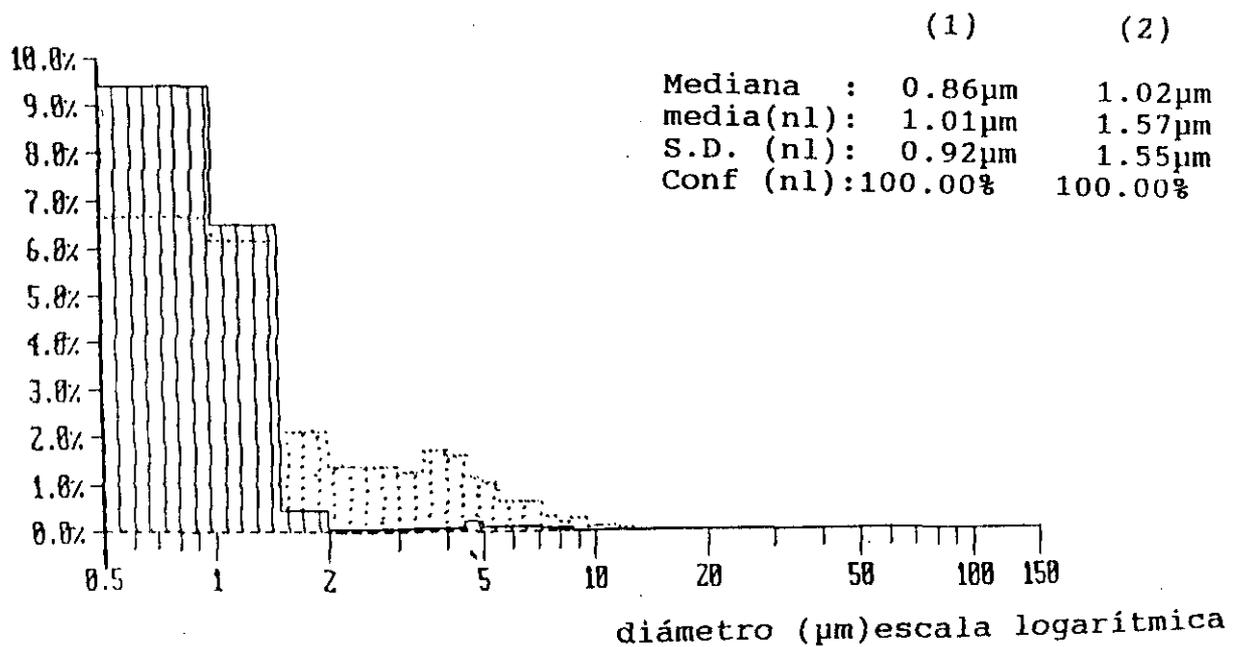
GRAFICA DENSIDAD.PROBABILIDAD EN NUMERO

— EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA 20 minutos.vel max(1)
 EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA 20 minutos.vel min(2)



(gráfica G-III)

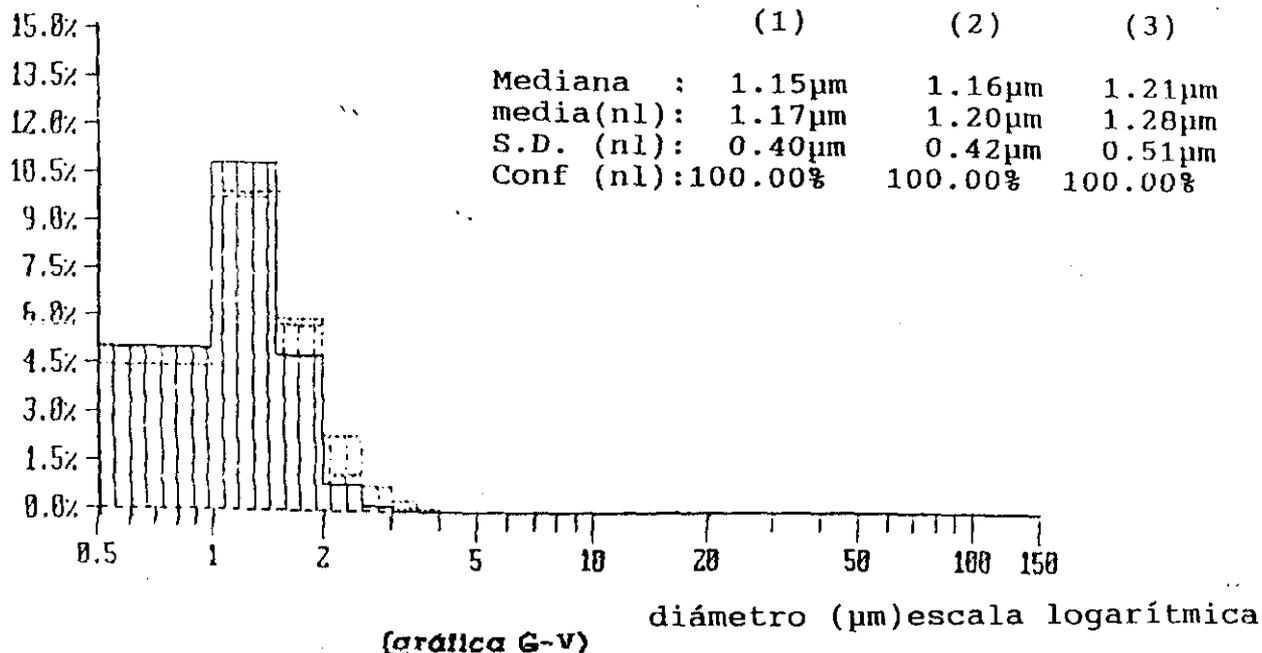
— EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA.60 minutos.vel max(1)
 EMULSION LIOFILIZADA.AGIT MAGNETICA 20 minutos.vel max(2)



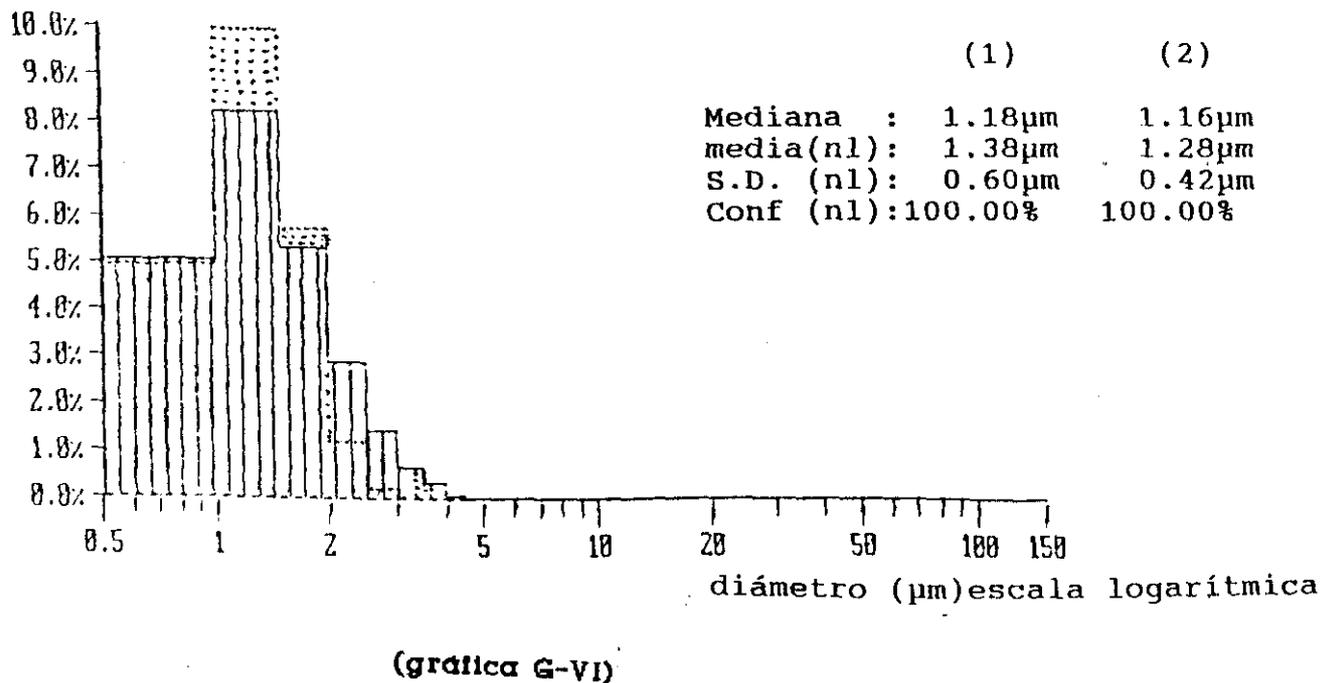
(gráfica G-IV)

GRAFICA DENSIDAD .PROBABILIDAD EN NUMERO

— EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° 5°C) .3 meses (1)
 EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° amb) .3 meses (2)
 --- EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° 45°C).3 meses (3)

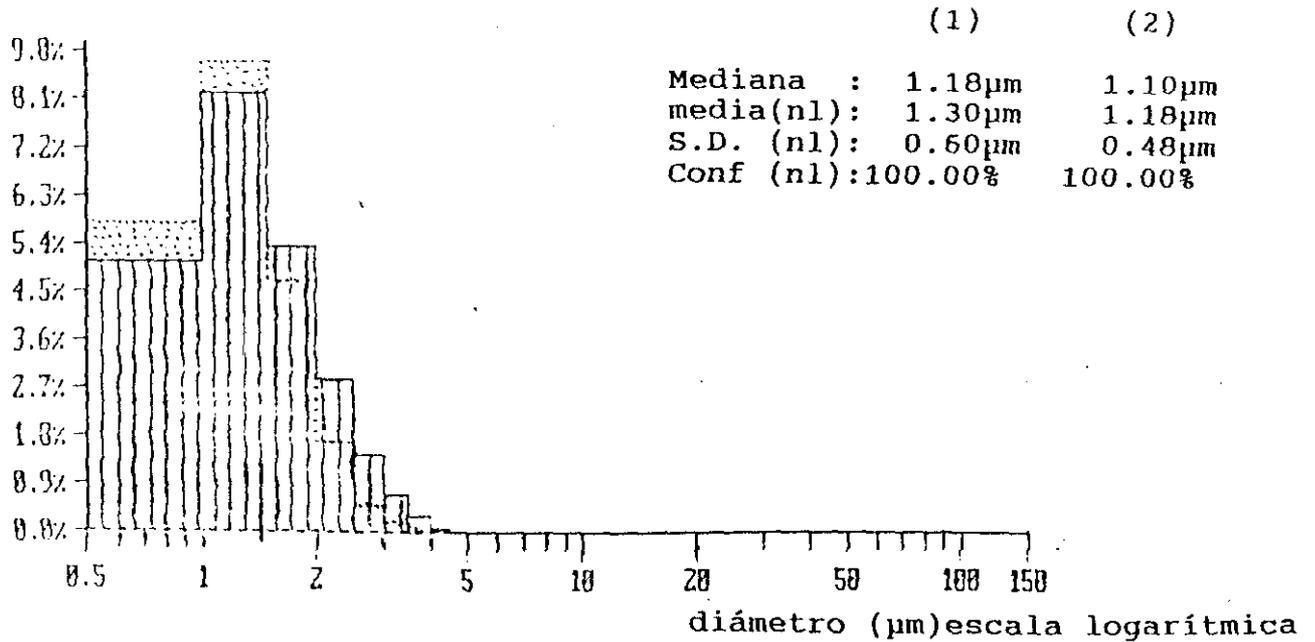


— EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° amb). 1 año (1)
 EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° amb). 3 meses (2)



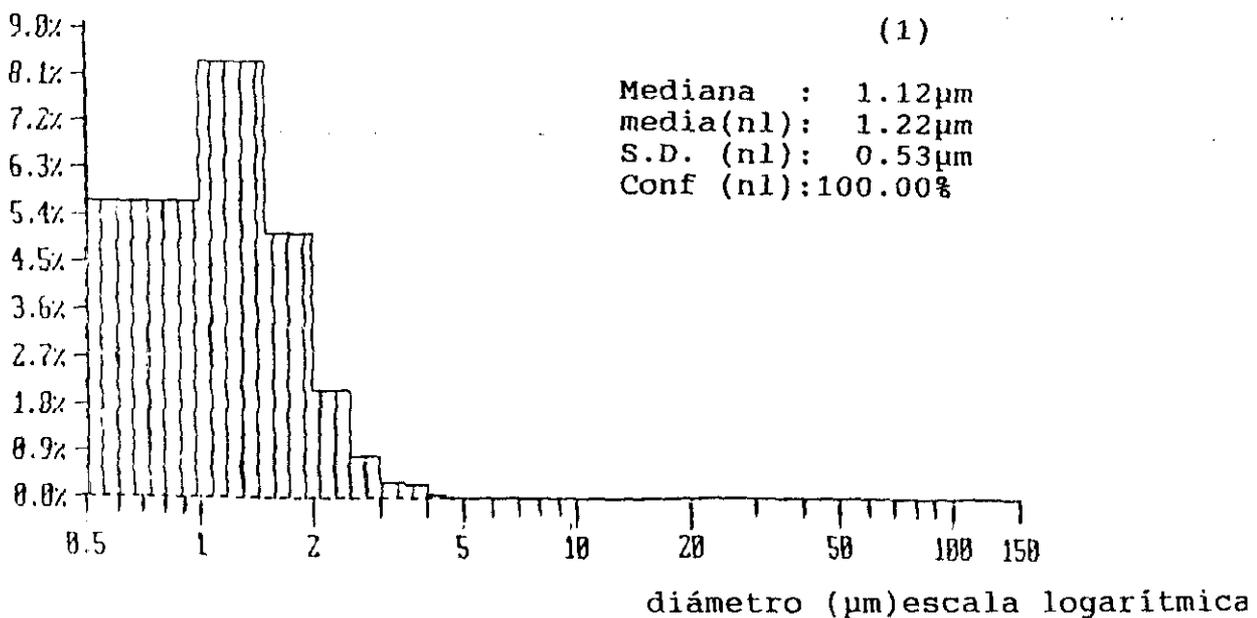
GRAFICA DENSIDAD .PROBABILIDAD EN NUMERO

— EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° amb). 1 año (1)
 ... EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° 5°C). 1 año (2)



(gráfica G-VII)

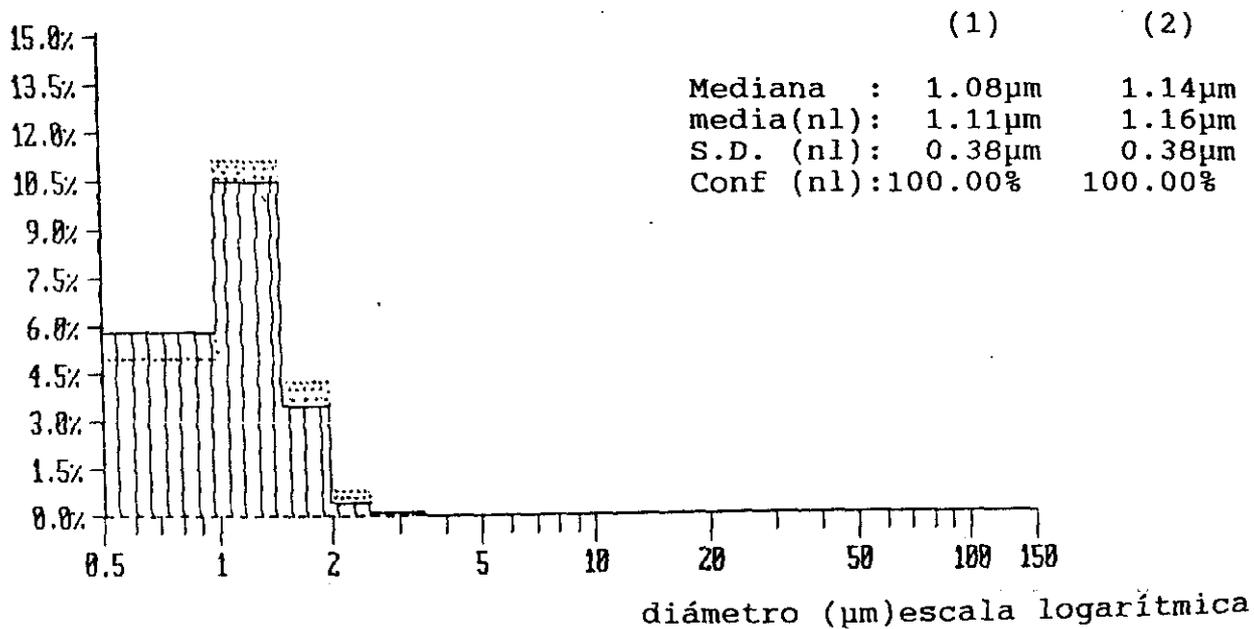
EMULSION SIN LIOFILIZAR . FASE CREMA



(gráfica G-VIII)

GRAFICA DENSIDAD .PROBABILIDAD EN NUMERO

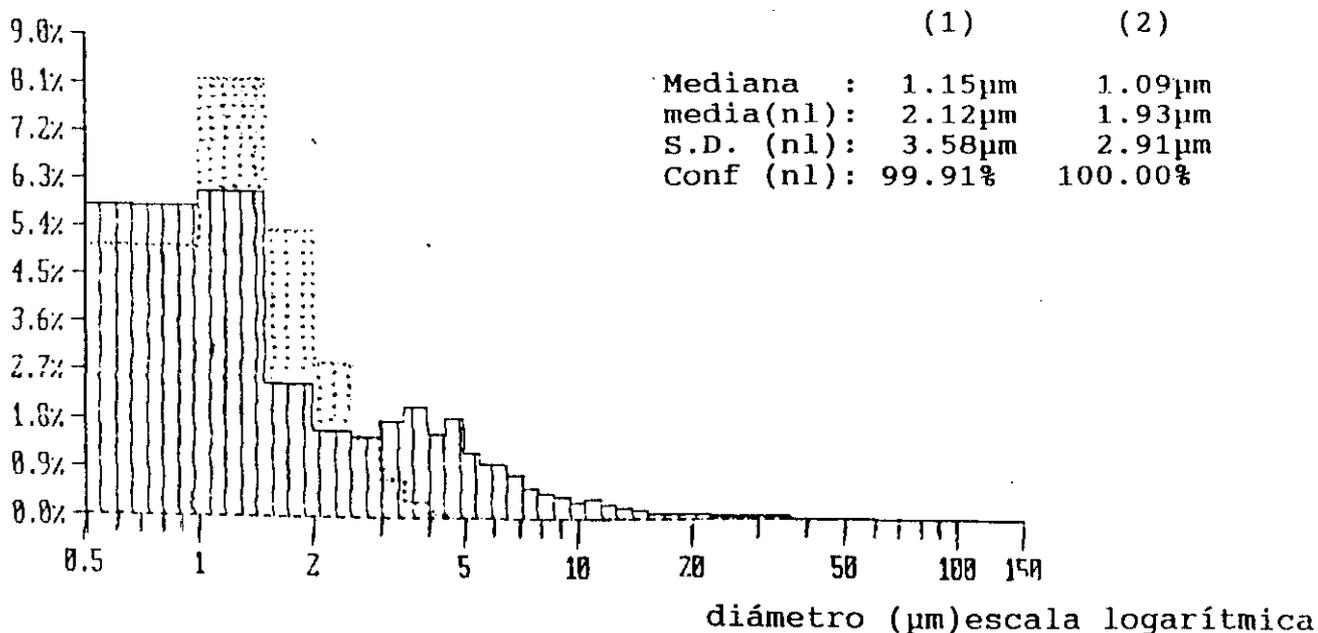
— EMULSION LIOFILIZADA.POLITRON 25000 rpm (1)
 EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° amb)(2)



(gráfica G-IX)

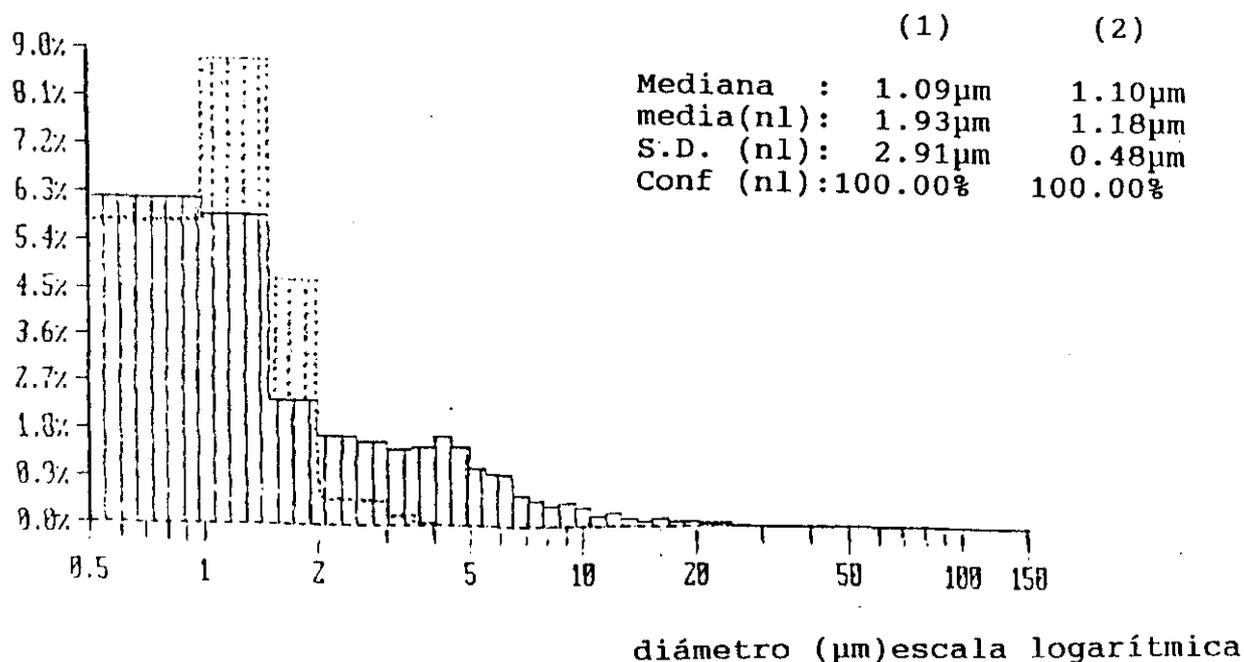
GRAFICA DENSIDAD. PROBABILIDAD EN NUMERO

— EMULSION LIOFILIZADA (T° amb) .1 año (1)
 EMULSION SIN LIOFILIZAR (T°amb). 1 año (2)



(gráfica G-X)

— EMULSION LIOFILIZADA (T° 5°C).1 año (1)
 EMULSION SIN LIOFILIZAR (T° 5°C). 1 año (2)



(gráfica G-XI)

Al cabo de tres meses, las superficies específicas toman el valor
 =====

temperatura 45 9C	40137,93 cm ² /g
temperatura ambiente.....	45761,89 "
temperatura 59C.....	47016,55 "

Transcurrido un año de almacenamiento
 =====

temperatura ambiente.....	36027,11 cm ² /g
temperatura 59C.....	41824,53 "

2g/La constante de desemulsificación se obtiene a través de la
 expresión:

$$K = \frac{(\log Se_i - \log Se_o)}{t} \quad 2,303$$

y según los datos granulométricos obtenidos a los tres meses de
 almacenamiento, se obtienen los siguientes valores en función de
 la temperatura.

temperatura 459C.....	1,92 10 ⁻³	10 ⁻¹ (dias)
temperatura ambiente.....	4,60 10 ⁻⁴	"
temperatura 59C.....	1,53 10 ⁻⁴	"

2h/El tiempo de vida media responde a la siguiente expresión matemática:

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{0,6932}{K}$$

y de acuerdo con los resultados anteriores sucede:

temperatura 45°C.....	361,04 días
temperatura ambiente....	1506,95 "
temperatura 50°C.....	4530,70 "

2i/A partir de los diez meses de almacenamiento, a temperatura ambiente y 50°C se aprecia una variación en los datos granulométricos y de acuerdo a esos resultados se calculan las siguientes constantes de desemulsificación

TEMPERATURA AMBIENTE

Tiempo de almacenamiento (meses)	:	10	11	12
Constante desemulsificación (10 ⁻⁴) (días ⁻¹):		7,44	7,25	7,80
$\bar{K} = 7,49 \cdot 10^{-4}$ (días ⁻¹)		=====		

TEMPERATURA 50C

Tiempo de almacenamiento (meses)	:	10	11	12
Constante desemulsificación (10 ⁻⁴) (días)	:	5,75	7,12	6,68
\bar{K}	:	6,51	10	(días)
=====				

De éstos resultados se calcula el tiempo de vida media de los sistemas emulsificados en función de la temperatura de almacenamiento.

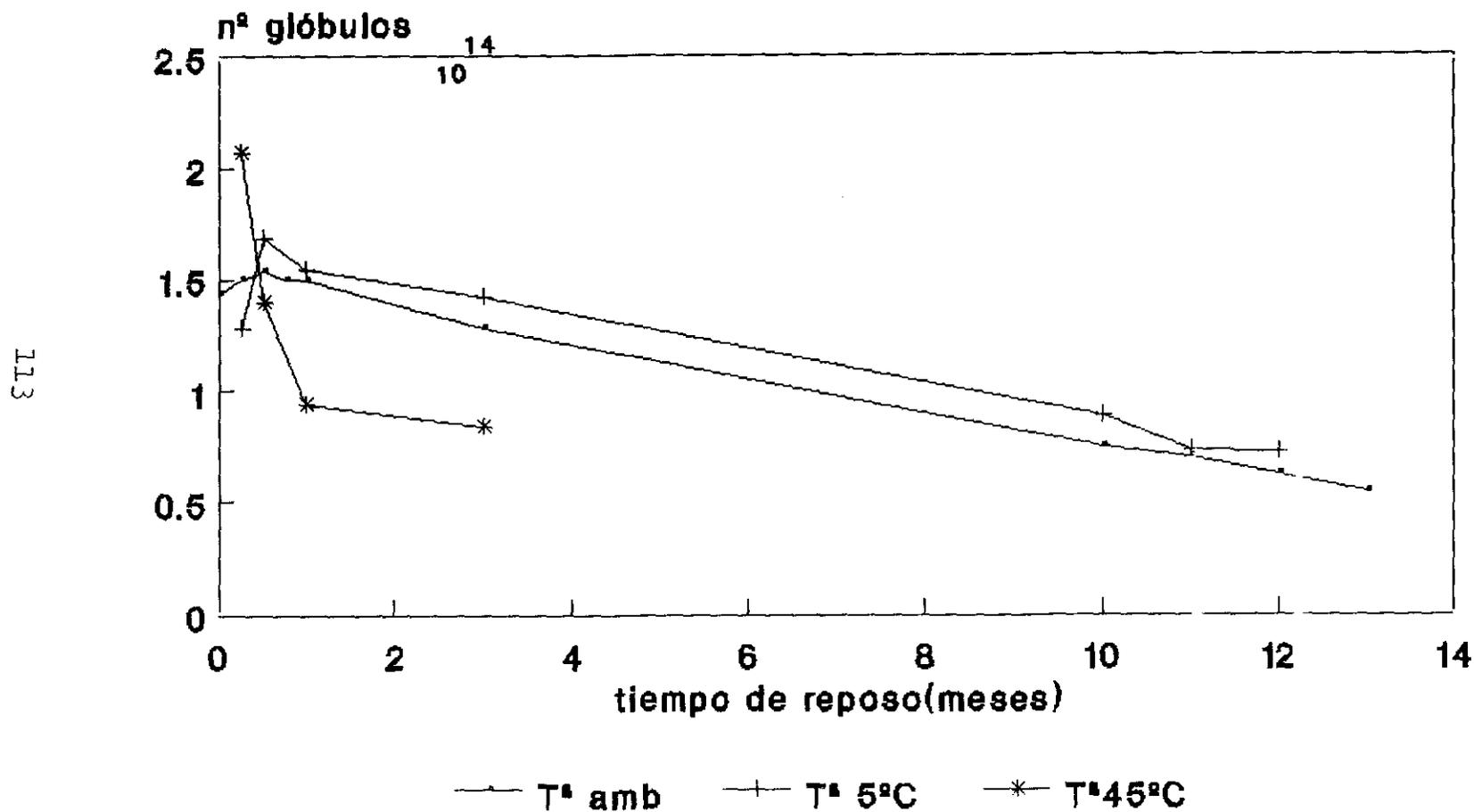
temperatura ambiente.....	925,50	días
temperatura 50C.....	1064,80	"

2j/La variación del número de glóbulos de fase interna es mayor a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento (tablas: G-5 G-6 G-7). (gráfica G-XII).

3/El análisis granulométrico realizado a una fase crema de una emulsión conservada durante dos años a temperatura ambiente, da un valor del diametro medio (a/v) de 1,73 micras (gráfica G-VIII).

4/Al regenerar la emulsión liofilizada con politrón a 25000 rpm, se llega a una granulometria semejante a la obtenida en la emulsión sin liofilizar; (gráfica G-IX), sin embargo, si la agitación es magnética, no solo se llega a mayor diametro de los glóbulos, si no que la homogeneidad de tamaños es menor: (gráficas G-X, G-XI).

EMULSION SIN LIOFILIZAR VARIACION DEL N° DE GLOBULOS CON EL ALMACENAMIENTO



(gráfica G-XII)

1.2.7.6. CONCLUSIONES

1/La emulsión se regenera a partir del sólido liofilizado al incorporar con agitación el agua perdida durante el proceso de liofilización .

2/El sistema liofilizado mantiene la capacidad de regeneración durante el periodo ensayado, e interesa conservarlo a temperaturas bajas (5 °C), a fin de que la granulometria de la emulsión regenerada varie lo menos posible.

3/Es conveniente regenerar el sistema liofilizado en iguales condiciones de agitación que las utilizadas al preparar la emulsión inicial, a fin de conseguir una granulometria y homogeneidad de tamaños semejante a los obtenidos en la emulsión sin liofilizar.

4/La estabilidad física de la emulsión sin liofilizar se demuestra por el pequeño tamaño de glóbulo de fase interna, practicamente inferior a 2 μm a lo largo de un año de almacenamiento a las temperaturas ensayadas.

5/Durante los tres primeros meses de almacenamiento apenas varia la superficie específica de los glóbulos de fase interna. Disminuye en un 15,77 % en el sistema emulsificado conservado a temperatura de 45°C. El mantenerlo a temperatura ambiente supone una reducción de un 3,97 % , mientras que solo disminuye en un

1,34 % si la temperatura de almacenamiento es de 50C.

La posible explicación se debe a que en ese periodo de tiempo, el porcentaje de glóbulos de menor tamaño: (0-1 μ m) aumentan, mientras que el porcentaje de glóbulos de mayor tamaño apenas se afectan.

6/En un año de almacenamiento, la superficie específica disminuye en un 24,40 % a temperatura ambiente y solo en un 12,23 % si la temperatura se reduce a 5 0C .

7/De los puntos (5) (6) se deduce que la variación de la superficie específica no es proporcional al tiempo de almacenamiento ensayado, la explicación parece encontrarse en el poder de detección del aparato de medida, lo que a su vez explica el hecho de que en el intervalo de 0-1 μ m el porcentaje en número de partículas varíe con el tiempo de almacenamiento . El rango de medida va desde 0.5-150 μ m, es por ello, por lo que partículas de tamaños inferiores no son detectadas en las primeras etapas de almacenamiento, sin embargo la evolución hacia tamaños mayores - permite que ciertas partículas comiencen a detectarse y quedar incluidas en ese intervalo .

Esto a su vez, justifica el error que se admitiría al considerar - como válidos los valores de $t_{\frac{1}{2}}$ calculados con los datos experimentales obtenidos durante los primeros noventa días .

Sin embargo la variación de superficie obtenida al cabo de un año de almacenamiento aporta un valor fiable a fin de calcular el tiem-

po de vida media del sistema emulsificado.

8/La inestabilidad física del sistema emulsificado aumenta al aumentar la temperatura y el periodo de almacenamiento, lo que queda totalmente demostrado por los siguientes hechos experimentales:

- Aumento en el diámetro medio (a/v)
- disminución de la superficie específica
- disminución en el número de glóbulos de fase interna
- aumento en la constante de desemulsificación
- disminución en el tiempo de vida media

1.2.8.VISCOSIDAD

1.2.8.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO

1.2.8.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

1.2.8.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES

1.2.8.4.RESULTADOS

1.2.8.5.CONCLUSIONES

1.2.8.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO

1/ -Evaluar la estabilidad física del sistema emulsificado según los resultados obtenidos en las medidas de viscosidad.

2/ -Estudiar la influencia de distintos factores, tales como:

2a/Temperatura de almacenamiento

2b/Envejecimiento del sistema

2c/Porcentaje de viscosizante

2d/Proceso de esterilización, así como el momento de llevarlo a cabo.

2e/Proceso de liofilización

3/ -Analizar el tipo de flujo que presenta el sistema

1.2.7.2. DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

Se utiliza un viscosímetro rotacional Brookfield modelo RTV . La velocidad de cizalla depende de la velocidad de giro del rotor y la fuerza de cizallamiento es proporcional al par de fuerzas que se determinan.

Para llevar a cabo las medidas, se acopla en el viscosímetro la varilla correspondiente de acuerdo a la viscosidad del sistema, se introduce con sumo cuidado para evitar la incorporación de burbujas de aire en el recipiente donde se encuentra la muestra problema termostatzada. Se mantiene en reposo quince minutos antes de comenzar las lecturas.

En el estudio reológico se somete a la muestra a distintas velocidades de cizalla: 0,5-1-2,5-5-10-20-50-100 rpm. Se comienza con la velocidad menor hasta llegar a la mayor, una vez alcanzada ésta última, se disminuye progresivamente hasta llegar a la inicial. Cada velocidad se mantiene dos minutos.

La influencia del tiempo de agitación se analiza al someter al sistema durante 60 minutos a una velocidad constante: 50 rpm. Se toman lecturas cada minuto durante los diez primeros minutos y cada cinco minutos a partir de ese momento. El sistema se mantiene termostatzado durante todo el proceso a la temperatura de almacenamiento de las muestras objeto de ensayo.

Las siguientes tablas y gráficos recogen los datos experimentales obtenidos durante el periodo de almacenamiento ensayado.

En cada tabla se detallan los siguientes conceptos:

-G(rpm)=velocidad de giro del viscosímetro

- η (po)=viscosidad ascendente, obtenida al aplicar velocidades de cizalla crecientes

- η (po)=viscosidad descendente, obtenida al aplicar velocidades de cizalla decrecientes

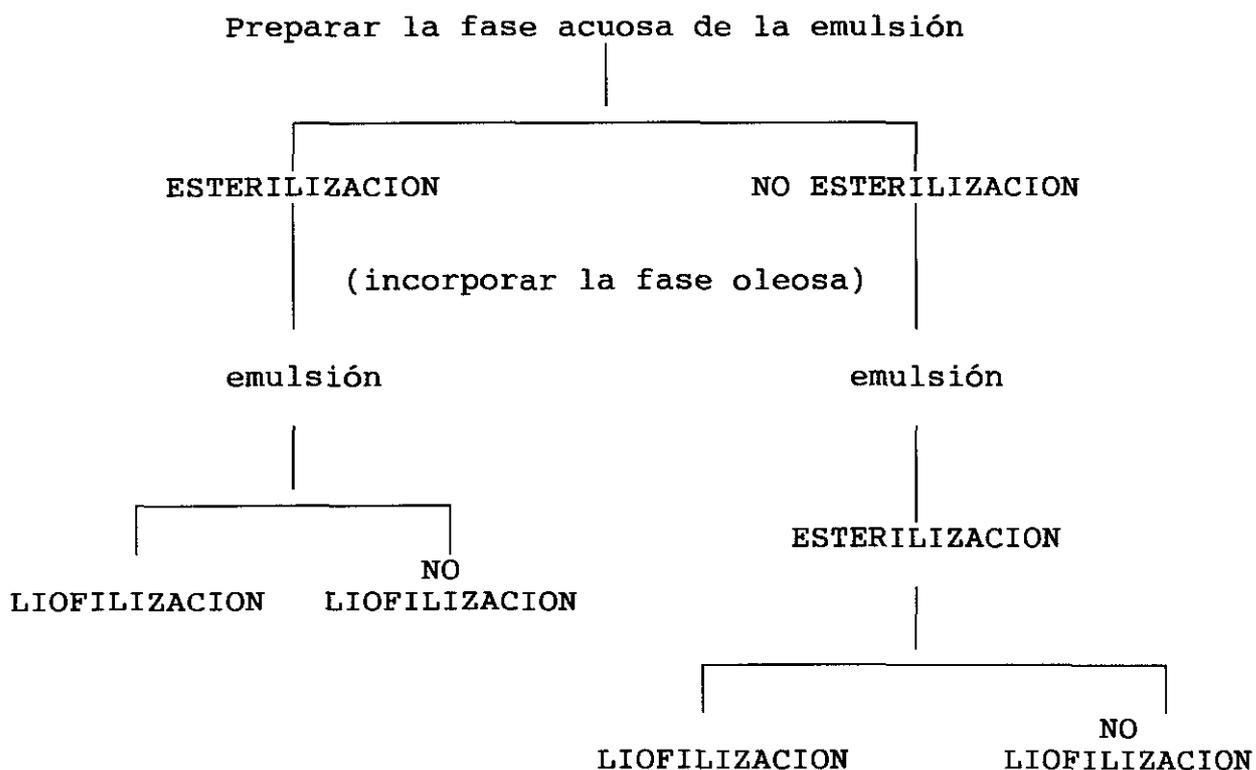
-F(dinas /cm²)=fuerza de cizalla que se ejerce sobre el sistema

El producto entre el valor leído en la escala del viscosímetro y un factor (dependiente de la aguja y de la velocidad de giro utilizada en cada momento), permite conocer la viscosidad en (cpo).

El producto de la viscosidad por la velocidad de giro corresponde al valor de la fuerza de cizalla.

1.2.7.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES

A fin de controlar todos aquellos factores que influyen de forma directa en las propiedades reológicas, se sigue la siguiente paúta de trabajo .



1/Una vez preparada la emulsión se envasa en recipientes de vidrio de igual forma y tamaño, con cierre hermético a fin de evitar la evaporación del agua y con ello, modificaciones en la concentración que afectan a la viscosidad del sistema. A su vez, el tamaño es el adecuado para permitir la lectura directa sin necesidad de trasvasar la muestra a otro recipiente en el momento

de medida.

2/Las muestras se almacenan a tres temperaturas: 45°C, ambiente y 5°C.

3/Se considera imprescindible un cierto periodo de reposo para que el sistema se estabilice, es por ello por lo que la primera lectura se realiza al día siguiente de la preparación. Las lecturas sucesivas se llevan a cabo transcurridos siete días de la anterior medida.

4/Durante las lecturas se mantiene termostaticado el sistema a la temperatura de almacenamiento.

5/El sistema liofilizado se conserva a 5 °C hasta el momento de su regeneración; proceso que se lleva a cabo con incorporación del agua perdida durante la liofilización.

La regeneración se realiza con agitación en un homogeneizador politrón a 25000rpm durante tres minutos. Se repite la agitación a los 30 y 60 minutos, se pretende con ello reproducir las condiciones de agitación utilizadas al preparar la emulsión de partida y analizar el posible efecto del proceso de liofilización.

Se deja reposar el sistema tres horas antes de llevar a cabo la primera lectura. La siguiente medida se realiza a las veinticuatro horas, durante ese periodo de tiempo el sistema emulsificado se mantiene a temperatura ambiente.

1.2.7.4.RESULTADOS

Las tablas que a continuación se exponen muestran el comportamiento reológico del sistema emulsificado en distintas condiciones de almacenamiento y elaboración.

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp 45°C.. 1,3% viscosizante,
 ----- Emulsion esterilizada
 aguja n°4

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	50,0	25	50,0	25
1,0	40,0	40	35,0	35
2,5	26,0	65	24,0	60
5,0	20,0	100	18,4	92
10	15,6	156	15,0	150
20	12,5	250	12,0	240
50	9,3	468	9,2	460
100	7,4	744	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	50,0	25	50,0	25
1,0	38,0	38	38,0	38
2,5	26,0	65	24,8	62
5,0	20,0	100	19,6	98
10	15,4	154	15,0	150
20	12,2	245	12,1	242
50	9,5	475	9,4	470
100	8,1	805	-	-

(tabla e-1)

(14 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	50,0	25	50,0	25
1,0	40,0	40	36,0	36
2,5	26,0	65	25,6	64
5,0	20,0	100	20,0	100
10	16,0	160	15,5	155
20	12,7	255	12,5	250
50	10,0	500	9,6	482
100	8,55	855	-	-

(21 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	50,0	25	50,0	25
1,0	40,0	40	36,0	36
2,5	26,0	65	25,6	64
5,0	20,0	100	20,0	100
10	16,0	160	16,0	160
20	13,0	260	12,8	256
50	10,6	530	10,1	505
100	8,8	880	-	-

(tabla e-1 continuación)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp ambiente..1,3% viscosizante
 ----- Emulsión esterilizada
 aguja nº 4

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	80,0	40	80,0	40
1,0	64,0	64	60,0	60
2,5	48,0	120	48,0	120
5,0	37,6	188	36,0	180
10	30,0	300	30,0	300
20	24,0	480	24,0	480
50	17,6	880	17,6	880
100	14,6	1460	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	100,0	50	100,0	50
1,0	76,0	76	80,0	80
2,5	56,0	140	57,6	144
5,0	44,0	220	44,8	224
10	36,4	364	37,0	370
20	31,0	620	30,2	604
50	24,4	1220	23,7	1188
100	19,3	1930	-	-

(tabla e -2)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales Temp 50C..1,3% viscosizante
 ----- Emulsión esterilizada
 aguja nº 5

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	160,0	80	152,0	76
1,0	140,0	140	120,0	120
2,5	102,4	256	88,0	220
5,0	80,0	400	70,4	352
10	62,0	620	56,0	560
20	47,0	940	44,4	888
50	34,4	1720	33,6	1680
100	26,0	2600	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	200,0	100
1,0	140,0	140	156,0	156
2,5	107,2	268	113,6	284
5,0	88,0	440	92,0	460
10	72,8	728	75,0	750
20	59,0	1180	60,0	1200
50	42,6	2130	42,6	2130
100	31,4	3140	-	-

(tabla e-3)

(14 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	180,0	90	180,0	90
1,0	150,0	150	150,0	150
2,5	112,0	280	108,0	270
5,0	88,0	440	88,0	440
10	70,0	700	73,0	730
20	59,0	1170	58,5	1180
50	42,2	2110	42,0	2100
100	31,2	3120	-	-

(21 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	180,0	90	180,0	90
1,0	144,0	144	144,0	144
2,5	108,0	270	108,0	270
5,0	92,0	460	89,6	448
10	72,0	720	73,0	730
20	60,0	1200	58,4	1168
50	42,8	2140	41,7	2088
100	31,6	3108	-	-

(tabla e-3 continuación)

(120 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	200,0	100	240,0	120
1,0	164,0	164	190,0	190
2,5	128,0	320	144,0	360
5,0	104,8	524	114,0	570
10	84,0	840	90,0	900
20	68,2	1364	69,8	1390
50	47,6	2380	47,4	2370
100	34,3	3430	-	-

(160 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	140,0	70	128,0	90
1,0	120,0	120	100,0	100
2,5	81,6	204	72,0	180
5,0	63,2	316	56,0	280
10	44,0	440	46,0	460
20	30,0	600	37,0	740
50	24,8	1240	27,2	1360
100	22,7	2270	-	-

(Tabla e-3 continuación)

(207 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	72,0	36	72,0	36
1,0	60,0	60	56,0	56
2,5	44,0	110	38,4	96
5,0	36,0	180	38,0	190
10	28,0	280	25,0	250
20	21,0	420	20,0	400
50	15,6	780	15,2	760
100	12,0	1200	-	-

(tabla e-3 continuación)

VISCOSIDAD -TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp 45°C..1,3% viscosizante
 ----- Esterilizada fase acuosa
 aguja nº 4

(1 día)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	60,0	30	76,0	38
1,0	50,0	50	58,0	58
2,5	38,0	95	39,2	98
5,0	30,0	150	30,0	150
10	25,0	250	24,4	244
20	21,8	436	20,0	400
50	17,8	890	17,1	858
100	13,8	1380	-	-

(7 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	72,0	36	80,0	40
1,0	60,0	60	62,0	62
2,5	46,0	115	44,8	112
5,0	39,8	199	36,0	180
10	36,2	362	31,0	310
20	31,4	628	27,0	540
50	22,7	1135	20,7	1035
100	16,5	1650	-	-

(tabla fa-1)

(14 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	76,0	38	80,0	40
1,0	60,0	60	65,0	65
2,5	44,8	112	44,8	112
5,0	37,6	188	37,6	188
10	35,0	350	32,0	320
20	31,0	620	27,5	550
50	22,8	1142	20,9	1045
100	16,7	1672	-	-

(21 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	80,0	40	90,0	45
1,0	65,0	65	70,0	70
2,5	47,2	118	48,0	120
5,0	38,0	190	39,0	195
10	35,5	355	33,5	335
20	32,0	640	28,5	570
50	23,4	1170	21,7	1084
100	17,2	1725	-	-

(tabla fa-1 continuación)

VISCOSIDAD -TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp ambiente..1,3% viscosizante
 ----- Esterilizada fase acuosa
 aguja nº 5

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	160,0	80	168,0	84
1,0	120,0	120	130,0	130
2,5	91,2	228	91,2	228
5,0	76,0	380	80,0	400
10	64,0	640	64,0	640
20	52,4	1048	52,0	1040
50	37,0	1850	36,5	1824
100	27,2	2720	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	240,0	120
1,0	144,0	144	184,0	184
2,5	126,4	316	137,6	344
5,0	106,0	530	108,0	540
10	77,0	770	83,2	832
20	61,0	1220	63,0	1260
50	43,0	2152	42,1	2104
100	30,2	3020	-	-

(tabla fa-2)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: temp 50C..1,3 % viscosizante
 ----- Esterilizada fase acuosa
 aguja nº 6

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	320,0	160	460,0	230
1,0	300,0	300	360,0	360
2,5	248,0	620	259,2	648
5,0	199,2	996	234,0	1170
10	145,0	1450	144,4	1444
20	105,0	2100	105,0	2100
50	66,1	3304	65,6	3280
100	>40	>4000	-	-

(14 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	300,0	150	550,0	275
1,0	300,0	300	420,0	420
2,5	250,0	625	280,0	700
5,0	198,0	990	210,0	1050
10	145,0	1450	150,0	1500
20	107,5	2150	107,5	2150
50	67,6	3380	67,4	3370
100	46,0	4600	-	-

(Tabla fa-3)

(21 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	380,0	190	580,0	290
1,0	325,0	325	450,0	450
2,5	270,0	675	300,0	750
5,0	210,0	1050	220,0	1100
10	159,0	1590	150,0	1500
20	113,7	2275	112,5	2250
50	70,0	3500	70,0	3500
100	48,0	4800	-	-

(28 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	380,0	190	650,0	325
1,0	360,0	360	490,0	490
2,5	290,0	725	324,0	810
5,0	230,0	1150	238,0	1190
10	169,0	1690	171,0	1710
20	120,0	2400	120,0	2400
50	73,8	3690	73,8	3690
100	49,9	4990	-	-

(Tabla fa-3 continuación)

(120 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	400,0	200	700,0	350
1,0	400,0	400	500,0	500
2,5	300,0	750	320,0	800
5,0	200,0	1000	225,0	1125
10	161,0	1610	157,5	1575
20	115,0	2300	112,5	2250
50	70,0	3500	68,5	3425
100	46,5	4650	-	-

(160 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	350,0	175	520,0	260
1,0	375,0	375	375,0	375
2,5	296,0	740	250,0	625
5,0	225,0	1125	180,0	900
10	157,5	1575	140,0	1400
20	114,0	2280	111,2	2225
50	67,0	3350	68,5	3425
100	45,0	4500	-	-

(tabla fa-3 continuación)

VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO DE AGITACION

Condiciones: Velocidad cizalla :50rpm ..Temperatura:ambiente

aguja n°5..1,3% viscosizante
Emulsión sin liofilizar
Esterilizada:fase acuosa

Tiempo de agitación(')	1 día	7 días	14 días
2	37,0	43,3	41,4
3	37,0	43,3	41,4
4	37,0	44,0	41,4
5	36,6	44,1	41,4
6	36,6	44,0	41,4
7	36,6	43,9	40,8
8	36,6	43,6	40,6
9	36,6	43,4	40,4
10	36,4	43,2	40,4
15	35,6	42,2	40,0
20	35,4	41,4	38,6
25	34,8	40,8	37,8
30	34,8	40,2	37,2
35	34,4	39,8	36,4
40	34,0	39,4	35,6
45	33,8	39,0	34,8
50	33,6	38,8	34,5
55	33,6	38,4	34,0
60	33,6	438,2	33,4

(tabla fa-4)

VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO DE AGITACION

Condiciones: Velocidad cizalla :50rpm ,Temperatura:50C

 aguja n°6 ; 1,3% viscosizante
 Emulsión sin liofilizar Esterilizada:fase acuosa

Tiempo de agitación(')	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
2	59,4	62,0	62,4	66,0	65,8
3	59,6	62,8	62,4	66,5	66,0
4	59,6	62,8	62,4	65,5	65,5
5	59,6	62,8	61,8	65,5	65,5
6	59,4	62,8	61,8	65,5	65,5
7	59,3	62,8	61,8	65,0	65,5
8	59,1	62,8	61,8	65,0	65,5
9	59,0	62,5	61,8	65,0	65,0
10	58,6	62,3	61,8	65,0	65,0
15	57,6	61,8	61,8	64,8	64,5
20	56,0	60,0	60,4	64,8	63,2
25	56,5	58,8	60,0	64,8	62,5
30	55,0	58,0	59,6	64,8	62,0
35	54,0	57,2	57,6	64,0	61,0
40	53,5	56,7	58,0	63,0	60,0
45	52,8	55,8	58,0	63,0	59,8
50	52,0	55,4	57,0	62,0	59,0
55	50,6	55,0	54,0	61,2	58,5
60	49,6	55,04	55,5	61,0	57,5

(tabla fa-5)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales : Temp 45°C..1,5% viscosizante
 ----- Emulsión esterilizada
 aguja nº 3

(1 día)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	40,0	20	40,0	20
1,0	35,0	35	32,5	32,5
2,5	24,0	60	23,0	57,5
5,0	19,0	95	18,4	92
10	15,0	150	14,7	147,5
20	12,2	245	12,1	242
50	9,5	477,5	9,4	472,5
100	7,7	775	-	-

(7 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	52,0	26	50,0	25
1,0	42,0	42	37,5	37.5
2,5	28,4	71	27,6	69
5,0	21,8	109	21,5	107.5
10	17,5	175	17,5	175
20	14,6	292.5	14,2	285
50	12,3	615	11,3	565
100	9,9	995	-	-

(tabla e-4)

(14 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	58,0	29	55,0	27
1,0	44,0	44	42,0	42
2,5	31,6	79	30,4	76
5,0	23,5	117	23,8	119
10	19,5	195	19,3	193
20	17,4	349	16,0	320
50	14,2	710	13,2	662,5
100	>10	>1000	-	-

(tabla e-4 continuación)

VISCOSIDAD -TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales : Temp ambiente..1,5% viscosizante
Emulsión esterilizada
aguja nº 5

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	80,0	40	80,0	40
1,0	64,0	64	64,0	64
2,5	48,0	120	46,4	116
5,0	38,0	190	36,0	180
10	31,0	310	30,0	300
20	25,0	500	24,4	488
50	19,1	956	18,8	940
100	16,0	1600	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	100,0	50	100,0	50
1,0	80,0	80	80,0	80
2,5	57,6	144	56,0	140
5,0	46,0	230	44,8	224
10	38,4	384	37,6	376
20	34,0	850	32,2	805
50	27,0	1350	26,0	1300
100	20,9	2090	-	-

(Tabla e-5)

(21 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	100,0	50	100,0	50
1,0	80,0	80	80,0	80
2,5	62,4	156	62,4	156
5,0	52,0	260	50,0	250
10	42,4	424	43,0	430
20	38,0	760	37,0	740
50	29,8	1490	29,0	1450
100	23,3	2328	-	-

(28 días)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	100,0	50	120,0	60
1,0	80,0	80	90,0	90
2,5	64,0	160	64,0	160
5,0	52,0	260	52,0	260
10	44,0	440	45,0	451,2
20	39,0	780	39,0	780
50	30,0	1530	30,0	1530
100	23,8	2380	-	-

(tabla e-5 continuación)

VISCOSIDAD -TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales : Temp 50C ...1,5% viscosizante
 ----- Emulsión esterilizada
 aguja nº 5

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	168,0	84
1,0	140,0	140	140,0	140
2,5	104,0	260	104,0	260
5,0	86,0	430	84,0	420
10	70,0	700	68,0	680
20	56,0	1120	55,5	1110
50	42,8	2140	42,0	2100
100	32,6	3260	-	-

(7 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	180,0	90	180,0	90
1,0	144,0	144	140,0	140
2,5	113,6	284	108,8	272
5,0	92,0	460	90,0	450
10	77,0	770	75,6	756
20	64,5	1290	61,8	1236
50	46,7	2336	45,4	2272
100	34,7	3470	-	-

(Tabla e-6)

(14 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	192,0	96
1,0	140,0	140	150,0	150
2,5	108,0	272	116,0	290
5,0	92,0	460	95,2	476
10	77,6	776	80,0	800
20	65,2	1304	64,5	1290
50	47,8	2390	47,0	2350
100	35,6	356	-	-

(21 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	200,0	100
1,0	140,0	140	164,0	164
2,5	112,0	280	128,0	320
5,0	96,0	480	105,9	529,6
10	83,2	832	88,0	880
20	70,0	1400	70,0	1400
50	50,4	2520	50,2	2510
100	37,4	3740	-	-

(Tabla e-6 continuación)

(120 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	180,0	90	280,0	140
1,0	160,0	60	250,0	210
2,5	140,0	350	150,0	375
5,0	122,0	610	122,0	610
10	90,0	900	91,0	910
20	62,5	1250	68,7	1375
50	44,0	2200	48,0	2400
100	36,0	3600	-	-

(160 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	100,0	50	100,0	50
1,0	100,0	100	75,0	75
2,5	90,0	225	60,0	150
5,0	70,0	350	50,0	250
10	50,0	500	40,0	400
20	35,0	700	33,7	675
50	24,5	1225	24,0	1200
100	20,0	2000	-	-

(Tabla e-6 continuación)

VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO DE AGITACION

Condiciones: Velocidad cizalla :50rpm .Temperatura:50C

aguja n05 ..1,5% viscosizante
Emulsión sin liofilizar.Emulsión esterilizada

Tiempo de agitación(')	70 dia	140 dia
2	52,6	53,8
3	52,6	53,4
4	52,6	53,7
5	52,4	53,8
6	51,8	53,8
7	51,4	53,8
8	51,3	53,6
9	51,3	53,6
10	51,0	53,6
15	49,2	53,0
20	47,9	52,2
25	46,8	51,0
30	46,3	50,5
35	45,8	49,8
40	45,4	49,0
45	45,1	48,6
50	44,4	47,8
55	44,2	47,0
60	43,8	46,5

(Tabla e-7)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp.ambiente..1,3% viscosizante

aguja n^o 5 Emulsión liofilizada
esterilizada fase acuosa

(1 dia)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	168,0	84	144,0	72
1,0	136,0	136	116,0	116
2,5	92,8	232	86,4	216
5,0	71,2	356	68,0	340
10	54,4	544	53,6	536
20	41,2	824	41,2	824
50	28,8	1440	28,5	1424
100	21,0	2100	21,0	2100

(2 dias)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	140,0	70	140,0	70
1,0	116,0	116	112,0	112
2,5	88,0	220	84,0	210
5,0	68,8	344	64,8	324
10	55,6	556	51,2	512
20	44,2	884	40,0	800
50	31,0	1950	29,2	1460
100	22,4	2240	22,4	2240

(Tabla fa-6)

VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO DE AGITACION

Condiciones: Velocidad cizalla :50rpm .Temperatura:ambiente

aguja n°6; 1,3% viscosizante
Emulsión Liofilizada.Esterilizada:fase acuosa

Tiempo de agitación(')	24 horas	48 horas
2	31,5	33,0
3	32,2	33,4
4	31,8	33,0
5	32,2	31,5
6	31,8	31,0
7	32,0	30,5
8	32,0	30,5
9	32,0	30,5
10	31,6	30,2
15	31,6	30,0
20	31,6	29,6
25	31,2	29,0
30	31,2	29,0
35	31,2	28,5
40	31,2	28,5
45	30,8	28,5
50	30,8	28,5
55	30,4	28,4
60	30,4	28,4

(Tabla fa-7)

VISCOSIDAD-TIEMPO DE ALMACENAMIENTO

Condiciones experimentales: Temp. ambiente..1,5% viscosizante
----- Emulsión liofilizada y esterilizada
aguja nº 5

(1ª lectura)

VELOCIDAD G(rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	120,0	60	112,0	56
1,0	100,0	100	80,0	80
2,5	72,0	180	64,0	160
5,0	56,0	280	52,0	260
10	44,0	440	42,0	420
20	35,0	700	34,0	680
50	25,6	1280	25,2	1260
100	20,0	2000	20,0	2000

(tabla e-8)

A continuación se analizan los diferentes parámetros objeto de estudio.

-10/INFLUENCIA DEL MOMENTO EN QUE SE LLEVA A CABO EL PROCESO DE

ESTERILIZACION (Emulsión sin liofilizar)

Las tablas (e:1-6),(fa:1-3), registran los datos obtenidos durante el periodo de almacenamiento del sistema a las temperaturas - ensayadas: 45°C, ambiente, 5°C

Independientemente de la temperatura de ensayo sucede:

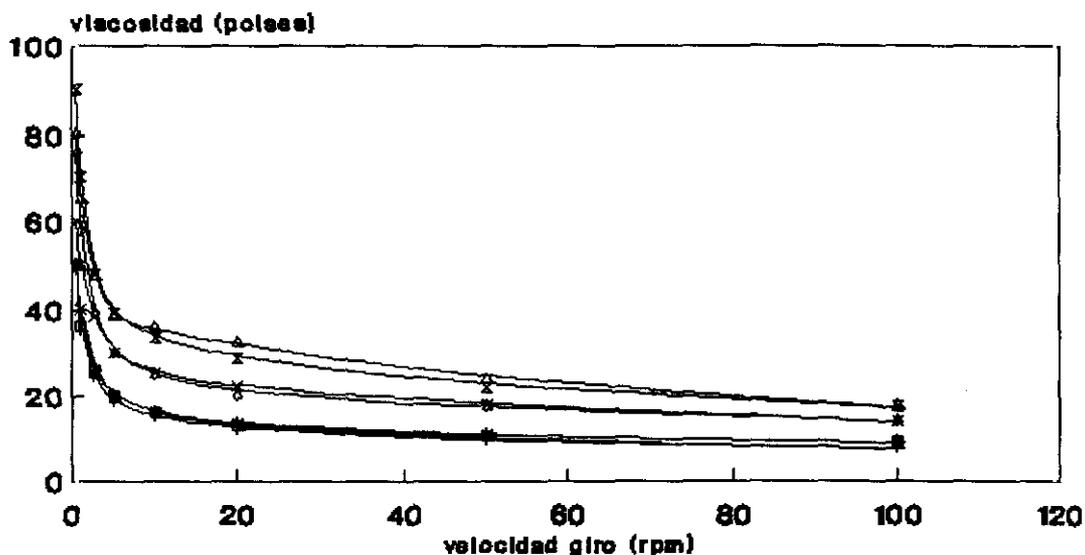
-Siempre que el proceso de esterilización se lleve a cabo en la emulsión, se observa un descenso de viscosidad respecto de los datos que se obtienen en caso de esterilizar la fase acuosa.gráficas: (Ia),(IIa),(IIIa).

-Se detecta un aumento de la viscosidad durante el periodo de almacenamiento, mas acusado en caso de esterilizar la fase acuosa. gráficas:(Ia),(IIa),(IIIa)

-Independientemente del momento en que se realiza el proceso de esterilización, el sistema se comporta como fluido pseudoplástico.

-La tixotropia aumenta con la temperatura y el periodo de almacenamiento así como, con el hecho de esterilizar la fase acuosa. gráficas:(Ib),(IIb),(IIIb).

VARIACION DE VISCOSIDAD CON EL TIEMPO Y EL MOMENTO DE ESTERILIZACION

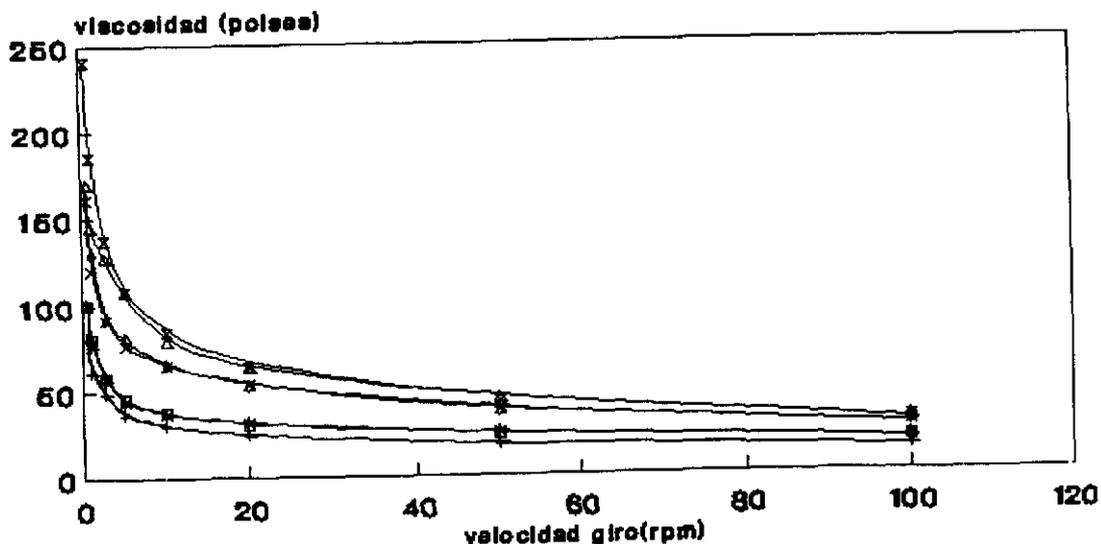


— emulsión (1)(1ª) —+ emulsión (2)(1ª) * emulsión (1)(21ª) —□ emulsión (2)(21ª)
 × f.acuosa (1)(1ª) —◊ f.acuosa(2)(1ª) —△ f.acuosa(1)(21ª) —⊠ f.acuosa(2)(21ª)
 (1ª) primer día (21ª) vigesimo primer día
 (1) velocidades crecientes (2) velocidades decrecientes

TEMPERATURA 46°C

(gráfica 1a)

VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO Y EL MOMENTO DE ESTERILIZACION

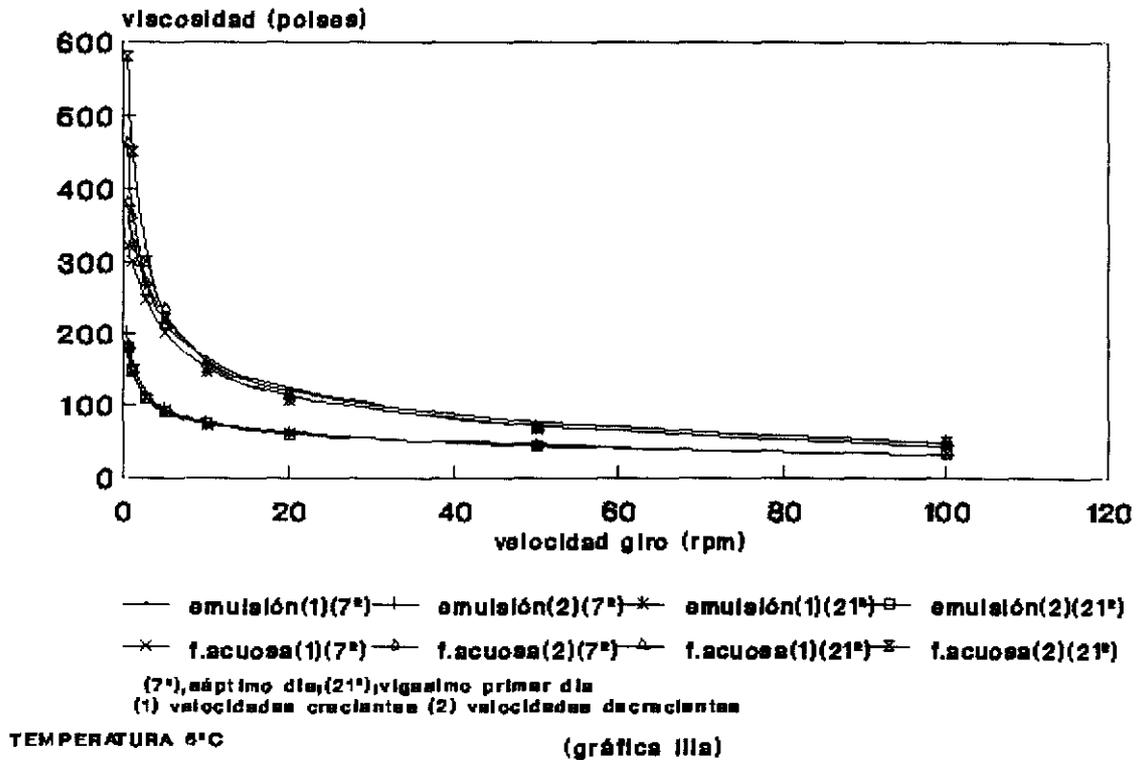


— emulsión(1)(1ª) —+ emulsión(2)(1ª) * emulsión(1)(7ª) —□ emulsión(2)(7ª)
 × f.acuosa(1)(1ª) —◊ f.acuosa(2)(1ª) —△ f.acuosa(1)(7ª) —⊠ f.acuosa(2)(7ª)
 (1ª) primer día (7ª) septimo día
 (1) velocidades crecientes (2) velocidades decrecientes

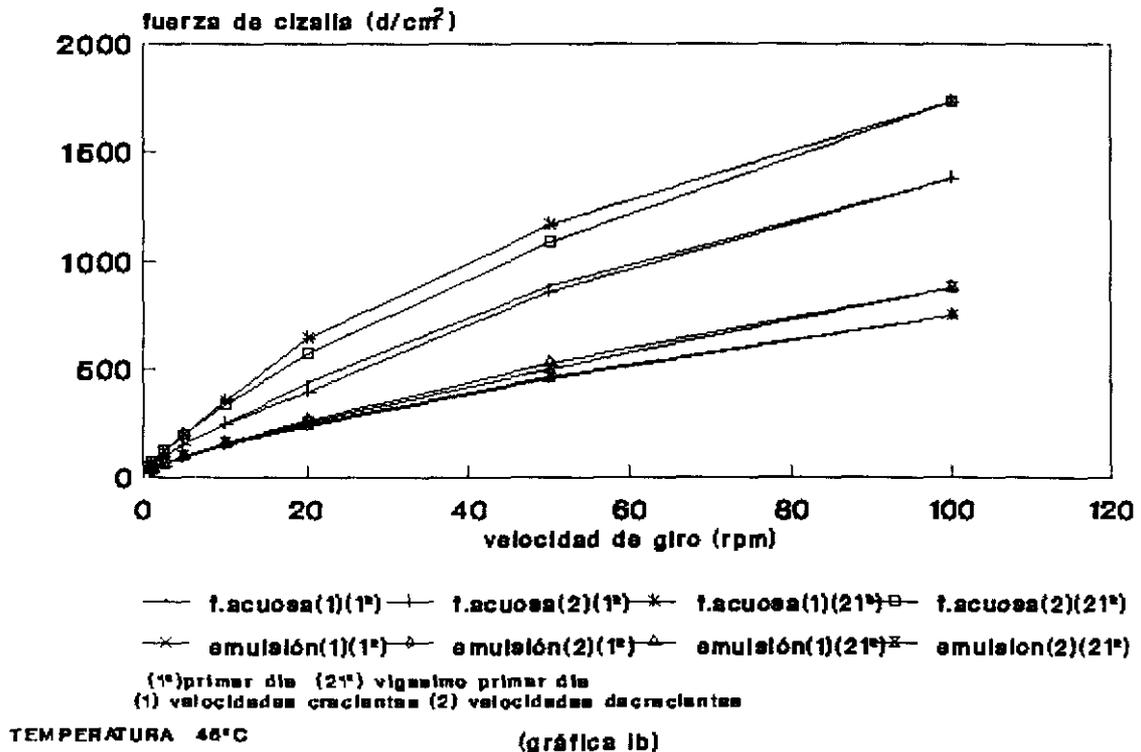
TEMPERATURA AMBIENTE

(gráfica 1b) 150

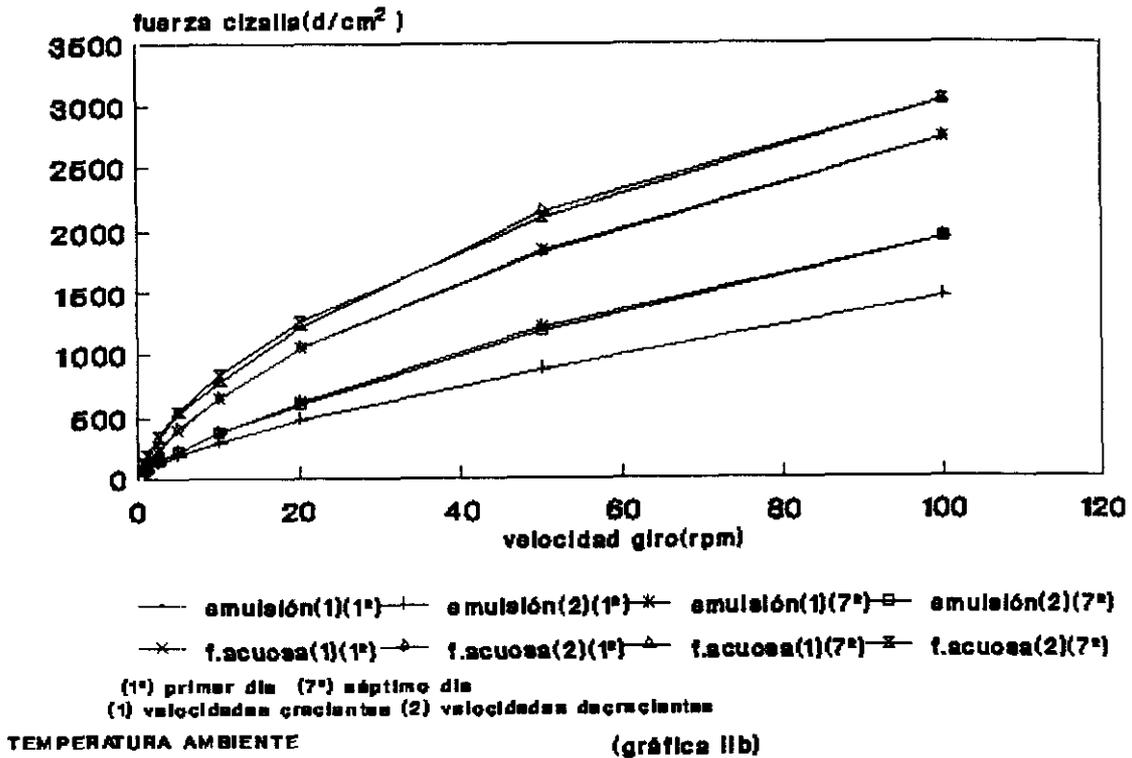
VARIACION DE LA VISCOSIDAD CON EL TIEMPO Y EL MOMENTO DE ESTERILIZACION



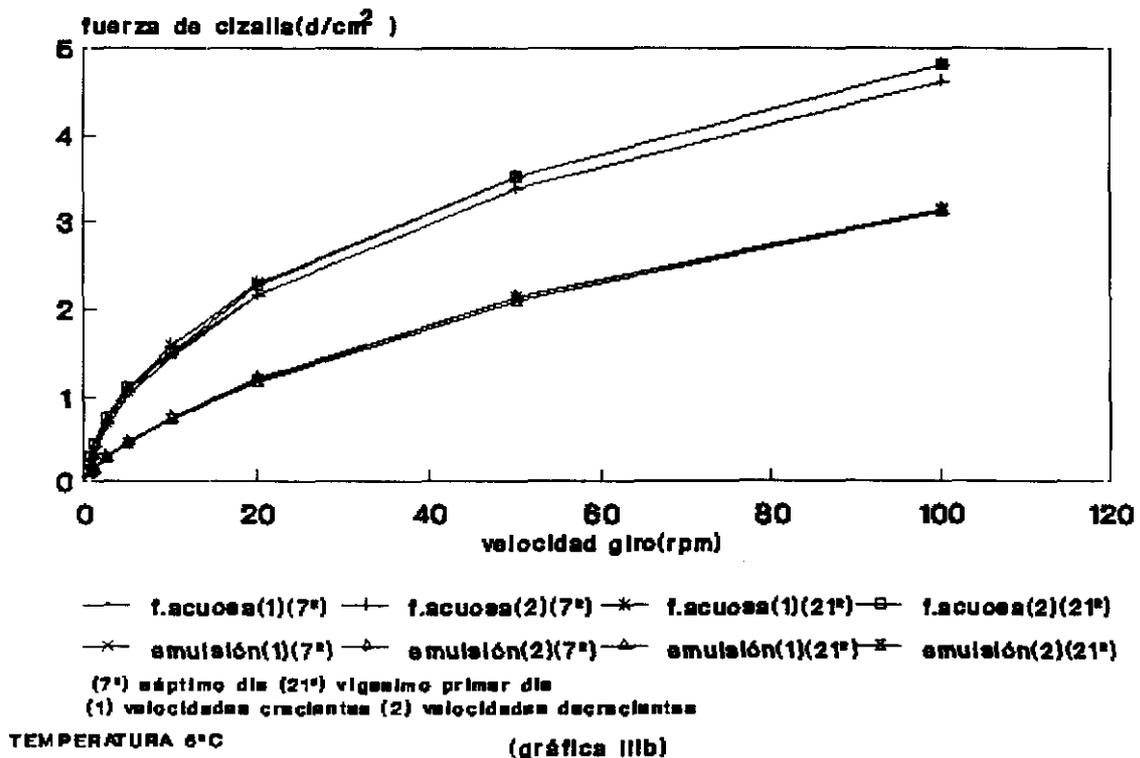
REOGRAMA. INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO Y EL MOMENTO DE LA ESTERILIZACION



REOGRAMA INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO Y EL MOMENTO DE LA ESTERILIZACION



REOGRAMA INFLUENCIA DEL ALMACENAMIENTO Y EL MOMENTO DE LA ESTERILIZACION



-La viscosidad disminuye al aumentar la temperatura de almacenamiento.

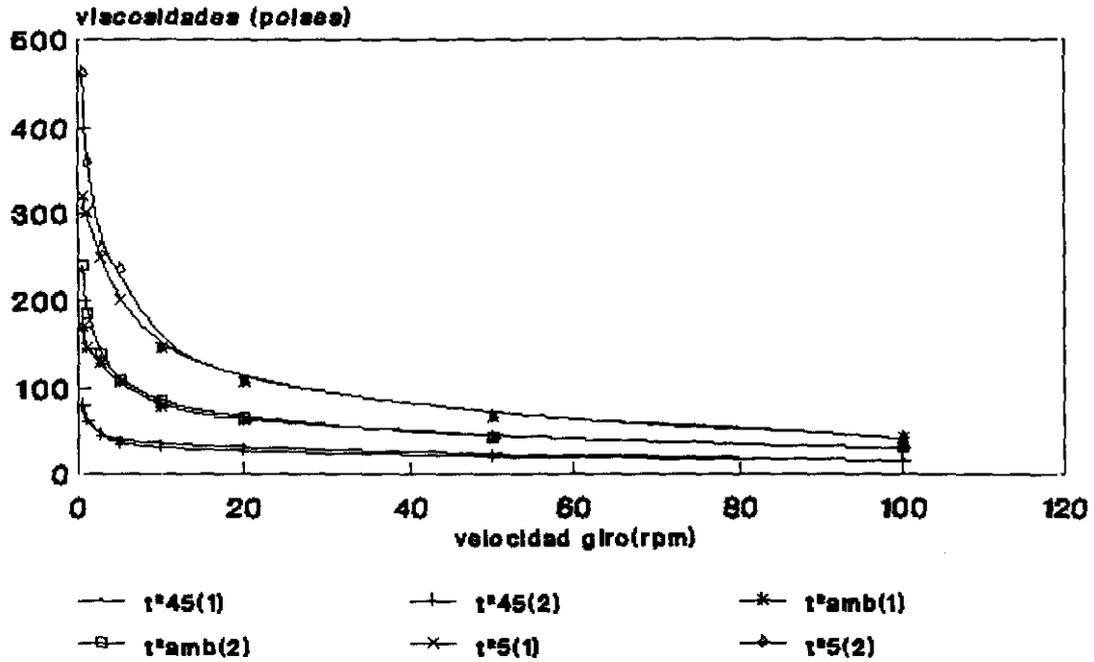
ESTERILIZACION	VISCOSIDAD (Po) (100 rpm)		
	T _a 45°C	T _a amb	T _a 5°C
emulsión	8,05	19,30	31,40
fase acuosa	16,50	30,20	>40,00

Las gráficas :(IV),(V), muestran la disminución de la viscosidad con la temperatura en sistemas en los que el proceso de esterilización se lleva a cabo en el mismo momento .

-La variación de viscosidad durante el periodo de almacenamiento depende del momento en que se realice el proceso de esterilización.

-Si el proceso de esterilización se realiza en el sistema emulsificado la variación es menor a mayor temperatura.gráficas:(I), (VII),(VIII).En caso de esterilizar la fase acuosa, la viscosidad se modifica menos al disminuir la temperatura de almacenamiento. gráficas: (IX),(X),(XI).

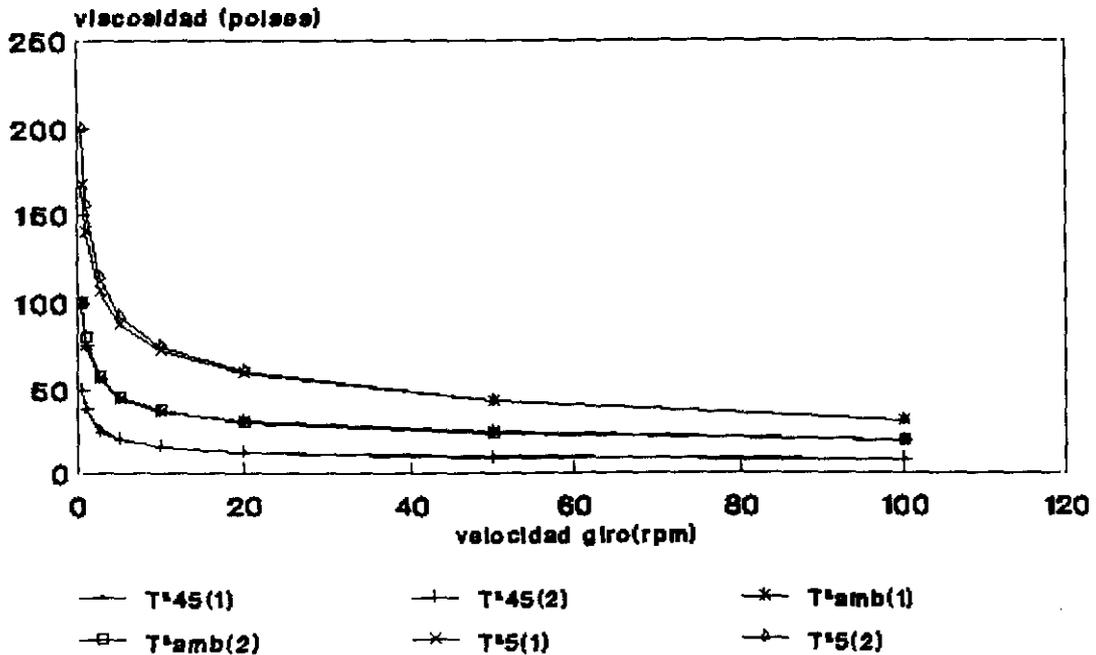
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO .FASE ACUOSA ESTERILIZADA



1.5% CMC Na .lactum a los 7 días

(gráfica IV)

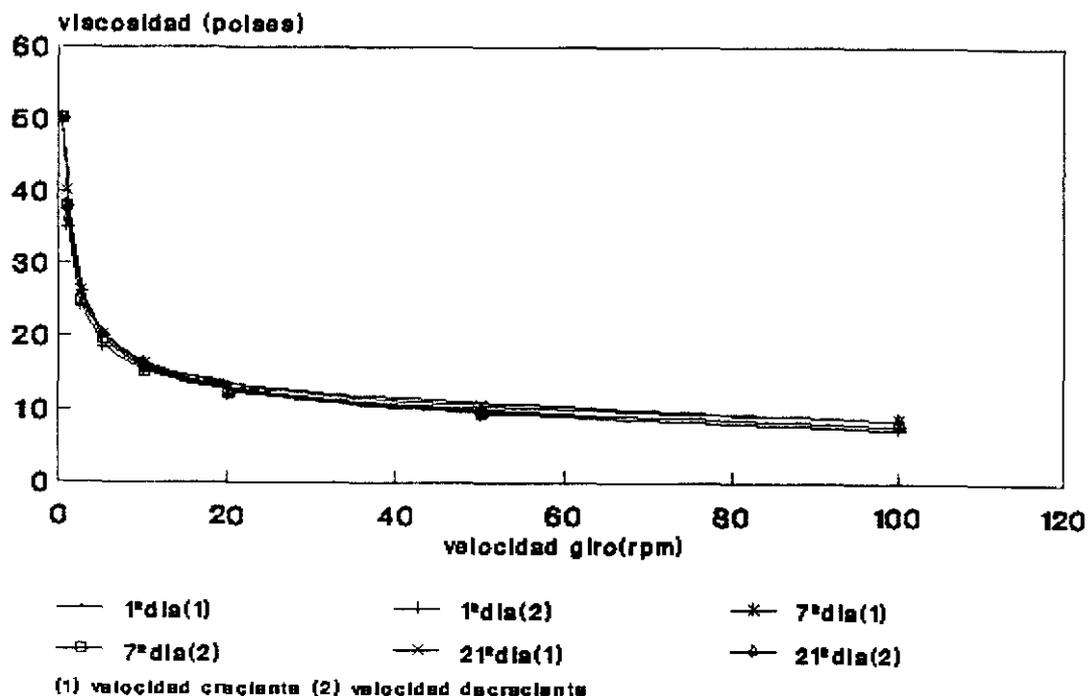
INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO.EMULSION ESTERILIZADA



1.5% CMC Na .lactum a los 7 días

(gráfica V)

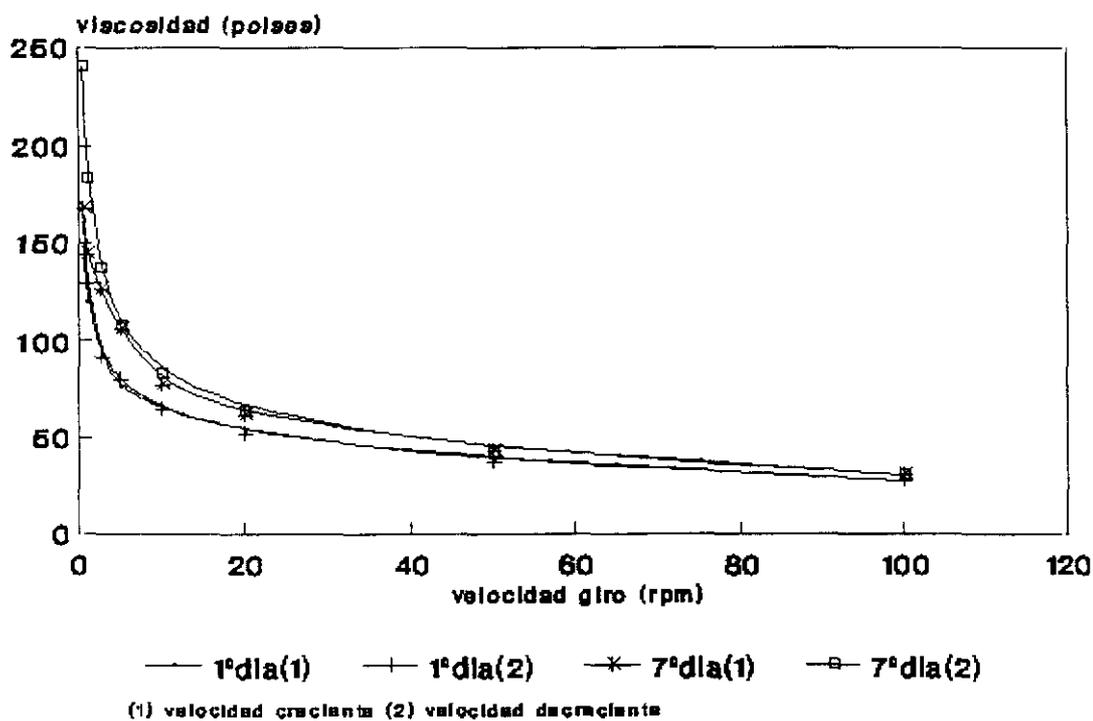
INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO EMULSION ESTERILIZADA



TEMP 46°C 1,3% VISCOSIZANTE

(gráfica VI)

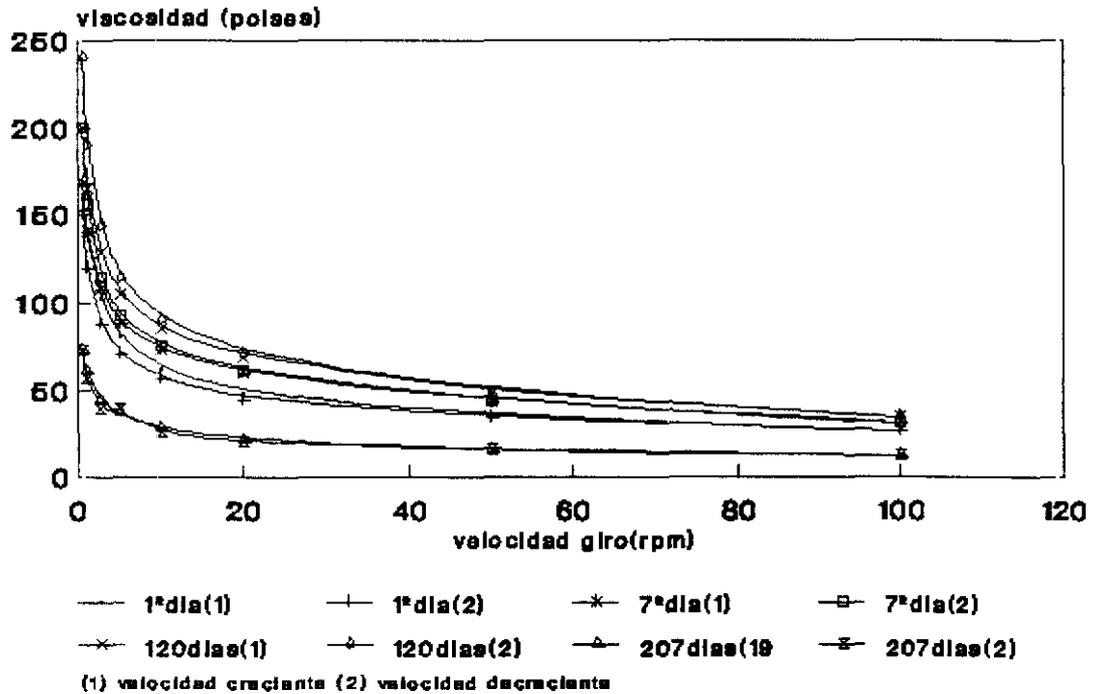
INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO ESTERILIZACION DE LA FASE ACUOSA



TEMP AMBIENTE 1,3% VISCOSIZANTE

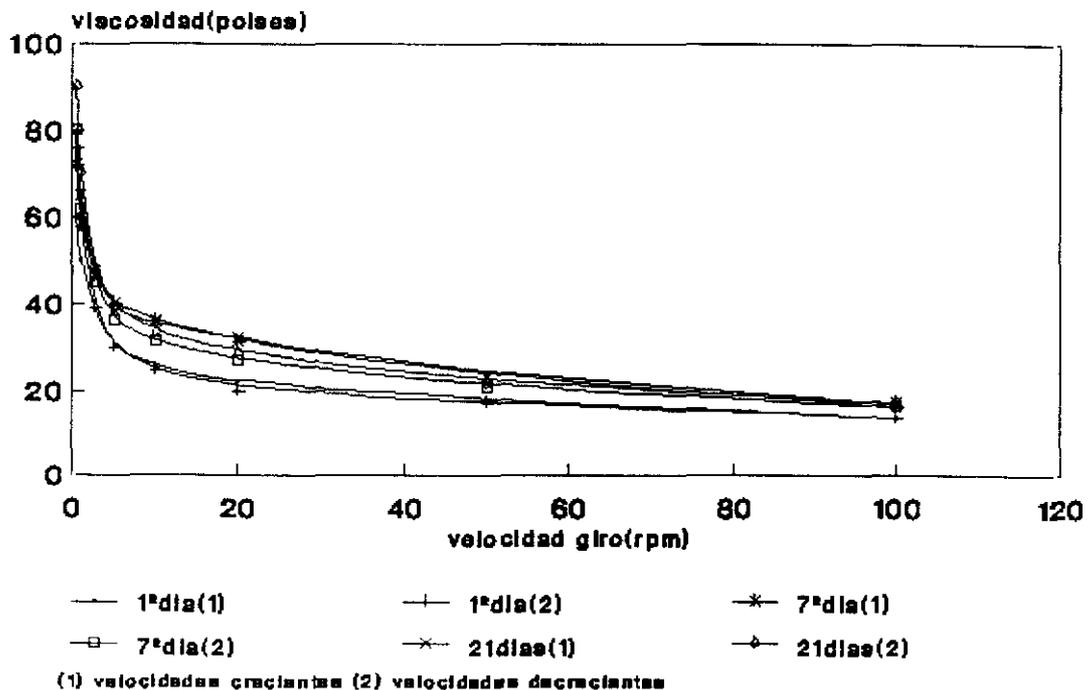
(gráfica VII)

INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO EMULSION ESTERILIZADA



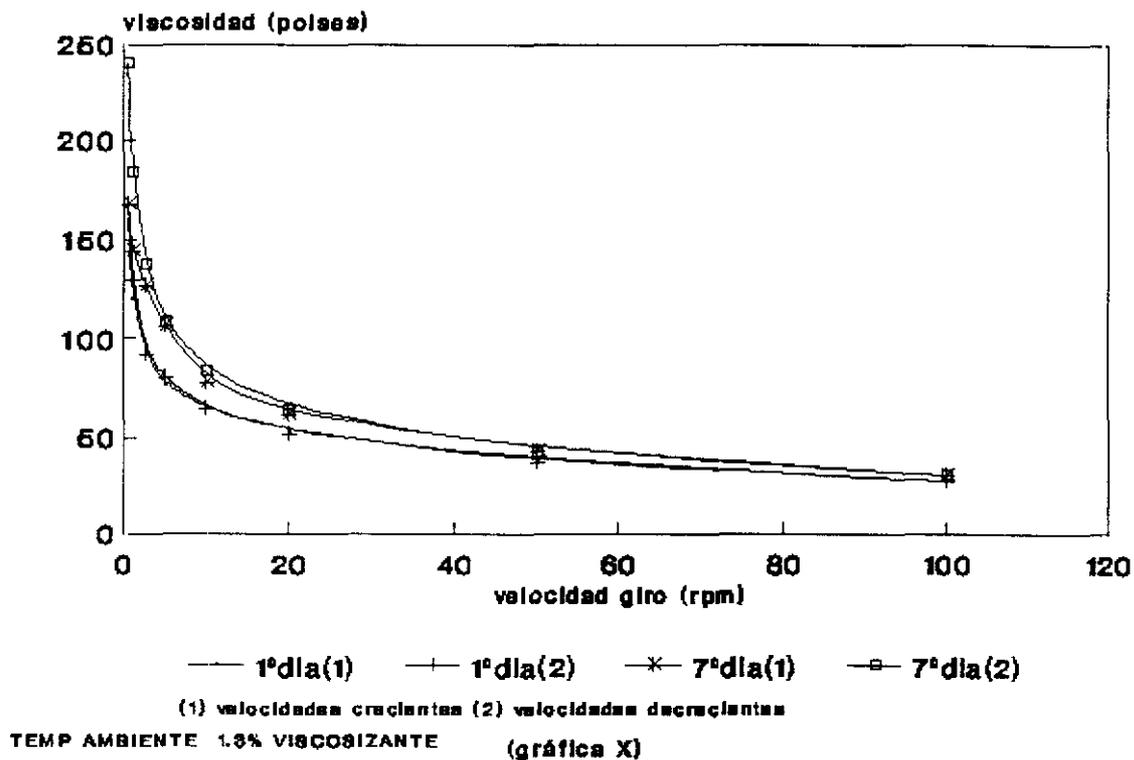
TEMP 6°C 1.3% VISCOSIZANTE (gráfica VIII)

INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO ESTERILIZACION DE LA FASE ACUOSA

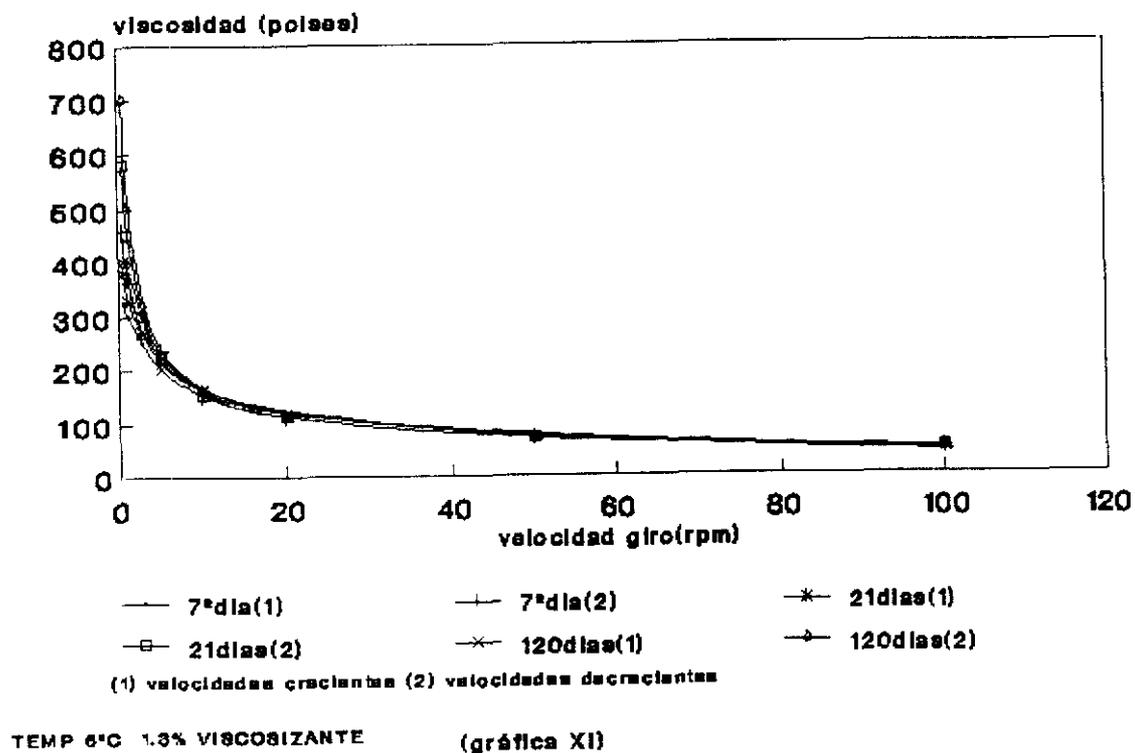


TEMP 46°C 1.3% VISCOSIZANTE (gráfica IX)

INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO ESTERILIZACION DE LA FASE ACUOSA



INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO ESTERILIZACION DE LA FASE ACUOSA



20/INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE

-El aumento del porcentaje de viscosizante (CMC Na), desde 1,3% a 1,5%, supone un aumento de viscosidad tanto mayor a medida que disminuye la temperatura de almacenamiento.(gráficas XII,XIII,XIV)

TEMPERATURA 45°C: (tablas:e-1,e-4)

=====

100 rpm	1,3% CMC Na	1,5% CMC Na
10 dia	7,44 Po	7,75 Po
70 dia	8,05 Po	9,95 Po
140 dias	8,55 Po	>10,0 Po

TEMPERATURA AMBIENTE: (tablas :e-2,e-5)

=====

100 rpm	1,3% CMC Na	1,5% CMC Na
10 dia	14,60 Po	16,00 Po
70 dia	19,30 Po	20,90 Po

TEMPERATURA 50C (tablas e-3,e-6)

=====

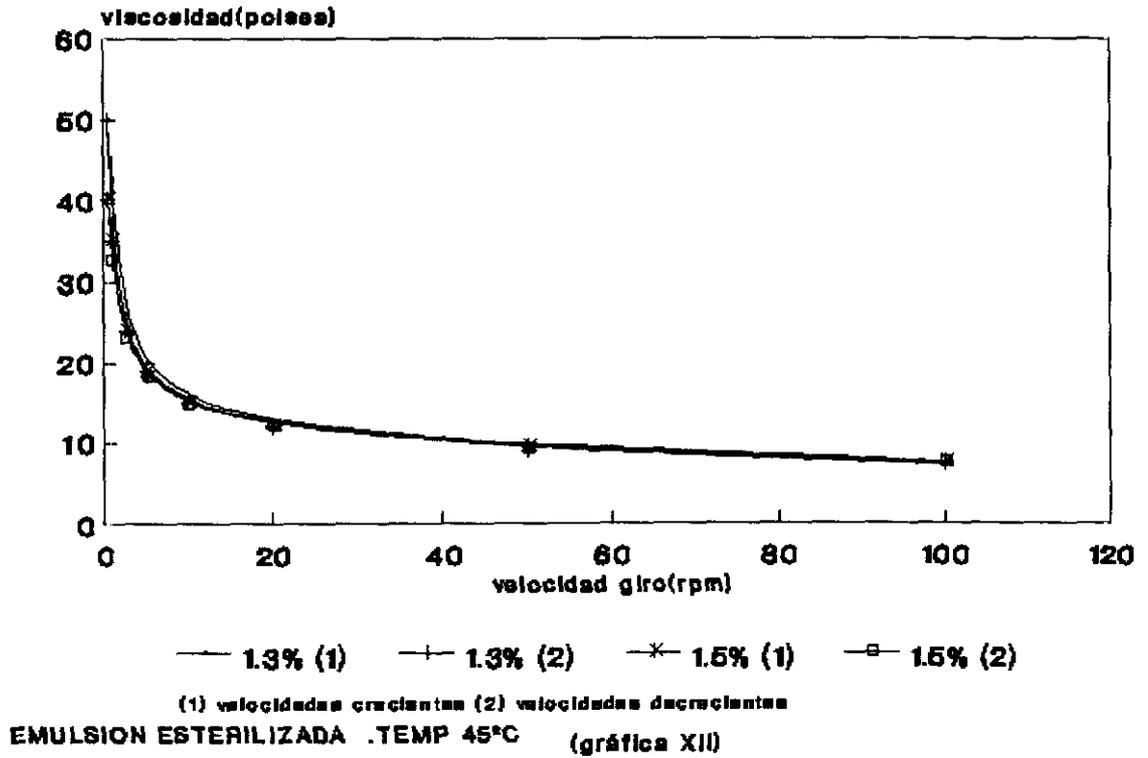
100 rpm	1,3% CMC Na	1,5% CMC Na
10 dia	26,00 Po	32,60 Po
70 dia	31,40 Po	34,70 Po
210 dias	31,68 Po	37,40 Po

- El aumento en el porcentaje de viscosizante no afecta al tipo de flujo que presenta el sistema.

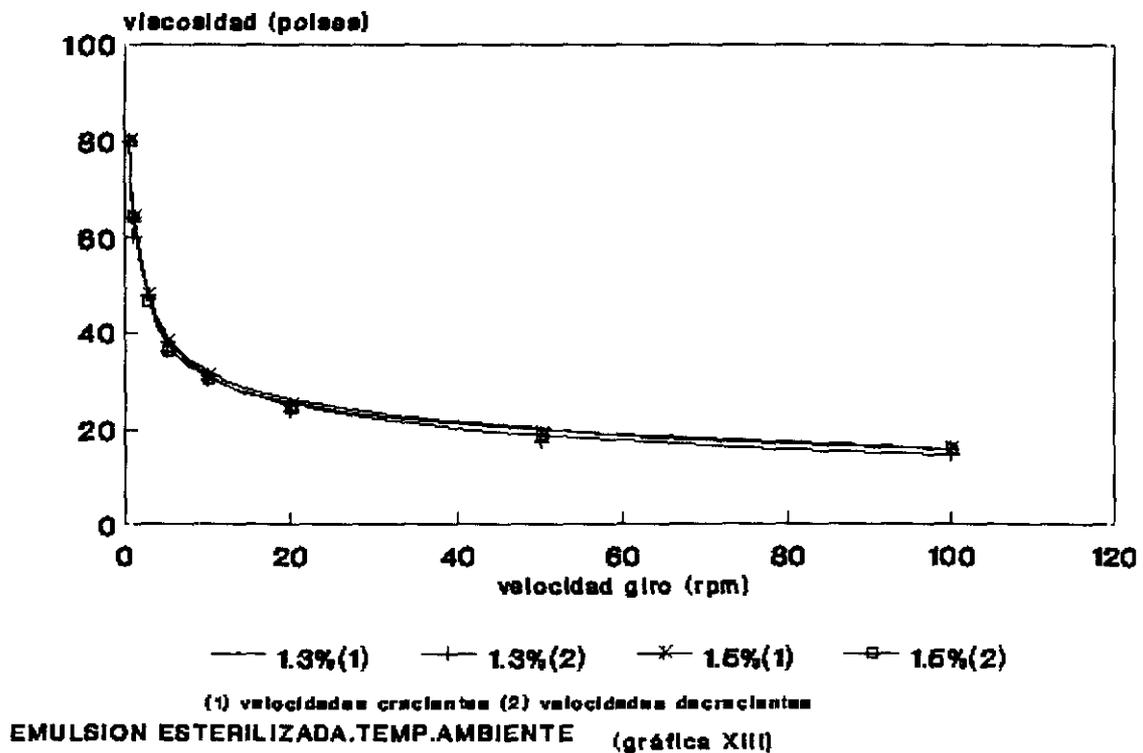
-Un aumento en el porcentaje de viscosizante desde 1,3% a 1,5% no compensa la disminución de viscosidad debida al hecho de esterilizar la emulsión.

-La variación de viscosidad con el almacenamiento aumenta al aumentar el porcentaje de viscosizante gráficas :(XV),(XVI),(XVII)

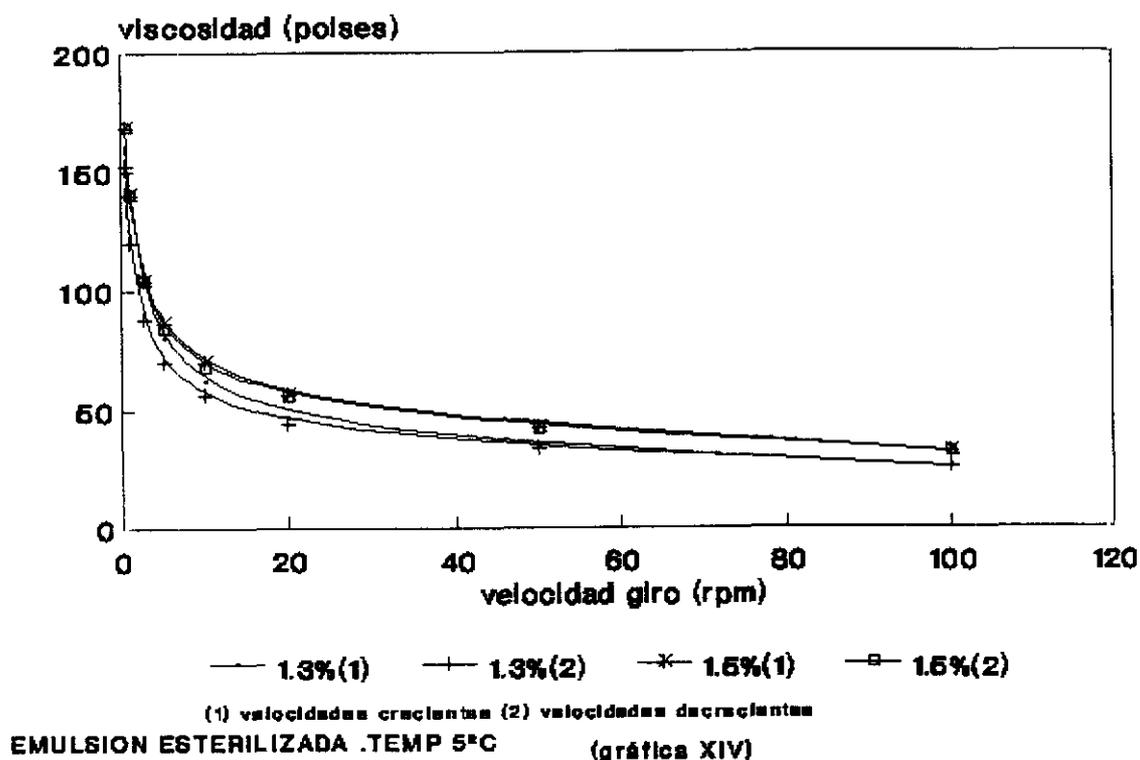
INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



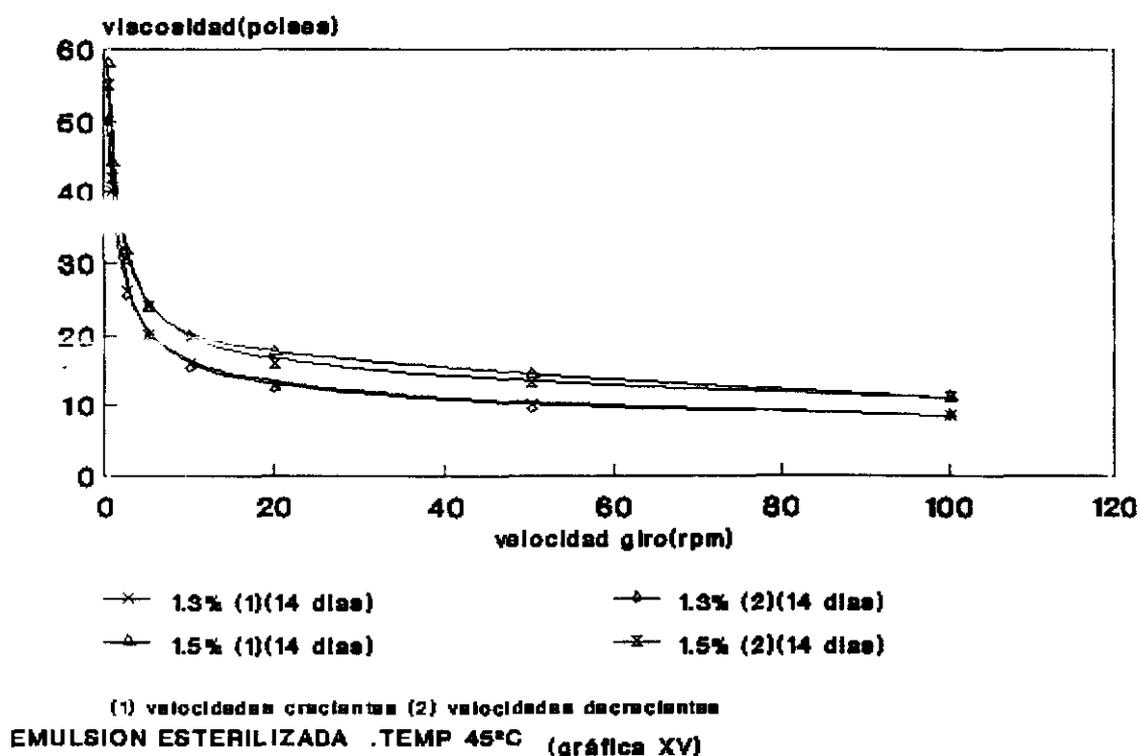
INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



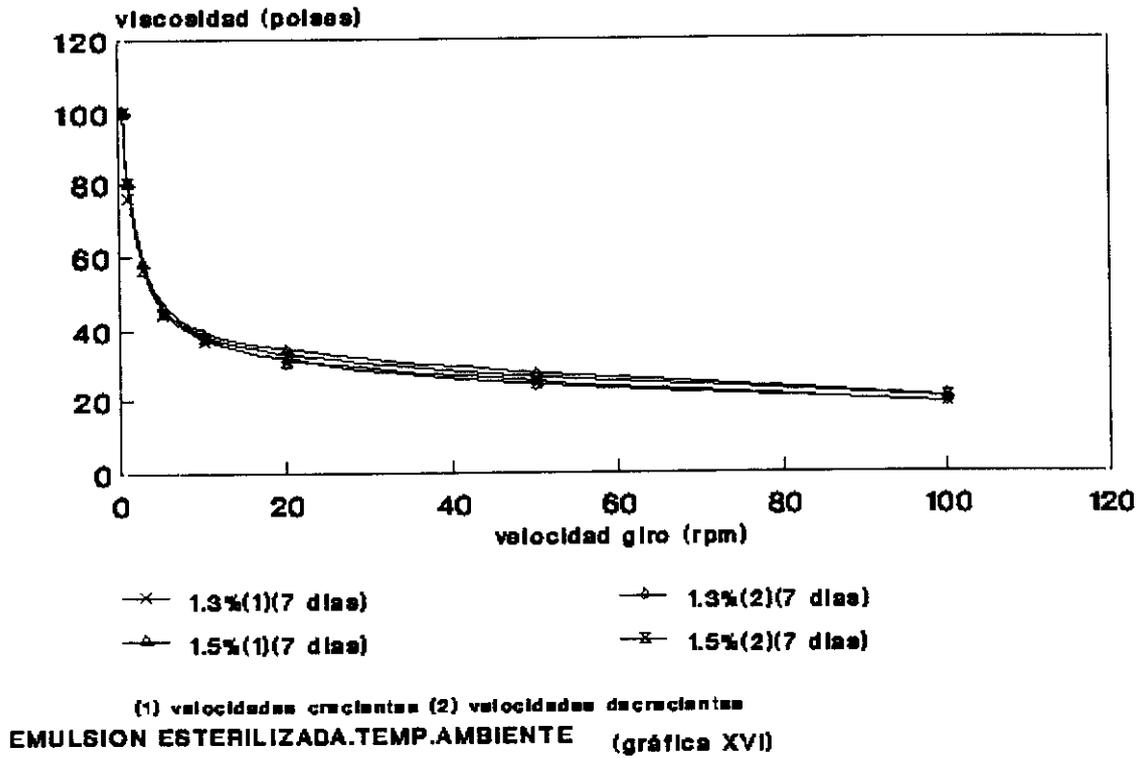
INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



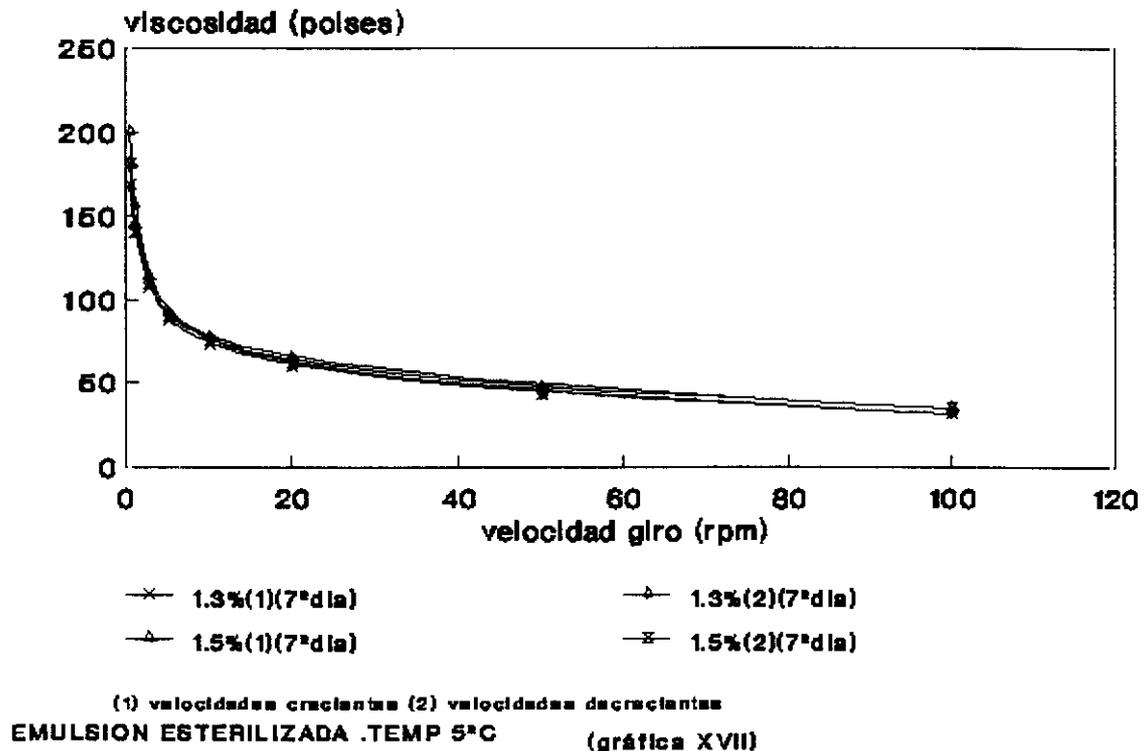
INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE Y TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO



3/INFLUENCIA DEL PERIODO DE ALMACENAMIENTO

La viscosidad aumenta durante el primer mes de almacenamiento a temperatura y porcentaje de agente viscosizante constante.

gráficas:(VI-XI),(XV-XVII).

Las lecturas realizadas a temperatura de 50°C, permiten observar que el aumento de viscosidad continua durante los cuatro primeros meses, periodo tras el cuál se detecta un descenso acusado de la viscosidad tanto mayor a medida que el proceso de esterilización se lleva a cabo en el sistema emulsificado.

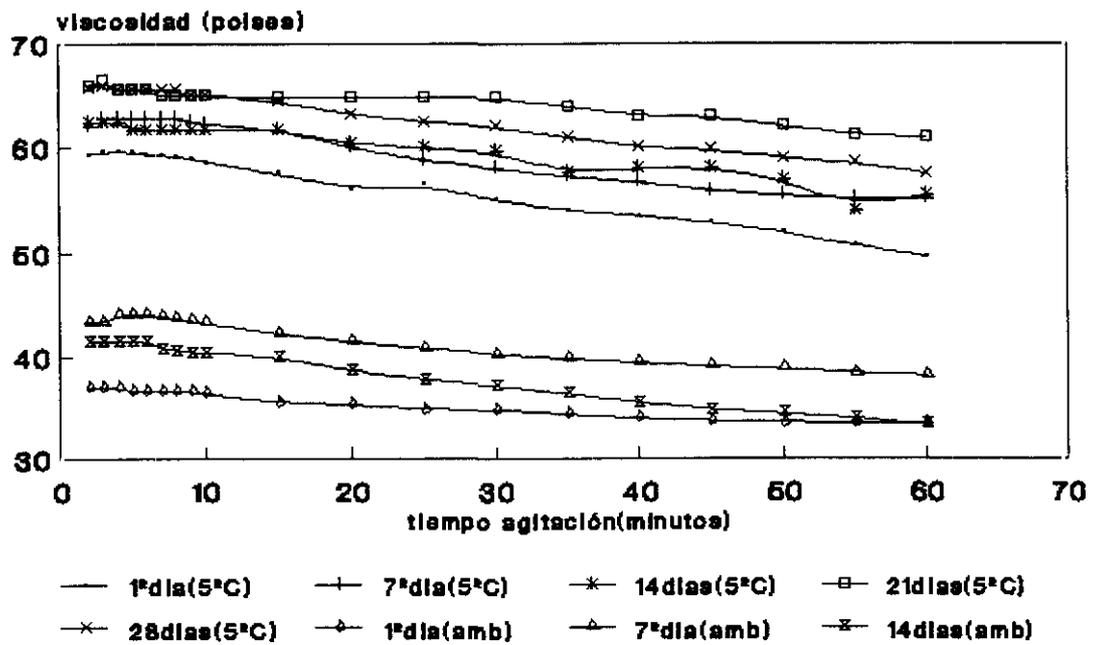
4/INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACION

-En las condiciones ensayadas: (tablas:(e-7),(fa-4-5)), se detecta una disminución no muy acusada de la viscosidad del sistema con el tiempo de agitación. gráfica (XVIII)

TEMPERATURA	VISCOSIDAD (Po)	
	Dias de almacenamiento	
	10	140
T _a ambiente	33 - 37	33,4 - 41,4
T _a 50 C	49 - 59	55,5 - 62,4

-La gráfica (XIX) demuestra una vez más la influencia que sobre la viscosidad tiene el momento de esterilización

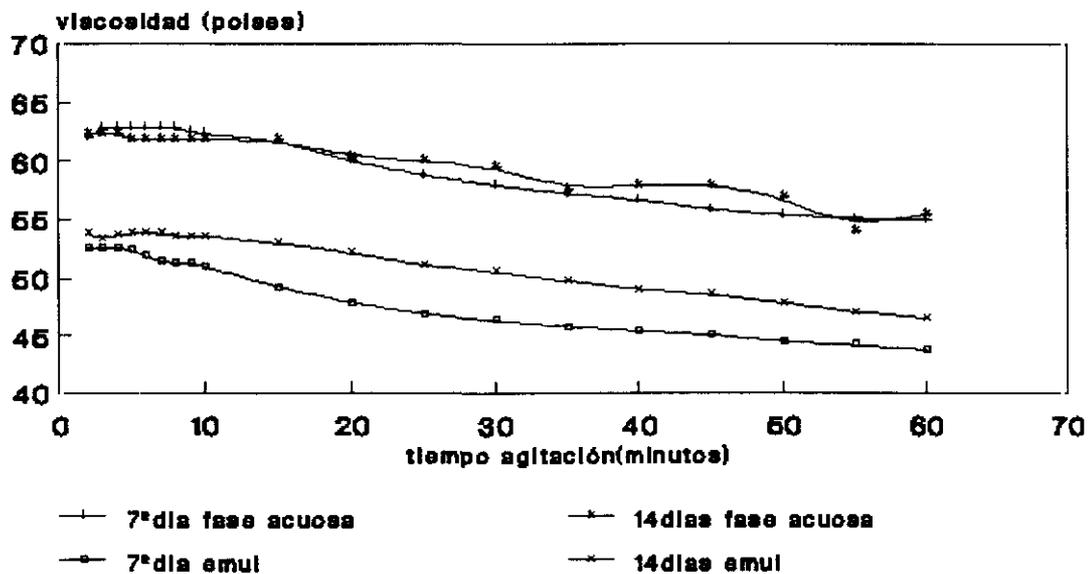
VISCOSIDAD / TIEMPO DE AGITACION FASE ACUOSA ESTERILIZADA



60rpm. Temp 16°C ambiente
1.3% VISCOSIZANTE

(gráfica XVIII)

VISCOSIDAD / TIEMPO AGITACION INFLUENCIA DEL MOMENTO DE ESTERILIZACION Y PORCENTAJE DE VISCOSIZANTE



60rpm. Temp. 6°C
1.3% CMC Na esterilizar fase acuosa
1.6% CMC Na esterilizar emulsión

(gráfica XIX)

-A pesar de aumentar el porcentaje de CMC Na hasta un 1,5%, la viscosidad así como su variación al someter al sistema a 50 rpm durante una hora, difiere y es inferior al valor de viscosidad que se obtiene al esterilizar la fase acuosa.

% CMC Na	VISCOSIDAD (Po)
1,3	55,04 - 62,00
1,5	43,80 - 52,60

5/INFLUENCIA DEL PROCESO DE LIOFILIZACION

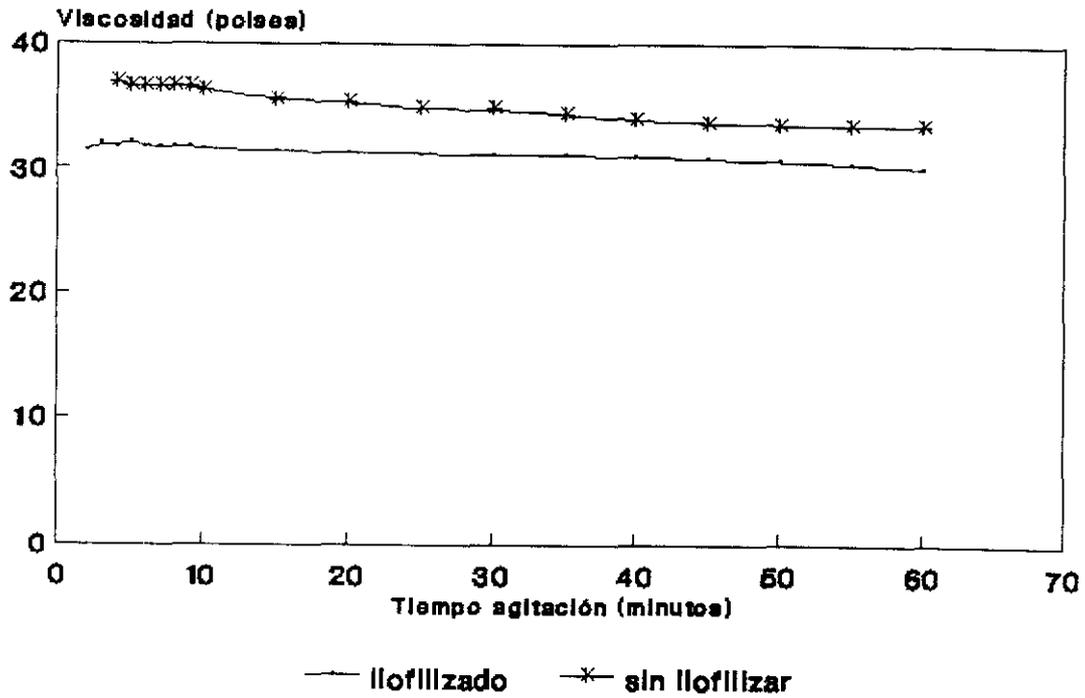
Las tablas:(fa-6),(e-8), muestran los resultados reológicos de la emulsión regenerada en iguales condiciones a las utilizadas al preparar la emulsión de partida .

-A temperatura, porcentaje de viscosizante y momento de esterilización constante, la emulsión regenerada presenta menor viscosidad que la emulsión sin liofilizar (tablas:(fa-6),(fa-7)(e-8) gráfica (XX).

Emulsión sin liofilizar.....	33,6 - 37,0 (Po)
Emulsión regenerada30,1 - 31,5 (Po)

-La viscosidad disminuye con el almacenamiento, gráfica (XXI) y en caso de esterilizar la emulsión a pesar de aumentar el porcentaje de viscosizante.gráfica (XXII).

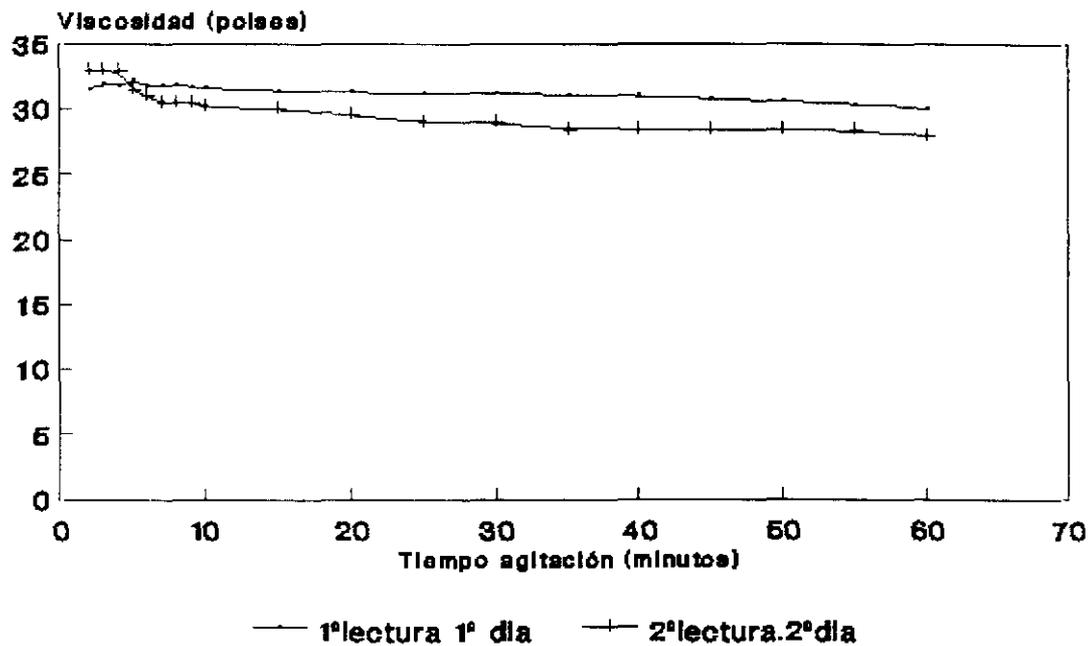
VISCOSIDAD/TIEMPO AGITACION.



Temp.ambiente ;1.3 % CMC Na
aguja n°8 ;50rpm

(gráfica XX)

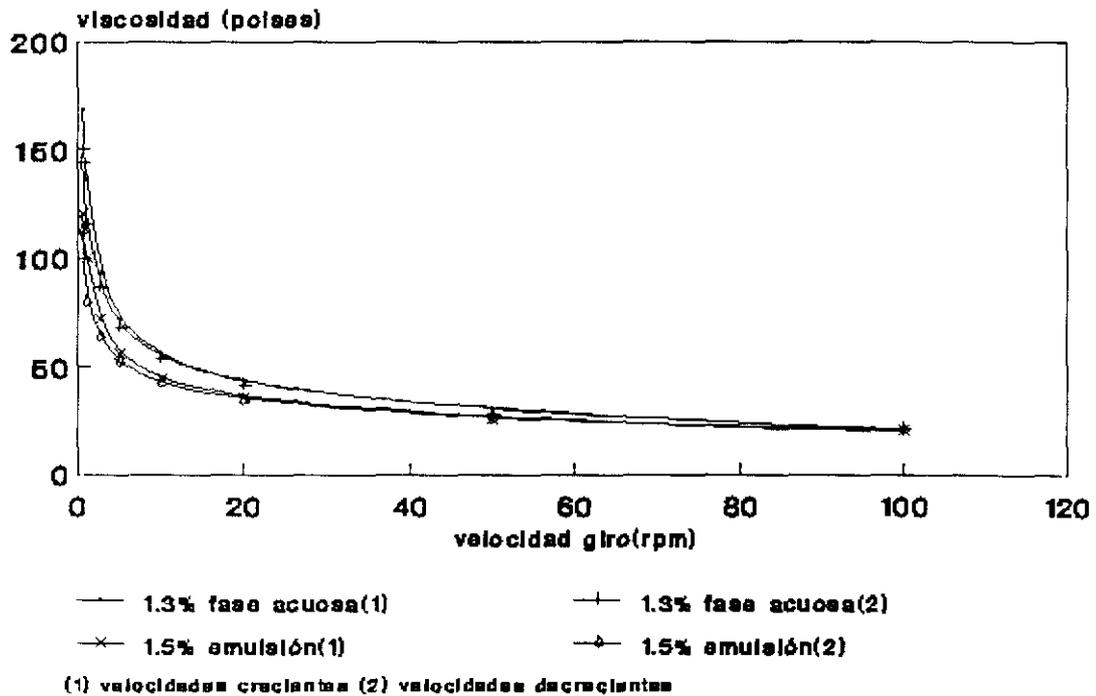
EMULSION LIOFILIZADA VISCOSIDAD TIEMPO DE ALMACENAMIENTO



Temp.ambiente ;1.3 % CMC Na
50rpm

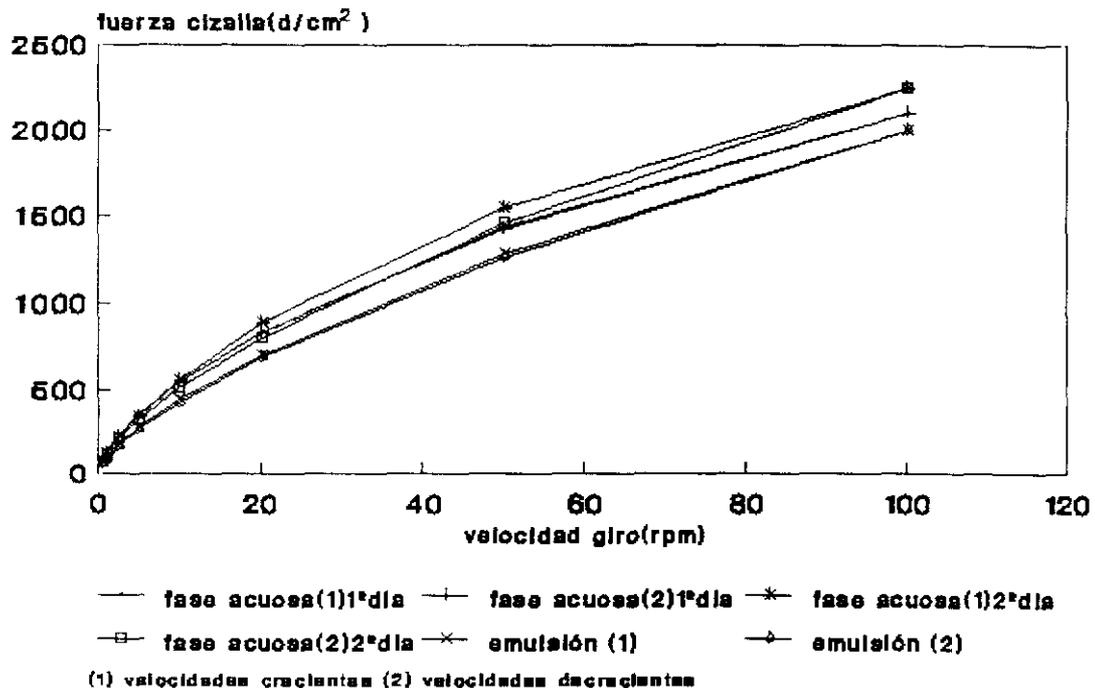
(gráfica XXI)

EMULSION LIOFILIZADA INFLUENCIA DEL MOMENTO DE ESTERILIZACION



(gráfica XXII)

EMULSION LIOFILIZADA. REOGRAMA MOMENTO DE ESTERILIZACION



Temp. ambiente

(gráfica XXIII)

La tixotropia y con ello el caracter pseudoplástico de los sistemas liofilizado y regenerado, disminuye con el almacenamiento y con el hecho de esterilizar la emulsión, gráfica (XXIII).

6/ESTUDIO DEL TIPO DE FLUJO DEL SISTEMA

Los reogramas obtenidos, independientemente de las condiciones de ensayo corresponden a sistemas pseudoplásticos, en los que la viscosidad no varia mucho con la agitación y el grado de tixotropia no es muy acusado.

Estos resultados parecen contrastar con el hecho de que las dispersiones de carboximetilcelulosa sódica presentan un comportamiento pseudoplástico, es por ello por lo que se llevan a cabo estudios reológicos de:

-dispersiones acuosas de viscosizante(1,3%) : (tabla c-1)

-dispersiones acuosas de viscosizante (1,3%) y manitol(6%):tabla cm-1).

-dispersiones acuosas de viscosizante(1,3%),manitol(6%),emulgente (0,5%): (tabla cme-1)

a fin de comprobar si la reologia del sistema emulsificado varia o nó respecto a la reologia de los componentes de la emulsión y de ser así, tratar de analizar las causas.

DISPERSION ACUOSA DE CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)

=====

Temp: 20°C

VELOCIDAD G (rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	20,0	10	20,0	10
1,0	20,0	20	20,0	20
2,5	20,8	52	18,0	45
5,0	20,4	102	18,0	90
10	17,0	170	17,0	170
20	15,0	300	15,0	300
50	12,3	615	12,3	615
100	10,2	1010	-	-

(tabla C-1)

DISPERSION ACUOSA DE CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====
 Y MANITOL (6%)
 =====

Temp : 20°C

VELOCIDAD G (rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	32,0	16	30,0	15
1,0	35,0	35	32,0	32
2,5	30,8	75	28,8	72
5,0	28,0	140	27,0	135
10	25,0	250	24,4	244
20	21,7	435	21,5	430
50	16,9	845	16,7	838
100	13,4	1340	-	-

(tabla CM-1)

DISPERSION ACUOSA DE CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====
 MANITOL (6%) Y EMULGENTE (1,3%)
 =====

Temp: 20°C

VELOCIDAD G (rpm)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)	VISCOSIDAD (Po)	FUERZA (d/cm ²)
0,5	24,0	12	24,0	12
1,0	28,0	28	28,0	28
2,5	24,0	60	26,0	65
5,0	27,6	138	24,0	120
10	22,0	220	21,5	215
20	21,5	425	19,0	380
50	15,3	765	15,5	775
100	12,7	1276	-	-

(tabla CME-1)

-La adición de manitol y emulgente a las dispersiones acuosas de carboximetilcelulosa sódica, producen un aumento de viscosidad.

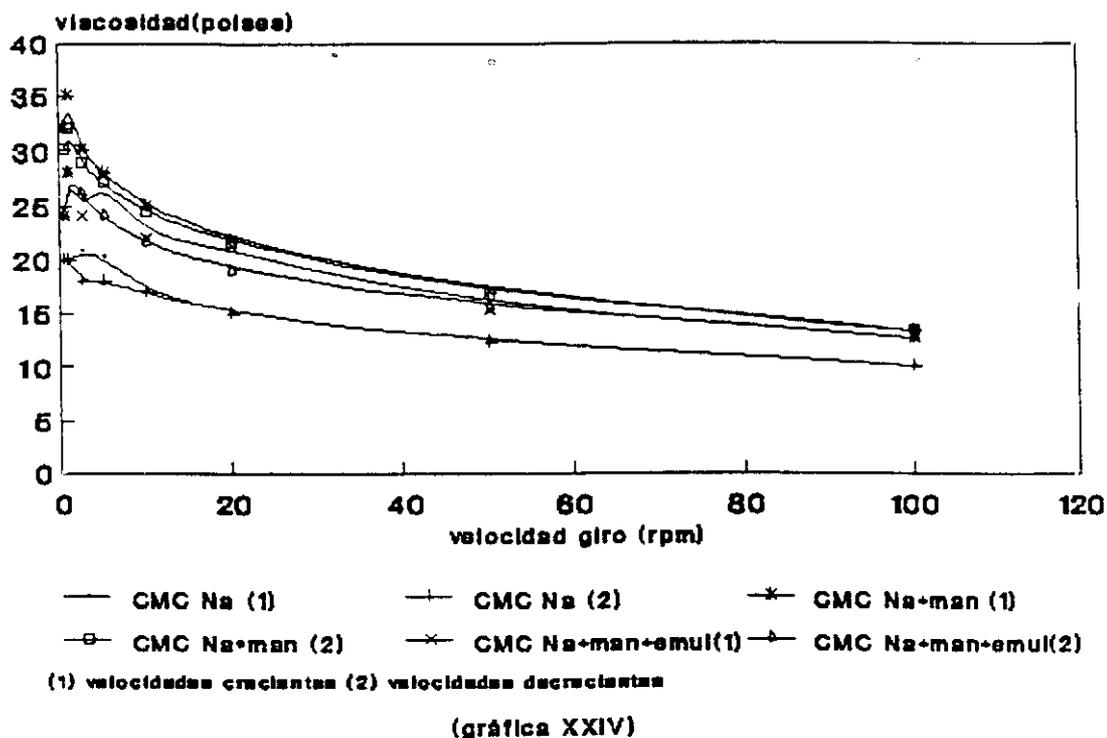
Parece ser el manitol la causa de ésta variación, puesto que la presencia del emulgente reduce el efecto.(gráfica XXIV)

-La tixotropia es menor en caso de disponer de viscosizante como único ingrediente de la dispersión acuosa.

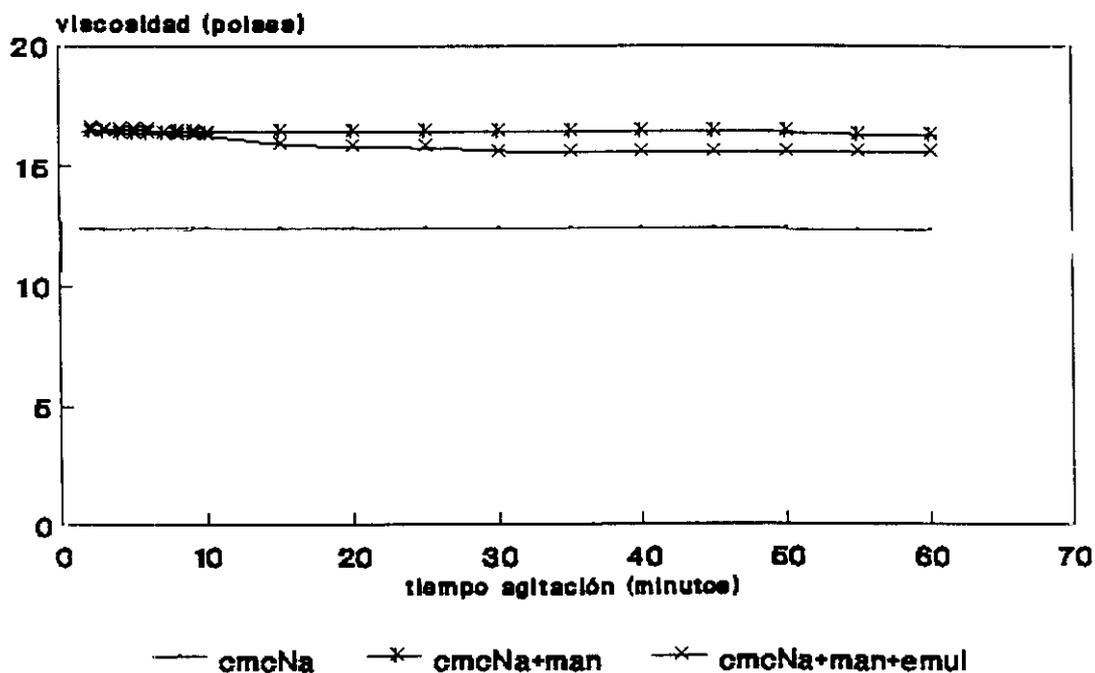
-La variación de viscosidad con el tiempo de agitación es prácticamente despreciable en caso de disponer solo de viscosizante .La presencia de emulgente, motiva un pequeño descenso al aumentar el tiempo de agitación (gráfica XXV).

De todos éstos resultados se deduce un flujo cercano al newtoniano, con características pseudoplásticas y que no difiere mucho del que presenta el sistema emulsificado.

DISPERSION ACUOSA VARIACION DE VISCOSIDAD



VARIACION DE VISCOSIDAD CON EL TIEMPO DE AGITACION



1.2.8.5. CONCLUSIONES

1/La estabilidad física se identifica con un aumento en la viscosidad del sistema, es por ello por lo que interesa:

-Realizar el proceso de esterilización en la fase acuosa de la emulsión.

-En caso de llevar a cabo el proceso de esterilización en el sistema emulsificado, se deberá disponer de un porcentaje de agente viscosizante (CMC Na) superior al 1,5% .

-Almacenar el sistema emulsificado a temperaturas bajas

2/Se observa una disminución de viscosidad:

-al aumentar la temperatura de almacenamiento

-en emulsiones liofilizadas, regeneradas en iguales condiciones a las utilizadas durante la preparación de la emulsión de partida.

-cuando el proceso de esterilización, se lleva a cabo en el sistema emulsificado.

3/Se observa un aumento de viscosidad durante los primeros meses de almacenamiento, tanto mas considerable a medida que disminuye la temperatura de reposo y la fase de esterilización se ha llevado a cabo en la fase acuosa;previa al proceso de emulsifica-

ción.

4/Un aumento en el porcentaje de viscosizante, desde 1,3% a 1,5%, no compensa la pérdida de viscosidad motivada por realizar el proceso de esterilización en la propia emulsión .

5/En todos los casos ensayados se trata de un sistema pseudo-plástico con cierto caracter tixotrópico.

6/El fenómeno tixotrópico, se ve afectado por otros parámetros:

- aumenta al llevar a cabo el proceso de esterilización en la fase acuosa previa a la emulsificación
- aumenta con el almacenamiento
- aumenta a menores velocidades de cizalla
- aumenta al disminuir la temperatura de almacenamiento, en emulsiones esterilizadas. En caso de esterilizar la fase acuosa, el aumento de tixotropia es mayor al aumentar la temperatura de reposo del sistema .

CAPITULO 2
ESTUDIO "IN VITRO" DE LA ESTABILIDAD DEL
PRINCIPIO ACTIVO

ESTUDIO "IN VITRO" DE LA ESTABILIDAD DEL PRINCIPIO ACTIVO

- 2.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO
- 2.2.CONDICIONES EXPERIMENTALES
- 2.3.METODO ANALITICO
- 2.4.RESULTADOS
- 2.5.CONCLUSIONES

2.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO

1/Se pretende analizar la estabilidad química del principio activo (vitamina A palmitato) a lo largo del periodo de almacenamiento (dos años), en función de las siguientes variables:

1a / Estado físico de la emulsión objeto de estudio ,
ésto es: liofilizada y sin liofilizar.

1b / Temperatura de almacenamiento: 5°C, ambiente, 45°C.

1c / Presencia o nó de atmósfera de nitrógeno durante el proceso de emulsificación y el periodo de almacenamiento .

1d / Protección o nó del sistema frente a la luz solar directa .

2/Analizar el efecto que producen las condiciones ambientales: (humedad, oxígeno) en la actividad vitamínica durante un periodo de cuatro horas.

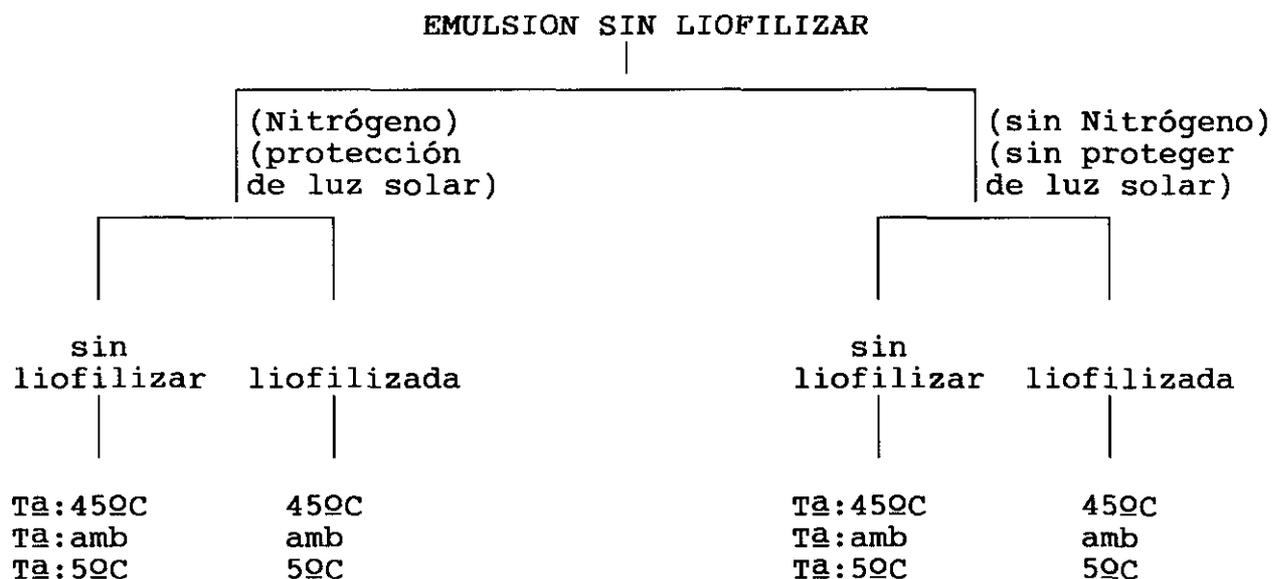
3/Comparar la potencia vitaminica en los sistemas liofilizados y sin liofilizar expuestos a radiación ultravioleta : 254 nm.

2.2.CONDICIONES EXPERIMENTALES

La emulsión sin liofilizar se distribuye en matraces a diferentes temperaturas: 5°C, ambiente, 45°C. Los matraces son previamente esterilizados, a fin de evitar el desarrollo fúngico durante el periodo de almacenamiento.

El sistema liofilizado se distribuye en viales y se almacena a esas mismas temperaturas. Los viales quedan totalmente cerrados, a fin de evitar la captura de humedad.

Las condiciones de almacenamiento se ajustan al siguiente esquema de trabajo.



Con el fin de averiguar si existe pérdida de actividad vitamínica al dejar expuesto el sistema liofilizado a las condiciones ambientales, se pesa una cierta cantidad de producto liofilizado y se mantiene durante cuatro horas en una placa expuesto a la humedad, temperatura y oxígeno ambiental. Transcurrido ese tiempo se valora la potencia vitamínica .

En caso de estudiar el efecto de la radiación ultravioleta 254nm, se exponen los viales y matraces directamente a la fuente de radiación.

2.3.METODO ANALITICO

El proceso de extracción y valoración de vitamina A palmitato se realiza de forma idéntica, independientemente del estado físico en el que se encuentra el sistema: liofilizado o sin liofilizar.

Las fases a seguir son las siguientes :

a/Extracción en eter etilico

Se realizan cinco extracciones de 25 ml de eter etílico en un matraz donde previamente y con el fin de favorecer la ruptura de la emulsión, se incorpora cloruro sódico.

En cada extracción se agita enérgicamente durante cinco minutos (en caso de disponer de emulsión sin liofilizar) y durante 15 minutos con agitador magnético en emulsiones liofilizadas. Se separa la fase eterea y se deseca con sulfato sódico. Se filtra y el residuo de sulfato sódico se lava con otros 25 ml de eter etílico con el fin de arrastrar la vitamina que podría haber quedado en la sal.

b/Evaporación de la fase eterea

Conocida la cantidad de emulsión de la que disponemos, calculamos el volumen de fase eterea que necesitamos evaporar para llegar a una dilución adecuada en el análisis espectrofotométrico. La evaporación se lleva a cabo en corriente de nitrogeno.

c/Disolución del residuo de vitamina A palmitato en ciclohexano

para alcanzar una potencia vitaminica comprendida entre 9-15 UI/ml

d/Valoracion por el método espectrofotométrico

(Farmacopea Británica pg.1071 (1968))

Se utiliza un espectrofotómetro Beckman DU-6 .El barrido se lleva a cabo entre 260-360nm

Si la longitud de onda de máxima absorbancia está comprendida entre (326 - 329 nm) y las absorbancias relativas a 300, 316, 340,

360 nm, se ajusta a la tabla siguiente +0,02, la potencia de la vitamina se obtiene de la expresión:

$$\text{UI/mg} = \frac{A_{328} (1\% \cdot 1\text{cm}) * 1900}{328}$$

1900: factor que se emplea para convertir la extinción específica de los ésteres de vitamina A en UI/g

LONGITUD DE ONDA (nm)	ABSORBANCIAS RELATIVAS
300	0,555
316	0,907
340	0,811
360	0,299

Si la longitud de onda de máxima absorción está entre (326-329nm) pero las absorbancias relativas no se ajustan a la tabla, se considera la absorbancia corregida.

$$A_{328} (\text{corr}) = 3,52 \left(2A_{328} - A_{316} - A_{340} \right)$$

Si la absorbancia corregida está comprendida entre ($\pm 3\%$) del valor de la absorbancia no corregida, se considera la absorbancia no corregida.

Si la absorbancia corregida está fuera de esos límites, se calcula el (-15%) de la absorbancia no corregida. En caso de que el valor de la absorbancia corregida esté comprendida entre los valores (-15% -3%), es imprescindible considerar el valor de la

absorbancia corregida para conocer la potencia vitaminica.

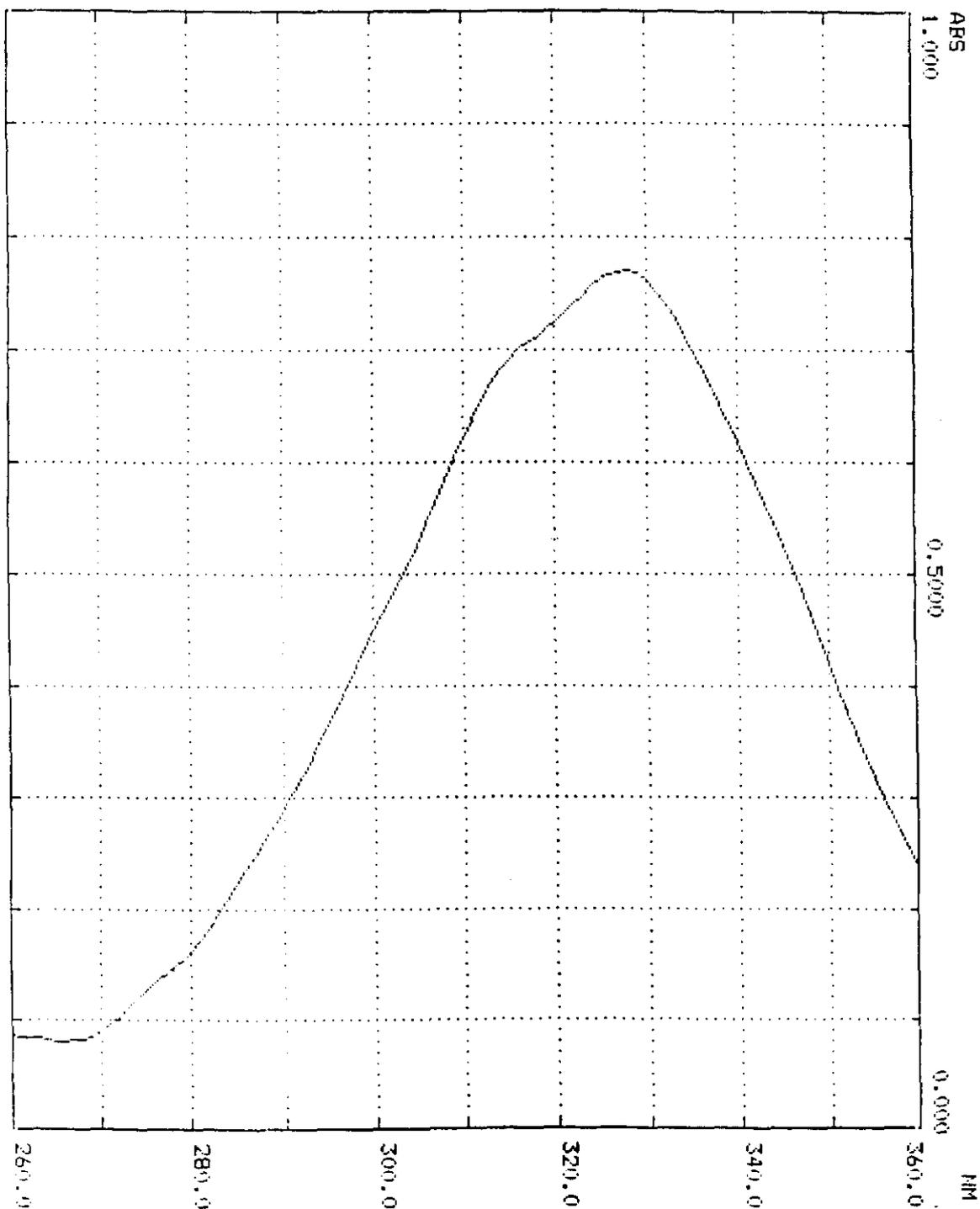
Una vez valorada la actividad de la vitamina A palmitato, el porcentaje de degradación se calcula por la expresión:

$$\text{potencia} \cdot 100 / 1.700.000$$

La gráfica (2-I) muestra el espectro correspondiente a la vitamina A palmitato en ciclohexano.

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

ABSORBANCIA DE LA VITAMINA A PALMITATO



(Gráfico 2 - I)

2.4.RESULTADOS

A/ En condiciones de almacenamiento sin atmósfera de nitrógeno, se observa: Tablas:(2-1) (2-2).

10/A temperatura de 45°C la vitamina A palmitato se degrada totalmente al cabo de siete semanas en sistemas sin liofilizar. Tabla (2-2) . La liofilización permite disponer durante ese mismo periodo de almacenamiento de mas de un 50 % de potencia vitamínica.

La actividad vitamínica en el sistema liofilizado se mantiene solo hasta pasadas ocho semanas de almacenamiento, periodo tras el cuál se degrada totalmente.Tabla (2-1).

20/ A temperatura ambiente y en sistemas sin liofilizar, la potencia vitamínica se pierde a las 10 semanas. La liofilización permite disponer de aproximadamente un 30% de actividad al cabo de ese tiempo.

30/ A temperatura de 50°C comienza el proceso de degradación a los 10 meses de almacenamiento y se pierde toda actividad vitamínica a las 44 semanas, sin existir gran diferencia entre los - sistemas liofilizados y sin liofilizar.

40/ En todos los casos, una vez comenzada la degradación su cinética es muy rápida y con pendiente muy acusada.Gráfica:(2-II) (2-III).

EMULSION LIOFILIZADA.POTENCIA VITAMINICA (%)

=====

Ausencia de nitrógeno.
Sin proteger de luz solar

Periodo de almacenamiento (semanas/mes)	Temperatura de almacenamiento		
	45°C	ambiente	5°C
1 /1	100	100	100
2 /1	100	100	100
3 /1	100	100	100
4 /1	99,23 ± 0,66	100	100
5 /2	85,67 ± 0,46	100	100
7 /2	52,80 ± 0,58	79,83 ± 0,55	100
8 /2	32,27 ± 0,56	69,30 ± 0,48	100
9 /3	0,00	51,30 ± 0,61	100
10 /3		34,60 ± 0,32	100
11 /3		0,00	100
17 /5			100
20 /5			100
24 /6			100
28 /7			100
38 /10			90,14 ± 0,25
40 /10			82,10 ± 0,37
42 /11			50,63 ± 0,42
43 /11			33,74 ± 0,41
44 /11			0,00

(tabla 2-1)

EMULSION SIN LIOFILIZAR.POTENCIA VITAMINICA (%)

=====

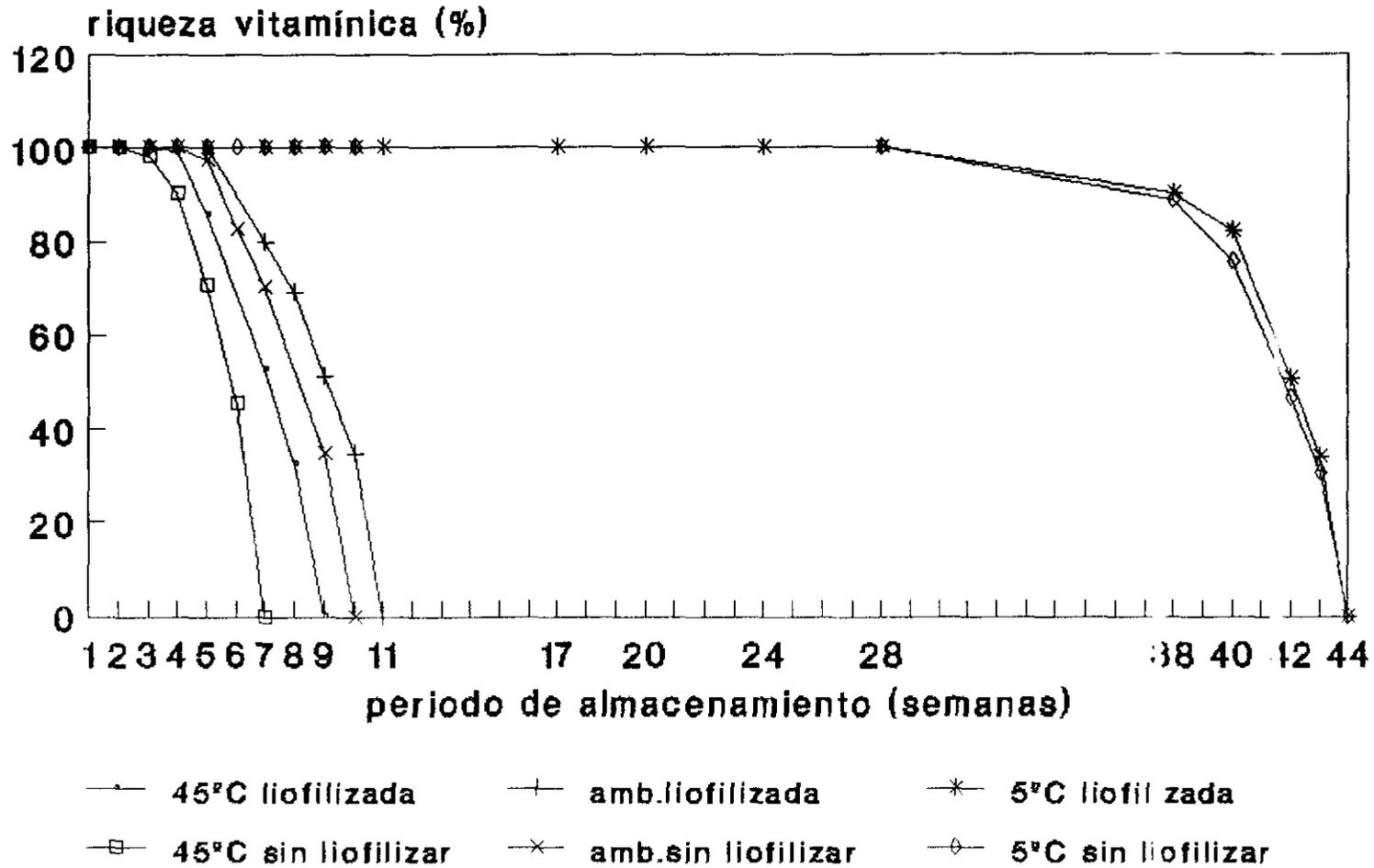
Ausencia de nitrógeno.
Sin proteger de luz solar

Periodo de almacenamiento (semanas/mes)	Temperatura de almacenamiento		
	45°C	ambiente	5°C
1 /1	100	100	100
2 /1	100	100	100
3 /1	98,30 ± 0,33	100	100
4 /1	90,21 ± 0,39	100	100
5 /2	70,80 ± 0,43	97,33 ± 0,28	100
6 /2	45,30 ± 0,61	82,52 ± 0,45	100
7 /2	0,00	70,48 ± 0,70	100
9 /3		34,65 ± 0,51	100
10 /3		0,00	100
28 /7			100
38 /10			88,56 ± 0,28
40 /10			75,60 ± 0,38
42 /11			46,60 ± 0,56
43 /11			30,37 ± 0,62
44 /11			0,00

(tabla 2-2)

ESTABILIDAD DE LA VITAMINA A PALMITATO SIN ATMOSFERA DE NITROGENO

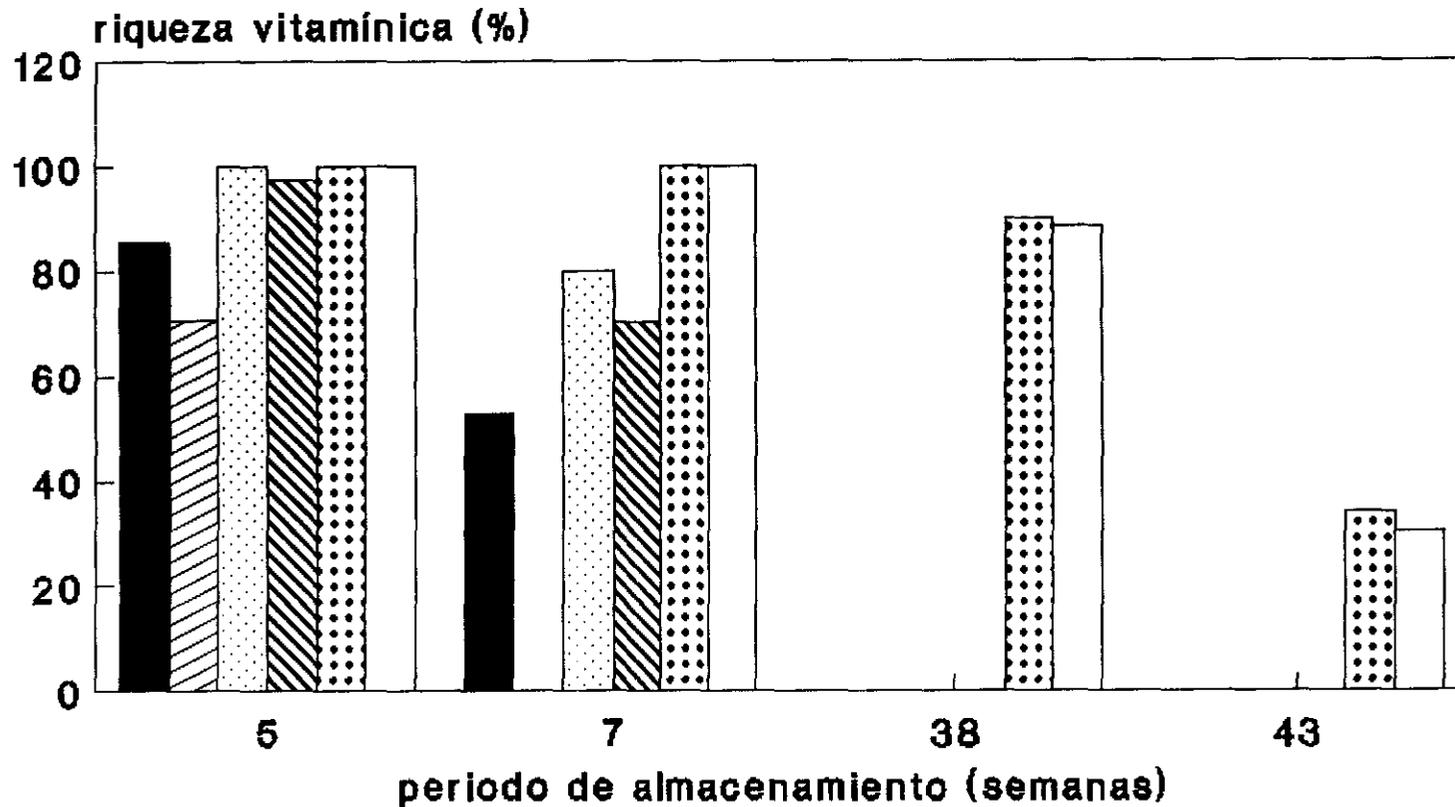
186



(Gráfica 2-II)

PERDIDA DE ACTIVIDAD VITAMINICA SIN ATMOSFERA DE NITROGENO

187



45°C liofilizada
 45°C no liofilizada
 amb. liofilizada
 amb no liofilizada
 5°C liofilizada
 5°C no liofilizada

EN FUNCION DE LA TEMPERATURA Y EL ESTADO FISICO DEL SISTEMA

(Gráfica 2-III)

B/En condiciones de almacenamiento con atmósfera de nitrógeno se observa:Tablas:(2-3) (2-4)

10/A temperatura de 45°C la potencia vitamínica se pierde en sistemas sin liofilizar al cabo de diez semanas de almacenamiento. Tabla (2-4).

La liofilización prolonga la actividad vitamínica hasta un periodo de trece semanas a partir del cuál, la pérdida es total .Tabla (2-3).

20/A temperatura ambiente, tanto en sistemas liofilizados - como en sistemas sin lioflizar, al cabo de un año no hay pérdida de potencia vitamínica. A partir de ése momento comienzan a manifestarse signos de degradación y a los 15 meses la pérdida de actividad es total.

30/A temperatura de 50°C, la potencia vitamínica se mantiene en un 100 % transcurridos dos años de almacenamiento, tanto en - sistemas liofilizados como en sistemas sin liofilizar.

40/Una vez comenzado el proceso de degradación, su cinética es rápida .Gráficas:(2-IV) (2-V).

EMULSION LIOFILIZADA.POTENCIA VITAMINICA(%)

=====

Presencia de nitrógeno
 Protección frente a la luz solar directa

Periodo de almacenamiento (semanas/mes)	Temperatura de almacenamiento		
	45°C	ambiente	5°C
1 /1	100	100	100
2 /1	100	100	100
3 /1	100	100	100
4 /1	100	100	100
5 /2	97,57 ± 0,37	-	-
6 /2	93,23 ± 0,42	-	-
7 /2	87,56 ± 0,62	100	100
10 /3	67,89 ± 0,46	-	-
11 /3	62,31 ± 0,53	-	-
12 /3	51,41 ± 0,51	100	100
13 /4	32,50 ± 0,66	-	-
14 /4	0,00	100	100
16 /4		100	100
48 /12		100	100
52 /13		96,12 ± 0,37	100
56 /14		88,00 ± 0,41	100
57 /15		72,30 ± 0,37	100
58 /15		57,63 ± 0,52	100
59 /15		37,21 ± 0,42	100
60 /15		0,00	100
88 /22			100

(tabla 2-3)

EMULSION SIN LIOFILIZAR.POTENCIA VITAMINICA (%)

=====

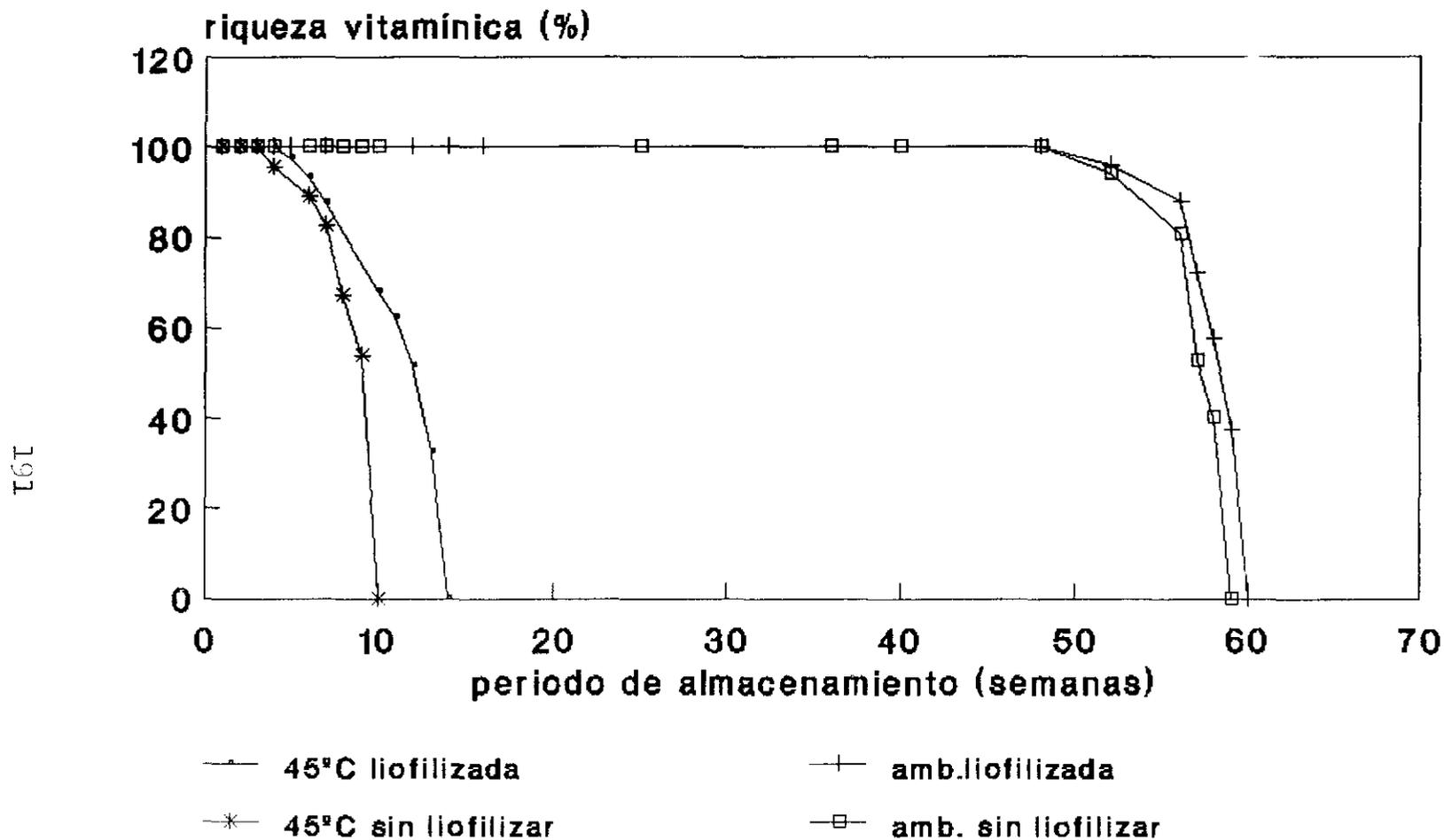
Presencia de nitrógeno

Protección frente a la luz solar directa

Periodo de almacenamiento (semanas/mes)	Temperatura de almacenamiento		
	45°C	ambiente	50°C
1 /1	100	100	100
2 /1	100	100	100
3 /1	100	100	100
4 /1	95,57 ± 0,36	100	100
6 /2	89,13 ± 0,52	100	100
7 /2	82,57 ± 0,66	100	100
8 /2	67,11 ± 0,51	100	100
9 /3	53,75 ± 0,47	100	100
10 /3	0.00	100	100
25 /7		100	100
36 /9		100	100
40/10		100	100
48 /12		100	100
52 /13		94,16 ± 0,28	100
56 /14		80,46 ± 0,47	100
57 /15		52,82 ± 0,37	100
58 /15		40,21 ± 0,49	
59 /15		0,00	100
64 /16			100
88 /22			100

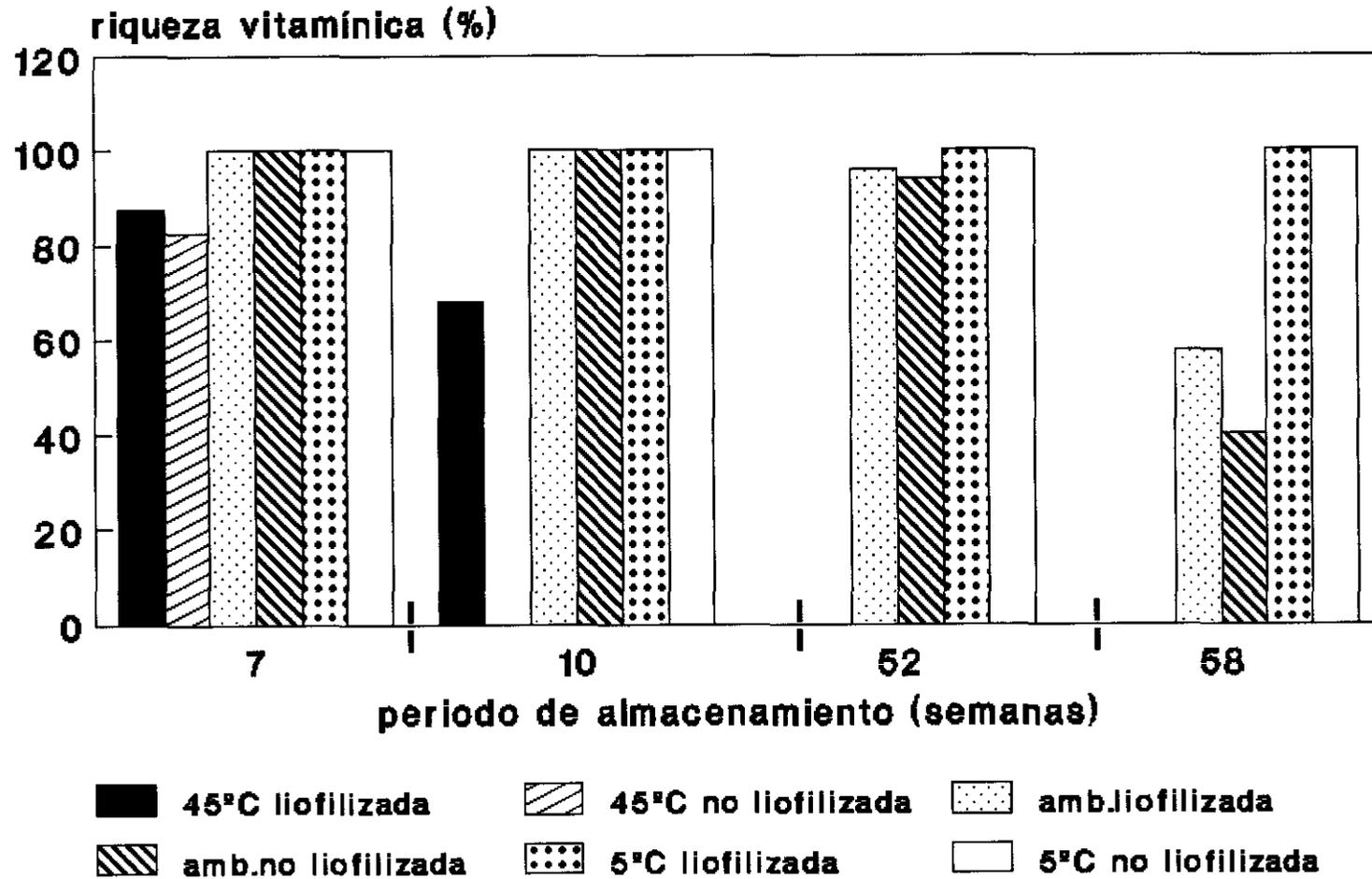
(tabla 2-4)

ESTABILIDAD DE LA VITAMINA A PALMITATO EN ATMOSFERA DE NITROGENO



(Gráfica 2-IV)

PERDIDA DE ACTIVIDAD VITAMINICA ATMOSFERA DE NITROGENO



EN FUNCION DE LA TEMPERATURA Y EL ESTADO FISICO DEL SISTEMA

(Gráfica 2-V)

C/ En presencia de radiación ultravioleta.

Las tablas :(2-5)(2-6), gráfica:(2-VI), muestran los resultados obtenidos al someter los sistemas liofilizado y sin liofilizar a la radiación ultravioleta :254 nm.

DEGRADACION DE LA VITAMINA A PALMITATO POR ACCION
=====

DE LA RADIACION UV:254 NM

=====

Ausencia de nitrógeno.

TIEMPO DE EXPOSICION (minutos/horas)	POTENCIA VITAMINICA %	
	EMULSION SIN LIOFILIZAR	EMULSION LIOFLIZADA
15/0,25	89,75 ± 0,61	100.00
30/0,50	88,23 ± 0,59	97,00 ± 0,35
45/0,75	80,96 ± 0,42	
90/1,50	79,38 ± 0,44	87,70 ± 0,39
135/2,25	76,74 ± 0,25	
165/2,75	75,89 ± 0,15	82,58 ± 0,16
195/3,25	74,85 ± 0,20	80,90 ± 0,22
240/4,00	72,41 ± 0,51	78,35 ± 0,51

(tabla 2-5)

Atmósfera de nitrógeno

TIEMPO DE EXPOSICION (horas)	POTENCIA VITAMINICA %	
	EMULSION SIN LIOFILIZAR	EMULSION LIOFLIZADA
0,5	100.00	100.00
1,0	96,63 ± 0,35	98,89 ± 0,21
3.0	85,49 ± 0,37	90,56 ± 0,36
4,0	80,45 ± 0,57	86,32 ± 0,58

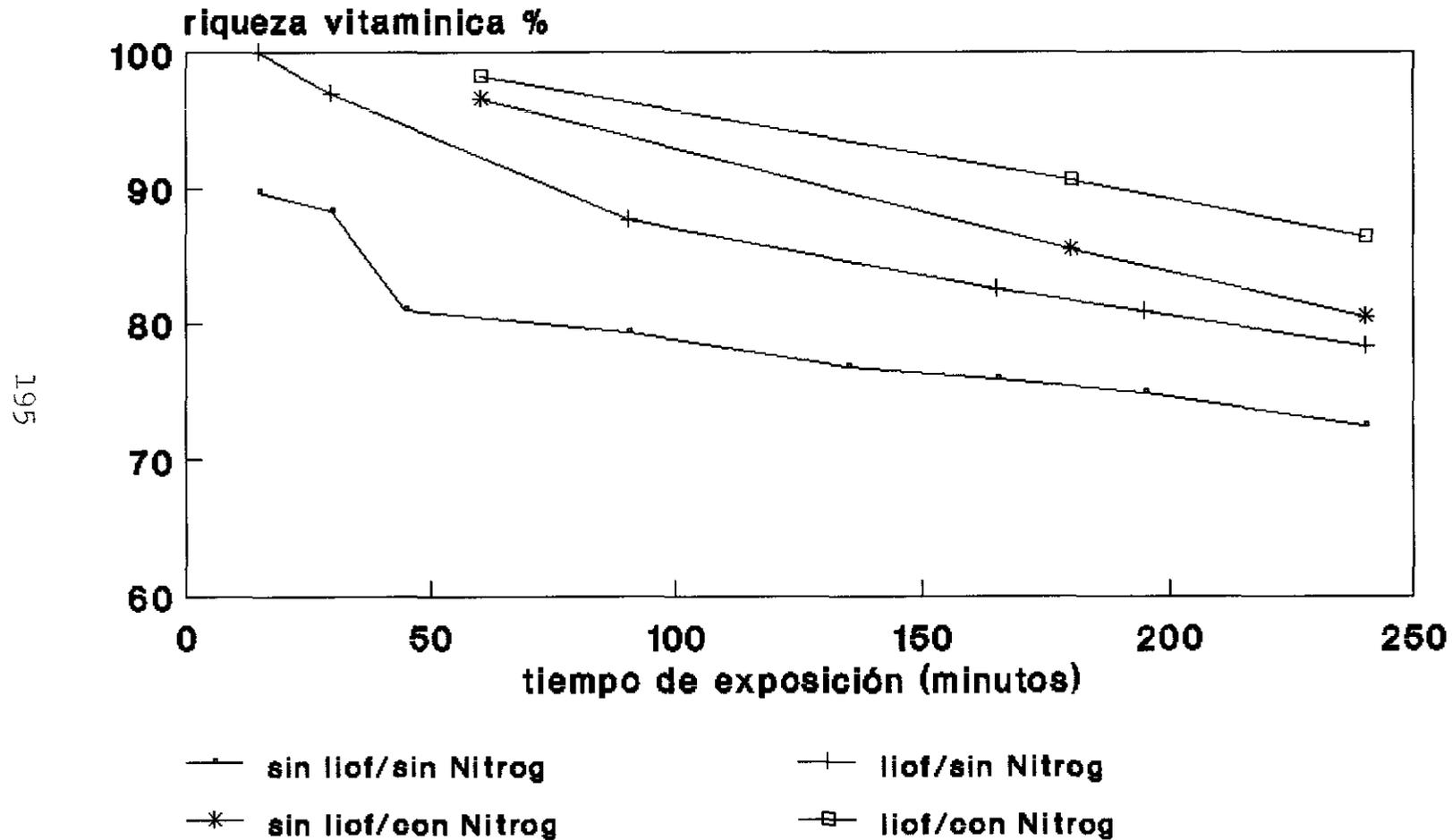
(tabla 2-6)

La ausencia de nitrógeno supone en sistemas no liofilizados, una pérdida de mas de un 15 % de riqueza vitamínica al cabo de media hora de exposición a la radiación ultravioleta. La liofilización retrasa el comienzo de la degradación en aproximadamente quince minutos y retiene una actividad vitamínica de mas de un 90 % - transcurridos treinta minutos de exposición.

En presencia de nitrógeno se mantiene el 100% de actividad vitamínica al cabo de media hora, independientemente del estado liofilizado o nó del sistema. El efecto protector de la liofilización aunque se manifiesta, es menos acusado.

D/ Efecto de las condiciones ambientales No hay pérdida de actividad vitamínica en caso de exponer el producto liofilizado a la humedad y oxígeno ambiental durante cuatro horas .

DEGRADACION DE LA VITAMINA A PALMITATO EFECTO DE LA RADIACION UV 254nm



(Gráfica 2-VI)

E/El tiempo de vida media así como la constante de degradación se esquematizan en la siguiente tabla (2-7).

Condiciones Experimentales	Temperatura de almacenamiento					
	45°C		ambiente		50°C	
	T _½ (días)	Kd (días ⁻¹)	T _½	Kd	T _½	Kd
Liofilizada sin atmósfera de nitrógeno	49	0,0141	63	0,0110	294	0,0023
Sin liofilizar sin atmósfera de nitrógeno	≈42	≈0,0165	≈56	≈0,0123	≈287	≈0,0024
Liofilizada con atmósfera de nitrógeno	84	0,0082	406	0,0017	>616	<0,0011
Sin liofilizar con atmósfera de nitrógeno	63	0,011	399	0,0017	>616	<0,0011

(tabla 2-7)

El tiempo necesario para detectar una reducción del 50 % en la actividad vitamínica, es tanto menor a medida que :

- Se aumenta la temperatura de almacenamiento
- Se dispone de sistemas no liofilizados
- El sistema no se conserva en atmósfera de nitrógeno.

F/Interpretación estadística

Se pretende estudiar a lo largo del periodo de almacenamiento, si las diferencias de actividad vitamínica son o no significativas, según el estado físico del sistema, así como las condiciones de conservación: temperatura y presencia de atmósfera de nitrógeno.

A las siete semanas de almacenamiento, los resultados obtenidos de riqueza en vitamina A palmitato, se exponen en la siguiente tabla. (Tabla 2-7). Es de destacar que no se consideran los valores a temperatura de 50°C debido a que en todos los casos analizados, la potencia se mantiene al 100%.

POTENCIA VITAMINICA (%)
A LAS SIETE SEMANAS DE ALMACENAMIENTO

SIN ATMOSFERA DE NITROGENO				CON ATMOSFERA DE NITROGENO			
LIOFILIZADA		SIN LIOFILIZAR		LIOFILIZADA		SIN LIOFILIZAR	
45°C	amb	45°C	amb	45°C	amb	45°C	amb
53,21	80,22	0,00	69,98	88,00	100	82,10	100
52,39	79,44	0,00	70,98	87,12	100	83,04	100
=====							
\bar{X} =52,8	79,83	0,00	70,48	87,56	100	82,57	100

(tabla 2-8)

El anova permite contrastar la hipótesis nula que admite que todas las medias son iguales y por ello no se consideran significa-

tivas las diferencias experimentales observadas.(147), (148).

Origen de la variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	cuadrado medio	F
formulaciones	SSA	K-1	$S^2 = \text{SSA}/K-1$ 1	S^2/S^2 1 2
error	SSE	K(n-1)	$S^2 = \text{SSE}/K(n-1)$ 2	
total	SST	nK - 1		

$$\text{SSA} = n \sum_{i=1}^8 (\bar{Y}_{i.} - \bar{Y}_{..})^2$$

$$\text{SSE} = \sum_{i=1}^K \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y}_{i.})^2$$

$$\text{SST} = \text{SSE} + \text{SSA}$$

K=8 K-1=7 K(n-1)=8 j=resultados

$$\bar{Y}_{..} = (52,8 + 79,83 + 70,48 + \dots + 100)/8 = 71,65$$

=====

$$\text{SSA} = 2 [(52,8 - 71,65)^2 + (79,83 - 71,65)^2 + \dots + (100 - 71,65)^2] = 15053$$

=====

$$\text{SSE} = (53,21 - 52,80)^2 + (52,39 - 52,80)^2 + \dots + (82,10 - 82,57)^2 = 1,9694$$

=====

$$S^2_1 = 2150,4 \quad S^2_2 = 0,24 \quad F_{\text{exp}} = 8960$$

=====

$$F_{\text{tab}}(K-1), K(n-1) = F(7,8) = 3,50 \dots \alpha=0,05$$

$$= 4,53 \dots \alpha=0,025$$

$$= 6,18 \dots \alpha=0,01$$

Como $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ las medias son significativamente diferentes. Hay diferencia entre las formulaciones ensayadas

Se pretende conocer entre que tipos de formulaciones existe diferencia significativa

$$DMS = T_{\alpha/2} \sqrt{ [SSE/K(n-1) (\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2})] }$$

$\alpha=0,01 \dots \dots \dots$	$T_{\alpha/2}$	$=3,355$
$\alpha=0,02 \dots \dots \dots$	"	$=2,896$
$\alpha=0,05 \dots \dots \dots$	"	$=2,306$
$\alpha=0,10 \dots \dots \dots$	"	$=1,860$
$\alpha=0,20 \dots \dots \dots$	"	$=1,397$

$$DMS = 1,64 \dots \dots \dots \alpha=0,01$$

=====

Una vez conocida la diferencia mínima que ha de existir para poder considerar que los valores medios difieren o no significativamente, se analiza el efecto de:

-Temperatura de ensayo

-Estado o no liofilizado del sistema

-Presencia o ausencia de atmósfera de nitrógeno

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO

Características	Ta(OC)	\bar{X}	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	conclusión
Liofilizada sin N 2	45	52,80	27,03	27,03 > 1,64 Hay diferencia significativa
	amb	79,83		
Sin liofilizar sin N 2	45	0,00	70,83	70,83 > 1,64 Hay diferencia significativa
	amb	70,83		
Liofilizada con N 2	45	87,56	12,44	12,44 > 1,64 Hay diferencia significativa
	amb	100,0		
Sin liofilizar sin N 2	45	82,57	17,43	17,43 > 1,64 Hay diferencia significativa
	amb	100.0		

(tabla 2-9)

INFLUENCIA DE LA LIOFILIZACION

Características	Estado físico	\bar{X}	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	conclusión
T _a =45 °C sin N 2	No liof.	0,00	52,80	52,80 > 1,64 Hay diferencia significativa
	liof.	52,80		
T _a amb. sin N 2	No liof.	70,48	9,36	9,36 > 1,64 Hay diferencia significativa
	liof.	79,84		
T _a =45 °C con N 2	No liof.	82,57	4,99	4,99 > 1,64 Hay diferencia significativa
	liof.	87,56		
T ₀ amb. con N 2	No liof.	100,0	0,00	0,00 < 1,64 No hay diferencia significativa
	liof.	100.0		

(tabla 2-10)

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA O AUSENCIA DE NITROGENO

Características	Ta(°C)	\bar{X}	$\bar{X}_1 - \bar{X}_2$	conclusión
Liofilizada Ta=45 °C	sin Nitr.	52,80	34,76	34,76 > 1,64 Hay diferencia significativa
	con Nitr.	87,56		
Sin liofilizar Ta=45 °C	sin Nitr.	0,00	82,57	82,57 > 1,64 Hay diferencia significativa
	con Nitr.	82,57		
Liofilizada Ta amb.	sin Nitr.	79,83	20,17	20,17 > 1,64 Hay diferencia significativa
	con Nitr.	100,0		
Sin liofilizar Ta amb.	sin Nitr.	70,48	29,52	29,52 > 1,64 Hay diferencia significativa
	con Nitr.	100,0		

(tabla 2-11)

Se observan diferencias significativas en todos los casos analizados, a excepción de mantener el sistema a temperatura ambiente, en presencia de atmósfera de nitrógeno e independientemente del estado físico : liofilizado o no del sistema

G/A continuación se analiza si existen o no diferencias significativas al comienzo y durante los procesos de pérdida de actividad vitamínica.

Se comparan los valores medios entre pares de datos obtenidos al

mantener constante la temperatura y el tipo de atmósfera en la que se conserva el sistema. Se pretende estudiar el efecto del proceso de liofilización.

Se aplica la prueba T, a fin de comparar dos medias, una vez comprobado la igualdad entre varianzas a través del Test F (149)

Se utiliza el estadístico
$$F = \frac{S^2_2}{S^2_1}$$

y se considera :Hipótesis nula:(Ho): $\sigma^2_1 = \sigma^2_2$...varianzas iguales

Hipótesis alternativa:(H1): $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$ " distintas

Se admite Ho siempre que: $F_{exp} < F_{tabulado}$ para un error definido y $(n_1 - 1)$ $(n_2 - 1)$ grados de libertad.

Para la prueba T se utiliza el estadístico (148)

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{Sp \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)^2} \quad Sp^2 = \frac{S^2_1 (n_1 - 1) + S^2_2 (n_2 - 1)}{n_1 + n_2 - 2}$$

con $n_1 + n_2 - 2$ grados de libertad

Hay diferencias significativas entre el sistema liofilizado y sin liofilizar en caso de que :

Texp > T tabulado en función de: * error α que se considere

* los grados de libertad

α	$\alpha/2$	T tabulado	$F_{1,1}$
0,2	0,1	1,886	
0,1	0,05	2,920	
0,05	0,025	4,303	161,4
0,02	0,010	6,965	
0,01	0,005	9,925	4052,0

SIN ATMOSFERA DE NITROGENO

Temperatura de ensayo (°C)	Tiempo de almacenamiento (semanas)	F exp	Sp	Texp	
45	4	2,86	0,542	16,64	(*)
45	5	1,14	0,445	33,40	(*)
ambiente	7	1,62	0,629	14,86	(*)
ambiente	9	1,42	0,561	29,66	(*)
5	38	0,29	0,265	5,95	(**)
5	43	2,28	0,525	6,14	(**)

(tabla 2-12)

(según los datos de las tablas:(2-1) (2-2))

CON ATMOSFERA DE NITROGENO

Temperatura de ensayo (°C)	Tiempo de almacenamiento (semanas)	F exp	Sp	Texp	
45	6	1,53	0,472	8,68	(***)
45	7	1,13	0,639	7,79	(***)
ambiente	52	1,75	0,327	5,97	(**)
ambiente	56	1,31	0,441	17,09	(*)
ambiente	58	1,12	0,505	34,50	(*)

(tabla 2-13)

(según los datos de las tablas:(2-3)(2-4))

SIN ATMOSFERA DE NITROGENO

RADIACION UV :254 NM

Tiempo de exposición (horas)	F exp	Sp	Texp	
0,25		0,431	23,78	(*)
0,50	2,85	0,485	18,08	(*)
1,50	1,27	0,416	20,00	(*)
2,75	1,13	0,024	278,78	(*)
3,25	1,21	0,044	136,87	(*)
4,00	1,00	0,510	11,64	(*)

(tabla 2-14)

(según los datos de la tabla:(2-5))

CON ATMOSFERA DE NITROGENO
RADIACION UV :254 NM

Tiempo de exposición (horas)	F exp	Sp	Texp	
1,00	2,70	0,288	7,84	(***)
3,00	1,05	0,133	38,06	(*)
4,00	1,00	0,570	10,29	(*)

(tabla 2-15)

(según los datos de la tabla (2-6))

(*) = Hay diferencias significativas incluso para $\alpha=0,01$

(**) = Hay diferencias significativas para $\alpha >0,02$
No hay diferencias significativas para $\alpha \leq 0,02$

(***) = Hay diferencias significativas para $\alpha >0,01$
No hay diferencias significativas para $\alpha \leq 0,01$

De todos éstos resultados se infiere que el proceso de liofilización contribuye a disminuir la pérdida de actividad de la vitamina A palmitato .

Para admitir que en algunas ocasiones no hay grandes diferencias entre el sistema liofilizado y sin liofilizar, se debe trabajar con errores $\alpha \leq 0,02$.

2.5. CONCLUSIONES

1/ A la vista de los resultados obtenidos, se puede deducir qué los factores que contribuyen a una mayor estabilidad de la vitamina A palmitato son:

- Bajas temperaturas de conservación
- Presencia de atmósfera de nitrógeno y protección de la luz solar directa
- liofilización

La estabilidad del principio activo aumenta al disminuir la temperatura de almacenamiento.

La atmósfera de nitrógeno aumenta el periodo durante el cuál se mantiene la actividad vitamínica, tanto más cuanto menor sea la temperatura ensayada.

2/La liofilización como factor a tener en cuenta a la hora de mantener la riqueza vitamínica, depende de las condiciones experimentales ensayadas.

Los sistemas liofilizados comienzan a manifestar signos de pérdida de actividad vitamínica algo más tarde que los sistemas sin liofilizar.

El efecto protector de la liofilización es tanto más acusado a medida que las condiciones de almacenamiento son más desfavorables, así se observa no solo a temperatura de 45°C, si no también al exponer la emulsión a radiación UV de 254 nm, pero al

disminuir la temperatura de almacenamiento dicho efecto es menos notable.

Si las condiciones de almacenamiento son favorables, una posible explicación al hecho de que la liofilización no juegue un papel importante a la hora de aumentar el periodo de actividad vitamínica respecto al sistema sin liofilizar, podría basarse en el siguiente argumento: Los sistemas liofilizados y sin liofilizar difieren desde el punto de vista químico en el contenido de agua y no parece ser ésta la causa de la degradación vitamínica, debido a que en el sistema liofilizado el porcentaje de agua es lo suficientemente pequeño para no influir y en el sistema sin liofilizar, al situarse la vitamina A palmitato en el interior de los glóbulos de la fase interna queda aislada de la fase acuosa, al menos durante el periodo de estabilidad física de la emulsión.

3/Es destacable el hecho de que una vez iniciada la degradación, el proceso se acelera tanto más, cuanto mayor sea la temperatura de almacenamiento, el contenido de oxígeno y al disponer de sistemas no liofilizados .

4/La potencia vitamínica no se modifica al someter al sistema liofilizado a las condiciones ambientales de humedad y oxígeno durante un periodo de cuatro horas .

5/La emulsificación de la vitamina A palmitato, no la protege de su degradación frente a la luz ultravioleta a pesar de conservar la en atmósfera de nitrógeno

CAPITULO 3
TENSIONES SUPERFICIALES E INTERFACIALES

3. ESTUDIO DE TENSIONES SUPERFICIALES E INTERFACIALES

- 3.1 OBJETIVO DEL ESTUDIO
- 3.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA
- 3.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES
- 3.4. TECNICA DE MEDIDA
- 3.5. RESULTADOS OBTENIDOS
- 3.6 CONCLUSIONES

3.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

El estudio experimental trata de responder a los siguientes interrogantes:

- 1/La influencia de la concentración de emulgente en el valor de tensión superficial.
- 2/Conocer el valor de la concentración crítica micelar.
- 3/Analizar el efecto que producen el resto de componentes de la fase acuosa sobre el valor de la tensión superficial.
- 4/Conocer el valor de la tensión interfacial de la emulsión ensayada.

3.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

Se utiliza un tensímetro basado en el método de placa de Wilhelmy, modelo Dognon Abribat (PROLABO)

La tensión superficial (γ), viene dada por la expresión:

$$\gamma = \frac{F}{2(\text{longitud} + \text{espesor})} \quad (\text{d/cm})$$

F=La fuerza necesaria para desprender la lámina de platino de la interfase líquido-líquido o líquido-aire.

La expresión matemática que nos permite conocer el valor final de la tensión superficial es la siguiente:

$$\gamma = \frac{\text{lectura} + X}{1000} \cdot \frac{981}{2(1,9565)} \quad (\text{d/cm})$$

X= el peso del caballete expresado en miligramos

Una vez efectuada la medida, al valor leído en la escala del miligrámetro se le suma el peso del caballete incorporado (x). El valor de la tensión superficial se ve afectado por la gravedad y las dimensiones de la lámina, cuyo perímetro equivale a dos veces su longitud mas el espesor.

3.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES

1/ La calibración del aparato se lleva a cabo antes de iniciar cualquier medida.

Sobre la lámina seca y limpia se deposita el caballete de 200 mg, el equilibrio se alcanza cuando la escala del miligrámetro señala cero. A continuación se incorpora el caballete de 100 mg y con la ayuda del potenciómetro (zero rápido y fino), se recupera el equilibrio a la vez que la escala del miligrámetro señala 100 .

2/La lámina de platino se mantiene sumergida en mezcla crómica. En el momento de su utilización se lava con agua y se seca a la llama de mechero bunsen. Es imprescindible que esté totalmente plana y seca antes de su uso.

3/Una vez calibrado el aparato al aire y antes de llevar a cabo ninguna medida, se comprueba la tensión superficial del agua a temperatura de 31°C, a fin de disponer de un resultado que nos asegure el buen funcionamiento del aparato.

4/Con el fin de analizar la influencia que sobre el valor de la tensión superficial tienen las distintas concentraciones de emulgente, se preparan distintas soluciones acuosas en las que el porcentaje de tensoactivo varia desde 0,001%-0,4% .
Se pesan 0,24 gramos de emulgente y se disuelven en 50 ml, de agua destilada y filtrada. A partir de ésta solución (0,48 %), se preparan las soluciones a ensayar.

5/Para analizar el efecto del manitol como componente de la fase acuosa, se preparan soluciones acuosas en las que el porcentaje de emulgente varia entre los límites señalados anteriormente y en las que se incorpora manitol en un 6 %, con agitación magnética durante media hora.

6/A las soluciones acuosas de manitol y sales biliares, se les incorpora carboximetilcelulosa sódica en un 1,3%. La agitación se mantiene hasta dispersión completa del viscosizante en un homogeneizador Politrón, modelo PT 3000 a 11000 rpm durante tres minutos.

7/Las ensayos se realizan a temperatura de 31°C

8/Las muestras problema se depositan en unos vasos termostatizados mediante una camisa por la que se hace circular agua a la temperatura de ensayo. La solución o dispersión a medir se desliza lentamente por las paredes del vaso a fin de evitar turbulencias y burbujas .

Se mantienen en reposo media hora antes de llevar a cabo la lectura; tiempo suficiente no solo para estabilizar el posible desorden molecular debido al vertido, si no para conseguir termostatar toda la masa a la temperatura del ensayo.

Durante éste periodo de tiempo, se cubre el vaso medidor a fin de evitar la posible entrada de impurezas que originarian resultados erróneos.

9/Antes de comenzar la medida se sumerge la lámina en la muestra problema y se deja reposar un minuto.

10/Cada medida se repite tres veces

3.4.TECNICA DE MEDIDA

Como ya se ha indicado, después de calibrar el tensiometro al aire y comprobar la tensión superficial del agua, se seca el vaso medidor con acetona y se deposita la muestra problema.

Pasada media hora, se coloca la lámina de platino junto con el cablete de 100 mg o 200 mg (en caso de ser necesario).Se sumerge la lámina en la muestra problema durante un minuto, (puede observarse la pérdida del equilibrio al ponerse en contacto la lámina con la superficie líquida).

La medida se realiza del siguiente modo: Se coloca el miligrámetro en su posición de medida y con ayuda del potenciómetro zero rápido, se equilibra lentamente la aguja .El potenciómetro zero fino y el botón de cremallera nos permiten equilibrar e ir sacando poco a poco la lámina, ésto ha de realizarse muy lentamente, puesto que es muy importante controlar el punto final lo que supone desprendimiento de la lámina y la pérdida total del equilibrio.

La escala del miligramómetro da un valor en miligramos al que hay

que sumar cién, (en caso de haber colocado el caballete de 100 mg) doscientos, (en caso de nó colocar ningún caballete). Solo en aquellas situaciones en las que para medir se ha colocado el caballete de 200 mg , el valor admitido es el que se lee directamente de la escala.

El valor de tensión superficial viene dado por el producto de la lectura y un factor: $(g/2l=0,25)$, que depende de la gravedad (g) y la longitud de la lámina (l).

Según sea el valor de tensión superficial, será o nó necesario colocar sobre la lámina los caballetes de 100 o 200 mg.

Tensiones superficiales superiores a 50 dinas/cm, se miden directamente con solo la lámina de platino, pero tensiones inferiores a ese valor, obligan a suministrar un peso para permitir que la lámina se sumerja en el problema, ésto es: tensiones comprendidas entre 25 dinas/cm y 50 dinas/cm, se miden al colocar un caballete de 100 mg. El caballete de 200 mg, se utiliza en caso de tensiones inferiores a 25 dinas/cm.

Las muestras problema con viscosizante (CMC Na), obligan a tener que introducir una modificación. Hay que tener presente la adherencia a la lámina de la carboximetilcelulosa sódica y por ello , la fuerza que hay que hacer para sacar la lámina no solo se debe a la tensión del problema, si no también al peso de viscosizante adherido .

Para solventar éste posible error, se controla:

- el peso de la lámina limpia (p_1)
- el peso de la lámina después de sacarla de la muestra problema en la que quedará adherida la carboximetilcelulosa (p_2)
- la diferencia de ambos pesos ($p_1 - p_2 = p_3$)

La tensión superficial vendrá dada por la expresión :

$$(X - P_3) 0,25 \quad (d/cm)$$

X=valor leído en la escala del miligrámetro con las correcciones necesarias en caso de colocar algún caballete

La medida de la tensión interfacial se lleva a cabo del siguiente modo: Se dispone del mismo vaso medidor al utilizado en caso de tensiones superficiales. Se desliza por las paredes la fase acuosa de la emulsión y se deja reposar media hora a fin de alcanzar la temperatura de 31°C, se introduce la lámina de platino junto con el caballete de 100 mg, se añade con cuidado la fase oleosa hasta cubrir la lámina y se mantiene en reposo quince minutos para termostatar toda la muestra .

Al sacar la lámina, puede observarse su desprendimiento de la interfaz. El valor leído en la escala nos permite conocer la suma de las fuerzas de tensión superficial y tensión interfacial

A partir de la tensión calculada y conocida la tensión superficial de la fase acuosa, se calcula la tensión interfacial a través de la expresión:

$$TENSION\ TOTAL = TENSION\ SUPERFICIAL - TENSION\ INTERFACIAL$$

3.5.RESULTADOS OBTENIDOS

La tabla (3-1) y gráfica (3-I), muestran la variación que experimenta la tensión superficial al ir variando las concentraciones de emulgente, así como la influencia del manitol y la carboximetilcelulosa sódica en porcentajes de 6% y 1,3% respectivamente.

1/La tensión superficial disminuye al aumentar el porcentaje de emulgente hasta de un valor de 0,4 % , a partir del cuál independientemente de la composición de la fase acuosa, la tensión superficial aumenta.

2/ La variación que se experimenta, depende de la concentración de tensoactivo con la que se trabaje.

A concentraciones comprendidas entre:(0,001 % - 0,01 %) , pequeñas modificaciones suponen grandes variaciones de tensión superficial.

A partir de 0,01 % , se observa un cambio en la pendiente de la gráfica, lo que explica su proximidad al valor de la concentración crítica micelar .

Porcentajes de emulgente comprendidos entre: (0,1 % - 0,3 %) , suponen pequeñas variaciones de tensión superficial.

3/ A la vista de éstos resultados, la concentración crítica micelar está comprendida entre:(0,1 % - 0,15 %).

4/ La CMC es inferior a la concentración de emulgente utilizado al preparar la emulsión.

5/ Las tensiones superficiales, independientemente de la concentración de tensoactivo con el que trabajemos, aumentan con la presencia de manitol y mucho más al existir carboximetilcelulosa sódica en el medio.

6/ Independientemente de la presencia o no de viscosizante y manitol, se observa un cambio de pendiente en la gráfica: tensión superficial-concentración, para porcentajes de (0,1 % - 0,15 %)

7/La tensión interfacial a la temperatura de 31°C , depende de la fase acuosa ensayada .(Tabla 3-2)

La incorporación de manitol y carboximetilcelulosa sódica, supone un aumento de la tensión interfacial con respecto al valor obtenido con solo emulgente .

TENSIONES SUPERFICIALES (d/cm)

EMULGENTE %	EMULGENTE solo	EMULGENTE + MANITOL	EMULGENTE + MANITOL + CMCNa
0,001	63,88	67,50	70,20
0,002	55,56	-	-
0,003	52,51	-	-
0,004	49,31	53,87	57,00
0,005	45,06	-	-
0,006	41,29	44,12	-
0,007	38,80	-	-
0,008	37,50	41,50	50,00
0,009	36,00	-	-
0,01	35,00	36,37	38,37
0,02	32,10	-	-
0,03	30,37	30,75	35,25
0,04	29,45	-	-
0,05	29,00	29,25	34,32
0,06	28,30	-	-
0,07	28,00	28,75	-
0,08	27,81	-	32,10
0,09	27,68	27,50	-
0,10	26,90	26,75	30,25
0,15	25,99	26,75	-
0,20	25,75	26,00	29,55
0,25	25,00	26,25	30,00
0,3	24,50	26,00	33,00
0,35	24,13	-	-
0,40	26,25	-	-
0.45	27,25	-	34,12
0.50	28,50	28,87	35,12
0.60	31,50		-

(tabla 3-1)

TENSIONES INTERFACIALES (d/cm)

Condiciones experimentales:
=====

Temperatura : 31°C

Solución acuosa de emulgente 0,5 % : -----4.75 d/cm

Solución acuosa de emulgente 0,5% y

manitol 6%:-----5.25 d/cm

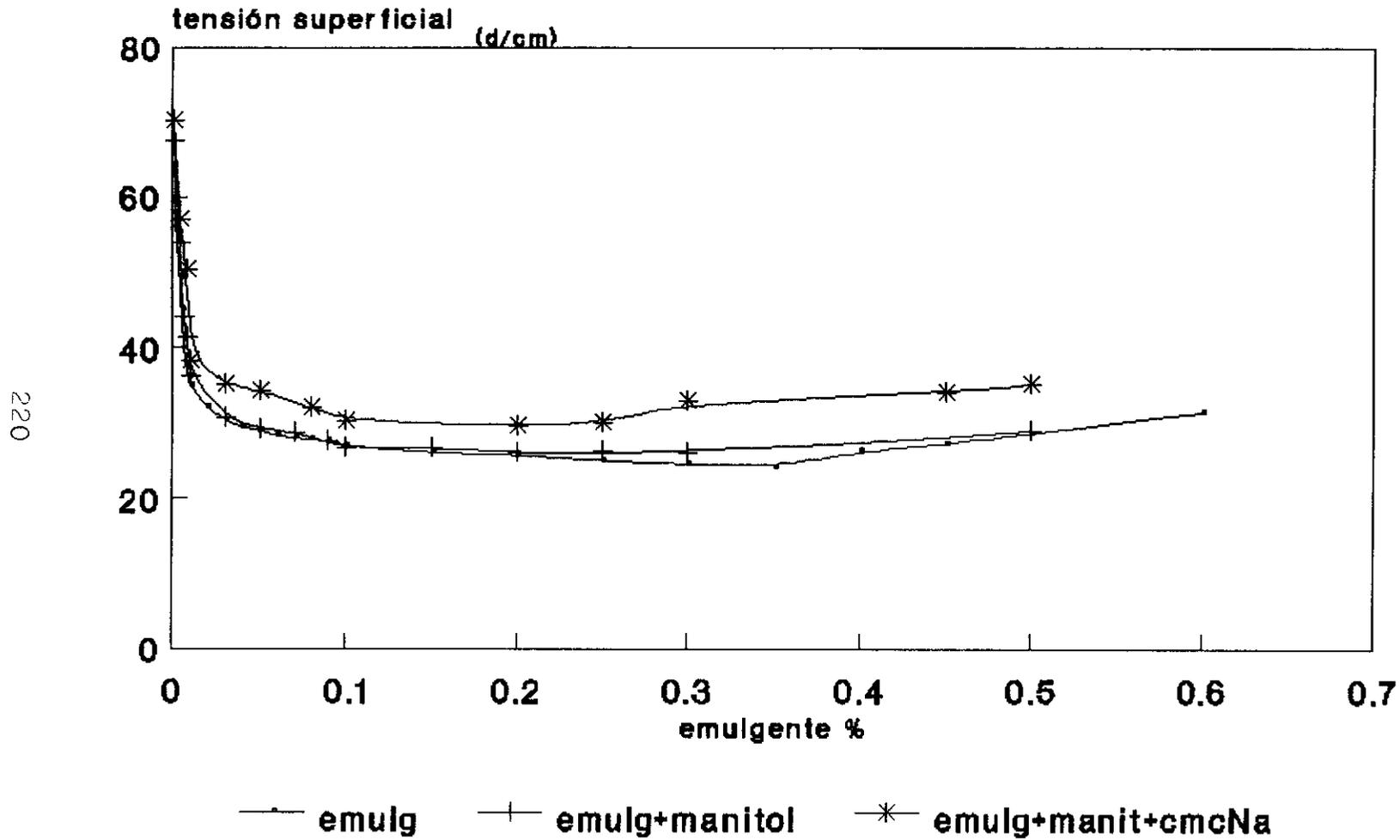
Dispersión acuosa de emulgente 0,5 % manitol 6% y

carboximetilcelulosa sódica 1,3%-----6.23 d/cm

(tabla 3-2)

VARIACION DE TENSIONES SUPERFICIALES

Emulgente,Manitol(6%),CmcNa(1.3%)



Temperatura 31°C

(gráfica 3-1)

3.6 CONCLUSIONES

1/ El hecho de que la tensión superficial no se estabilice a partir de la cmc, queda justificada al no disponer de un único - tipo de emulgente. En el boletín de análisis puede observarse que se trata de una mezcla de sales biliares . El interés por su utilización se debe a que aporta un medio de trabajo que se asemeja a las condiciones fisiológicas.

2/En soluciones acuosas con solo emulgente, la concentración crítica micelar se fija en 0,1 % de agente tensioactivo . Se admite que a esa concentración aparece el primer tipo de micelas y con ello se explica la tendencia a la estabilización de la tensión superficial.

La presencia de otras estructuras micelares motivan las variaciones observadas al aumentar el porcentaje de emulgente y estarán justificadas por la posibilidad de disponer de micelas mixtas.

3/ La presencia de manitol e incluso de carboximetilcelulosa sódica no parecen afectar a la cmc del emulgente solo, puesto que en todos los casos se detecta una tendencia a la estabilización de la tensión superficial a partir de 0,1 % de agente tensioactivo.

4/El hecho de que en función de la composición química de la fase acuosa, el valor de la tensión superficial a la cmc varíe , se

explica debido a las modificaciones estructurales de la micela, como ha podido detectarse en ésta misma memoria por medidas espectrofotométricas .

5/El hecho de que la CMC Na aumente la tensión superficial respecto al emulgente solo e incluso en presencia de manitol, no afecta de forma negativa a la hora de preparar el sistema emulsificado, debido a que contribuye a disminuir la velocidad de sedimentación por aumento de viscosidad.

CAPITULO 4
MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS DE LOS
COMPONENTES DE LA FASE ACUOSA

4.MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS DE LOS COMPONENTES
DE LA FASE ACUOSA

- 4.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO
- 4.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA
- 4.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES
- 4.4. RESULTADOS OBTENIDOS
- 4.5. CONCLUSIONES

4.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO

1/Se pretende detectar la presencia de micelas a través de medidas de absorbancia.

2/ Relacionar las lecturas espectrofotométricas con los resultados obtenidos en otras técnicas a fin de conocer la concentración crítica micelar.

3/Detectar modificaciones estructurales de la micela a través de los espectros de primera y segunda derivada .

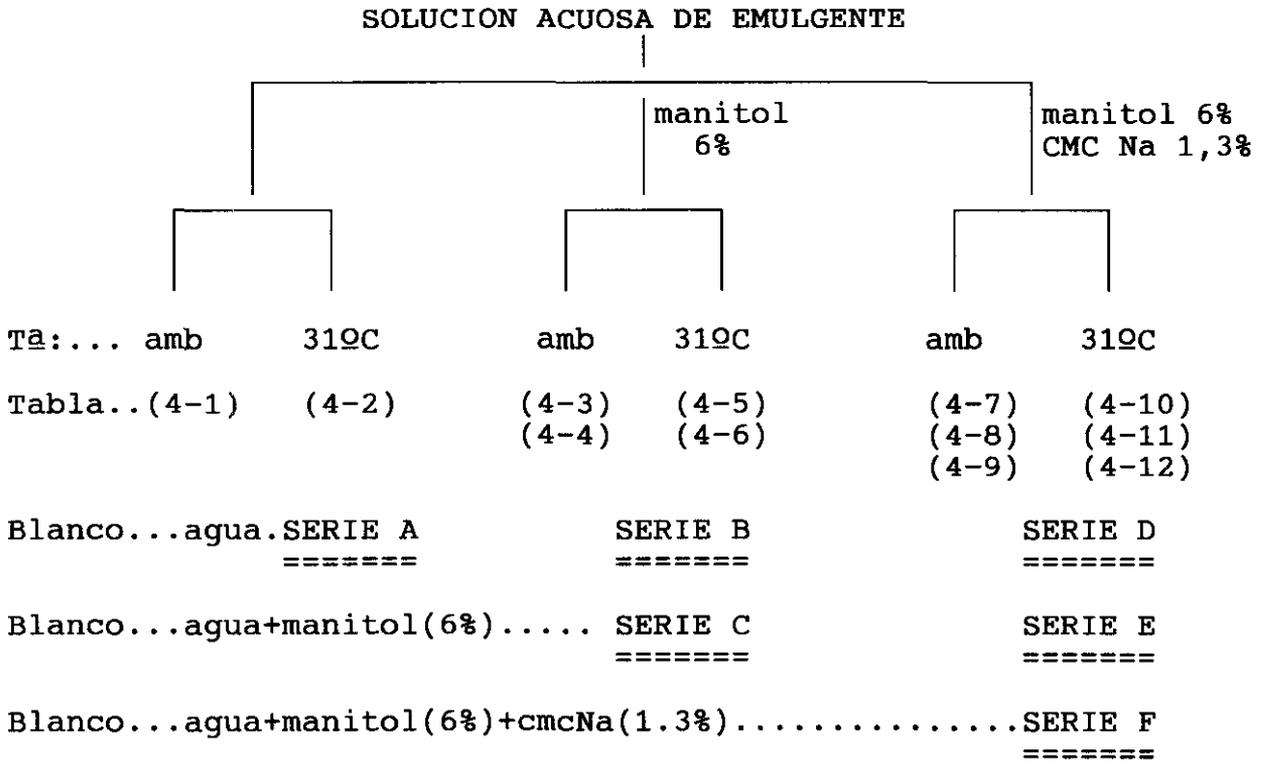
4/Analizar el efecto de la temperatura de ensayo en los resultados obtenidos.

4.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

Se utiliza un espectrofotómetro modelo PERKIN ELMER

4.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

-En agua recientemente destilada y filtrada se preparan soluciones de emulgente desde: (0,001 % a 0,5 %) y se sigue el siguiente esquema de trabajo.



Con el fin de conocer la longitud de onda de máxima absorción, se hace un barrido entre 200 nm - 300 nm frente a los diferentes blancos y se registran los espectros de absorción, primera y segunda derivada. En los espectros correspondientes a la segunda derivada, $\Delta\lambda = 4\text{nm}$

A fin de evaluar las absorbancias de la solución de manitol se registra su espectro entre (200-220 nm) a temperatura ambiente, tabla (4-13) frente a un blanco de agua destilada.

Con el fin de conocer la absorbancia debida no solo al viscosizante, si no a la mezcla de cmcNa-manitol, se registran los espectros de una dispersión acuosa de manitol al 6% y cmcNa al 1,3% frente a blancos: agua destilada y solución acuosa de manitol al 6%.

4.4 RESULTADOS OBTENIDOS

Las tablas que a continuación se muestran, registran la longitud de onda y el logaritmo de máxima absorción en cada uno de los ensayos.

Al disponer exclusivamente de soluciones acuosas de emulgente. (SERIE A), podemos observar que:

1/Concentraciones de emulgente menores a 0,04 % no presentan un máximo de absorbancia a longitudes de onda mayores de 200 nm, independientemente de la temperatura de ensayo: (ambiente, 31°C)

tablas:(4-1) (4-2).

2/Un aumento en el porcentaje de emulgente no solo desplaza el máximo de absorbancia a longitudes de onda mayores y permite valores de absorbancia creciente, si no que el aspecto y la anchura de la banda de absorción difiere de acuerdo a la concentración de tensoactivo. Gráfica (4-I). Serie A.

3/Un estudio mas detallado de la primera derivada (gráfica 4-II) Serie A, permite observar en las proximidades a 234 nm y 246 nm el inicio de un hombro a partir de 0,1 % de emulgente. Concentraciones superiores a 0,2 % de emulgente permiten registrar espectros de primera y segunda derivada que difieren al aumentar la concentración de emulgente .

4/Los espectros de segunda derivada detectan pequeñas diferencias a partir de 0,1 % de emulgente . Gráfica (4-IIIa) , éstas diferencias son mas considerables a medida que el porcentaje de emulgente aumenta. Gráficas:(4-IIIb)(4-IIIc).

5/ La gráfica(4-IV) muestra la variación de absorbancia en función de la concentración de emulgente. El primer cambio de pendiente en la intersección de las rectas se detecta a partir de 0,1 % de agente tensoactivo.

La absorbancia disminuye con el aumento de la temperatura, pero a partir de 0,2 % de emulgente los valores obtenidos resultan ser menos dependientes de la temperatura de ensayo.

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE

=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	204	2,699	0,431
0,06	205	2,740	0,437
0,07	206	2,772	0,442
0,08	207	2,802	0,447
0,09	208	2,822	0,450
0,10	209	2,857	0,455
0,15	211	2,907	0,463
0,20	214	2,974	0,473
0,25	215	2,995	0,476
0,30	217	3,035	0,482
0,33	219	3,070	0,487
0,35	219	3,070	0,487
0,36	220	3,087	0,489
0,40	221	3,104	0,491
0,45	223	3,137	0,496
0,50	225	3,168	0,500

Blanco: agua

T_a ambiente

SERIE A

=====

(tabla 4-1)

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE

=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	205	2,674	0,427
0,06	206	2,715	0,433
0,07	207	2,750	0,439
0,08	208	2,780	0,444
0,09	209	2,811	0,448
0,10	210	2,831	0,451
0,15	212	2,892	0,461
0,20	215	2,965	0,472
0,25	217	3,008	0,478
0,30	218	3,019	0,480
0,33	220	3,067	0,486
0,35	221	3,085	0,489
0,40	222	3,102	0,491
0,45	223	3,118	0,493
0,50	226	3,160	0,499

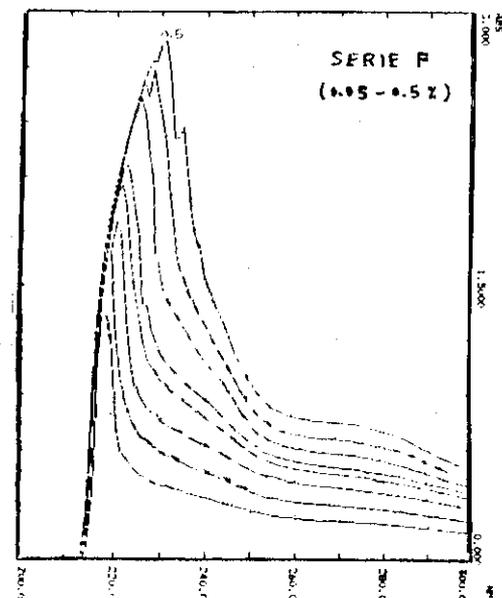
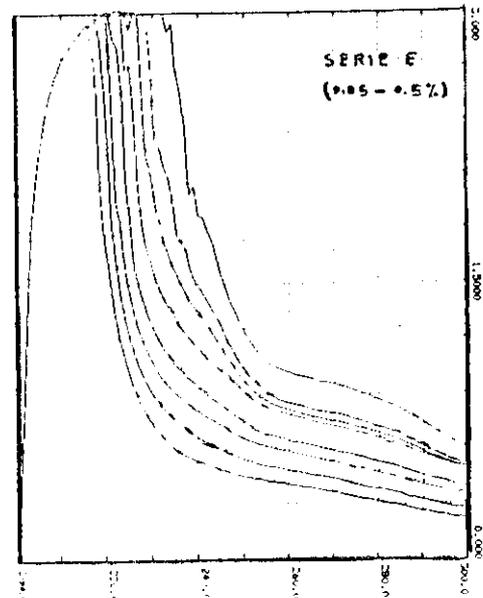
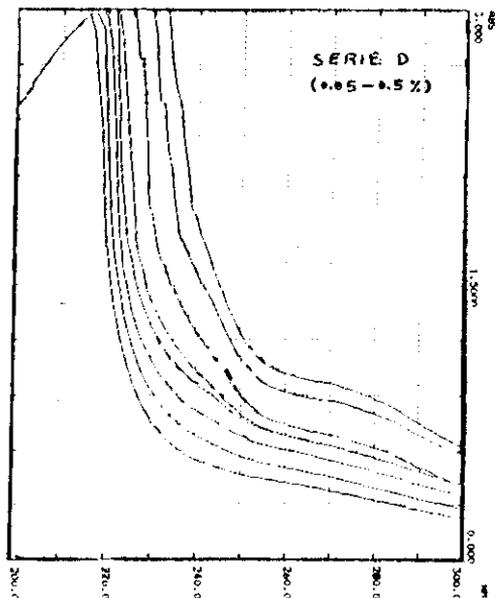
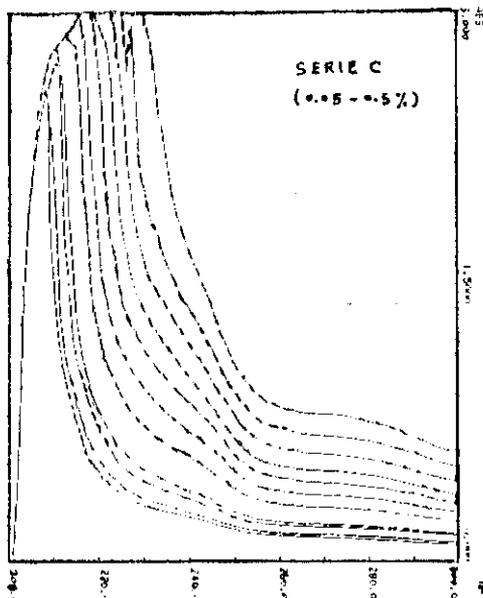
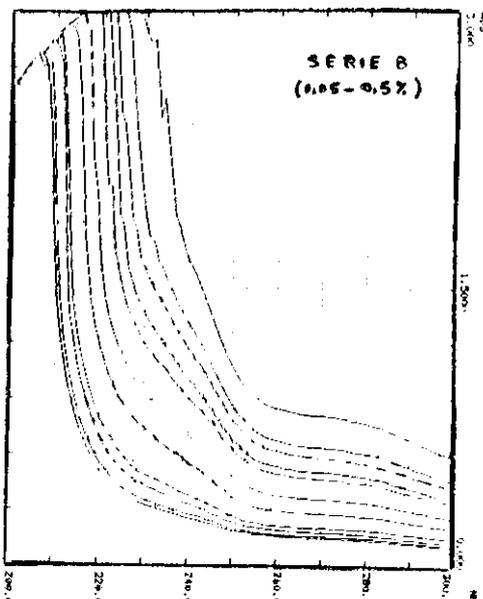
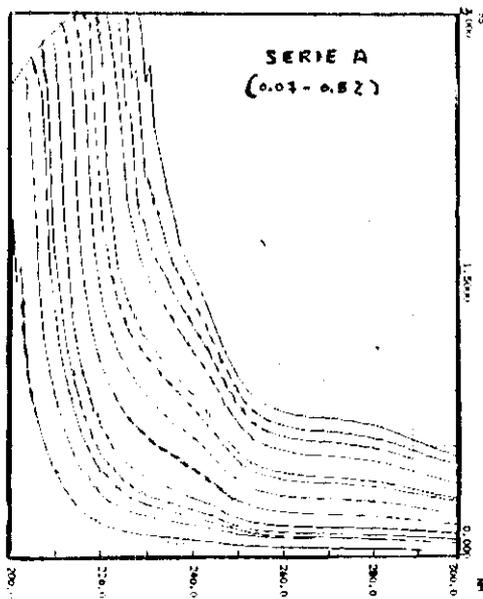
Blanco: agua Ta 31°C SERIE A

=====

(tabla 4-2)

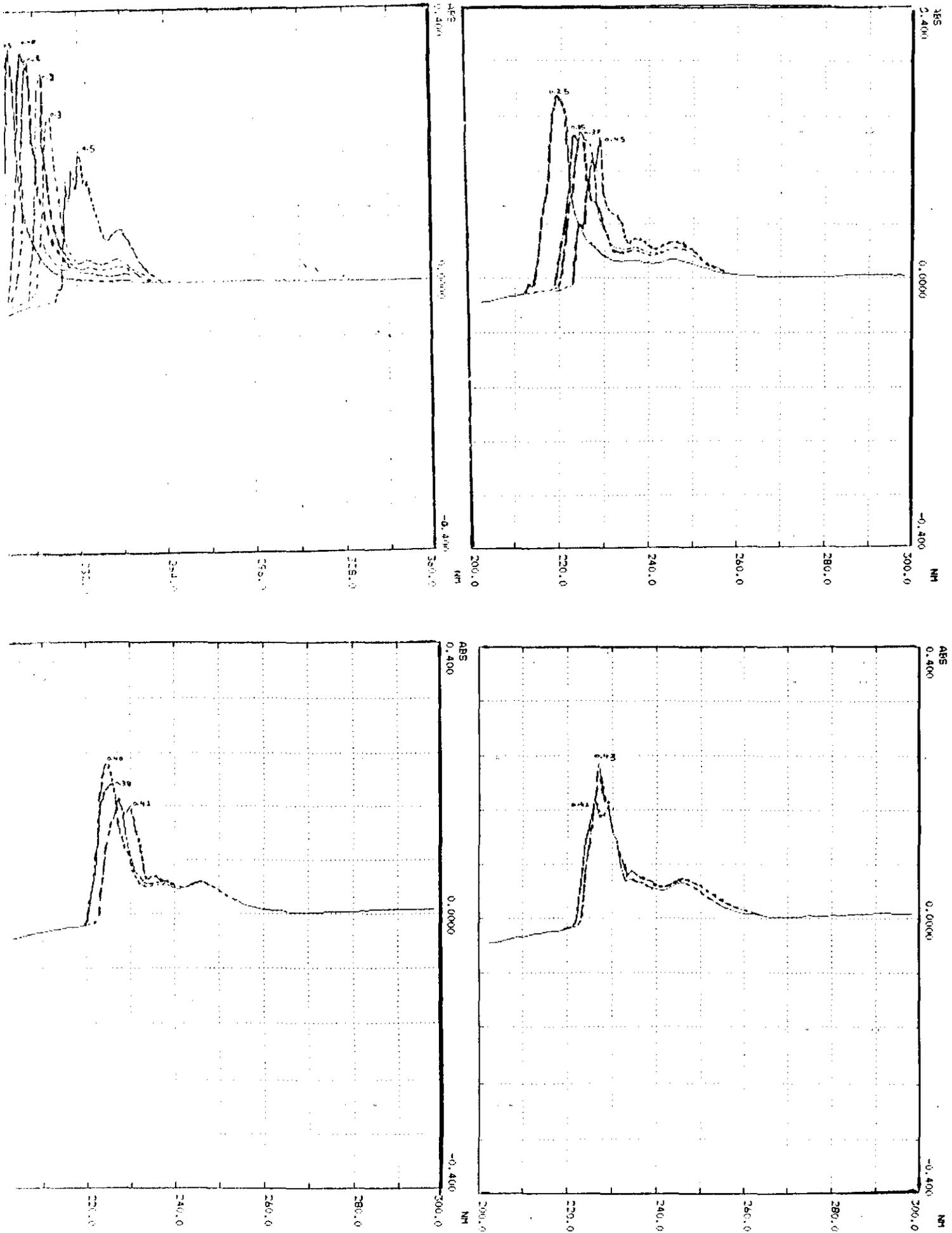
ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

ABSORBANCIA



ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

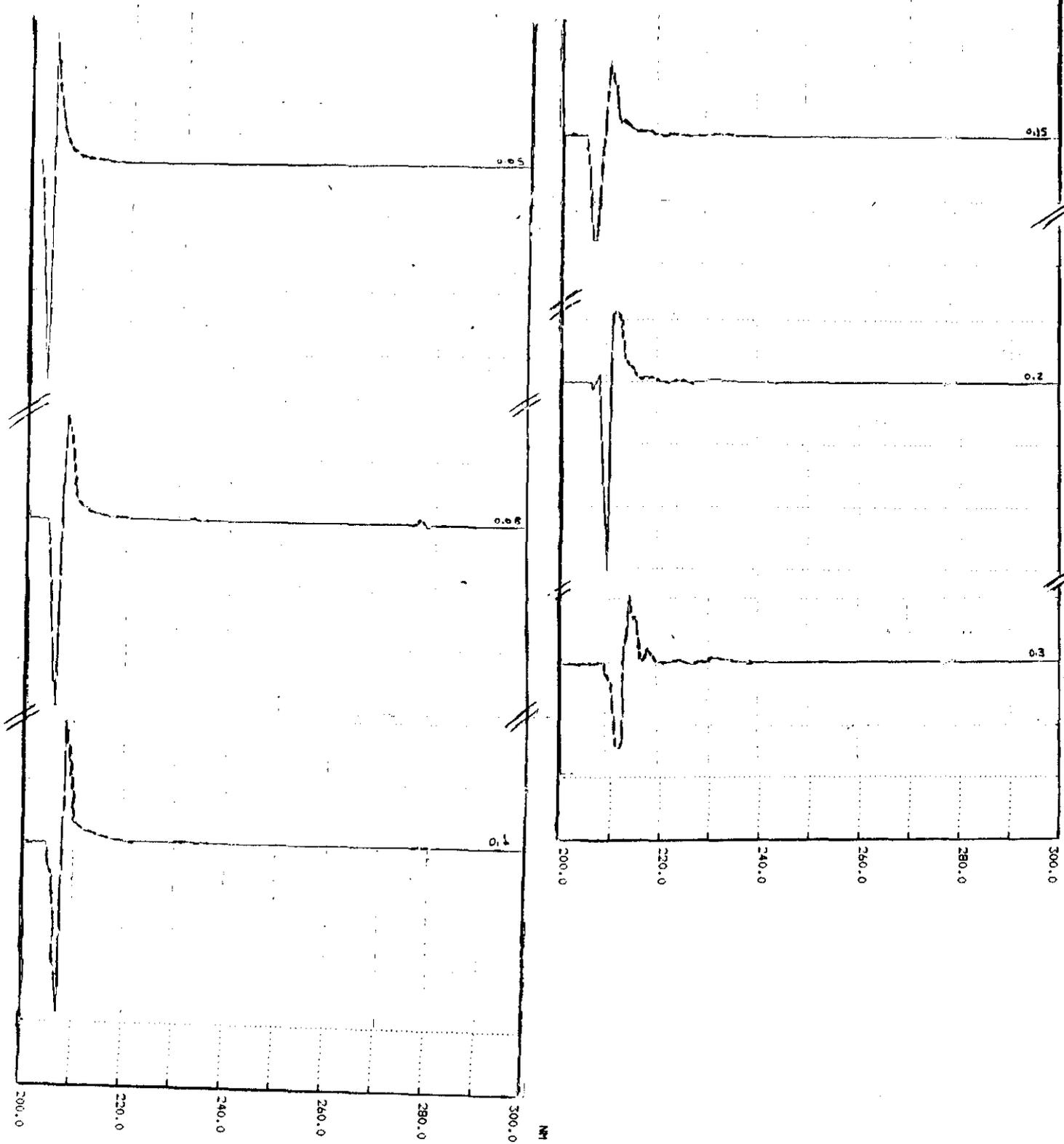
1ª DERIVADA SERIE A



Gráfica (4-II)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

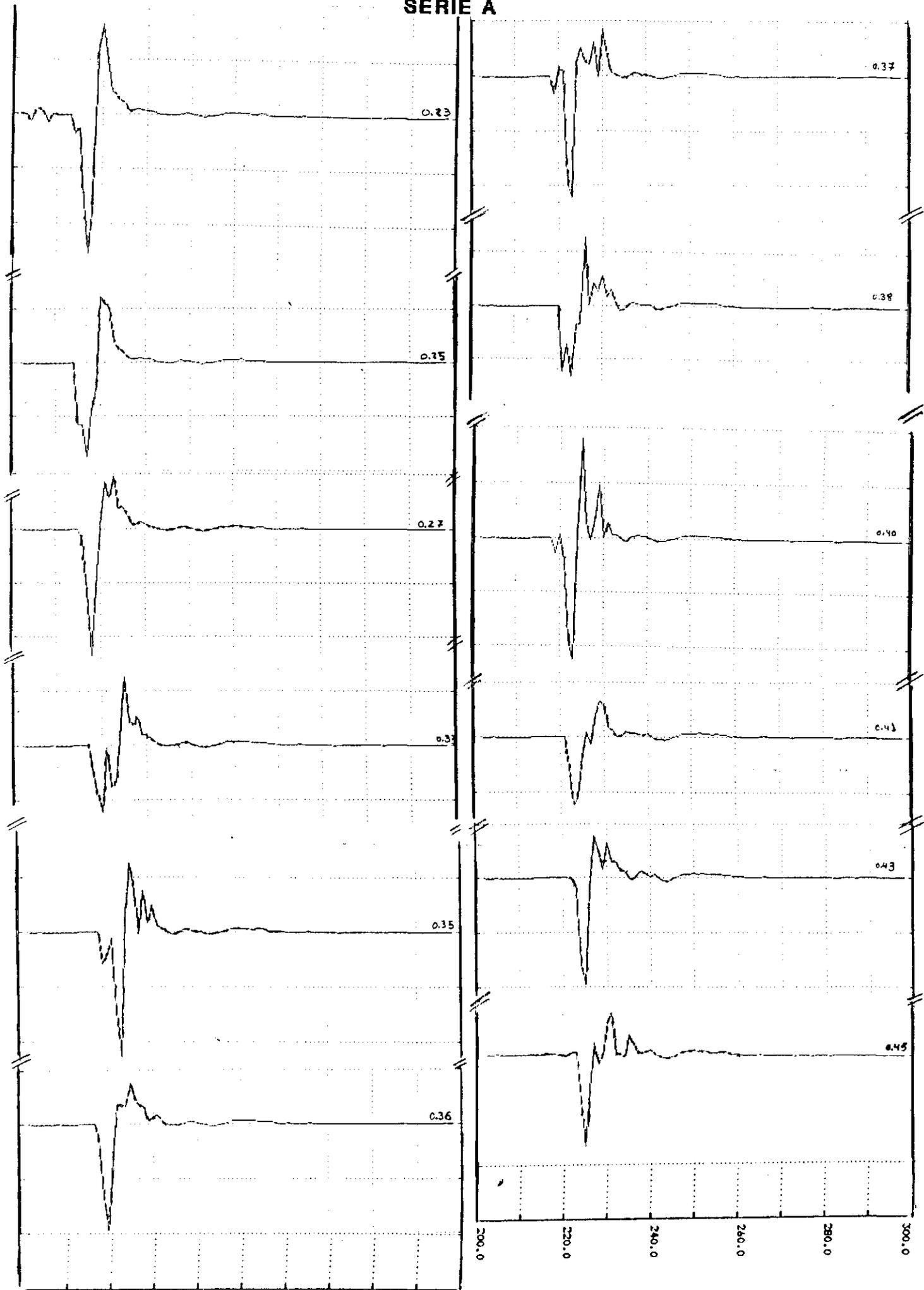
2ª DERIVADA
SERIE A



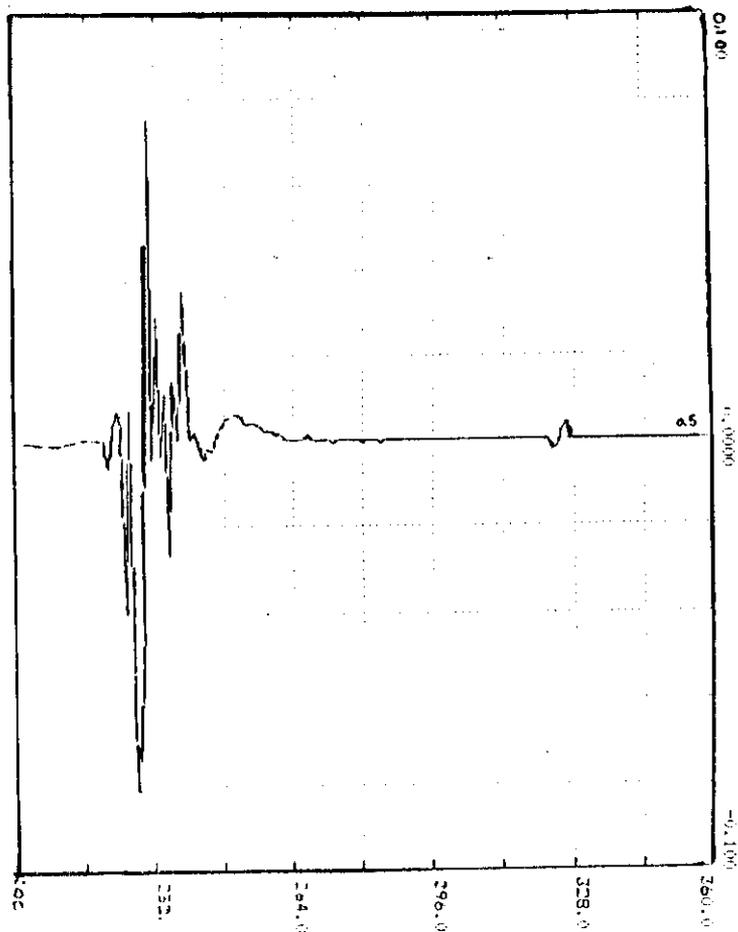
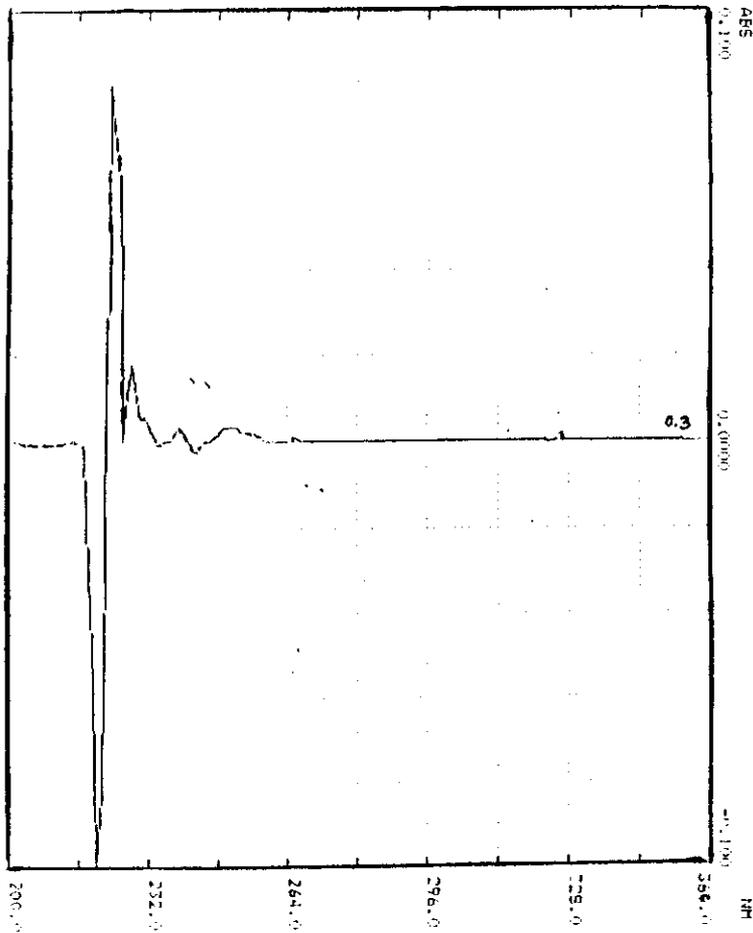
Gráfica (4-IIIa)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

2ª DERIVADA SERIE A

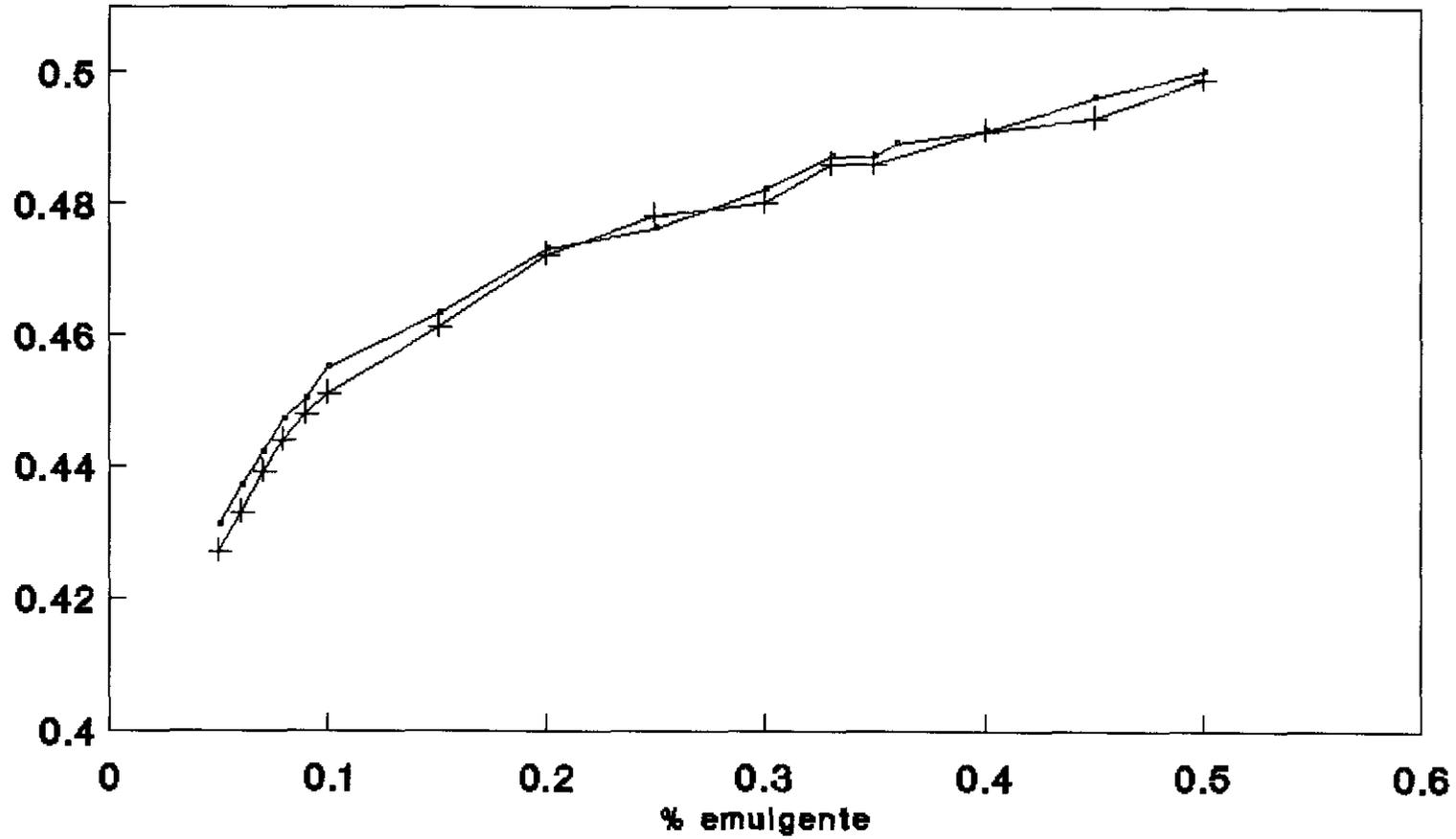


2ª DERIVADA
SERIE A



SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE

log absorbancias



— T^a: amb + T^a: 31°C

blanco : agua

(gráfica 4-IV)

6/La presencia de manitol en la solución acuosa de sales -
biliares produce modificaciones que no solo afectan al aspecto de
la banda si no que además se detecta una variación en la absor -
bancia y en la longitud de onda de máxima absorción. Tablas:(4-3),
(4-4),(4-5)(4-6). Series B y C.

7/Al comparar los espectros de las series A , B , C,se ob -
serva:

- Los bandas espectrales de la serie B son muy semejantes a
las de la serie A. Gráfica (4-I), salvo que las bandas de absor -
ción en la serie B son mas anchas, con un máximo desplazado a ma -
yor longitud de onda y superior valor de absorbancia.

Los espectros de primera derivada muestran en la serie B, al i -
gual que ocurre con la serie A, un primer hombro a partir de 0,1%
de emulgente. Gráfica (4-V). A partir de 0,2 % de agente tensoac -
tivo, pequeñas variaciones en la concentración suponen diferen -
cias espectrales en la primera y segunda derivada que permiten -
diferenciar los espectros de la serie A y serie B. Gráficas : -
(4-IIIa,b,c) (4-VII) y con ello demostrar la influencia del mani -
tól.

-La banda de absorción de la serie C es diferente a las de
la serie A y B. Gráfica(4-I).

Desde 0,05 % hasta 0,2 % de emulgente las absorbancias de la se -
rie A son superiores a las de la serie C, pero a partir de ese
porcentaje de emulgente sucede lo contrario.Tablas:(4-1),(4-4)

Las longitudes de onda de máxima absorción son mayores en la serie C que en la A. La zona de los máximos de absorción difiere en las dos series.

Los espectros de primera derivada de la serie A son diferentes de los obtenidos en la serie C, de lo que se deduce que la presencia de manitol afecta a las estructuras capaces de absorber en el espectro ultravioleta así como a las micelas formadas.

-En todos los porcentajes ensayados, la banda de la serie C parece estar incluida en la banda de la serie B.

La diferencia entre las dos bandas no coincide con el espectro obtenido con la solución acuosa de manitol al 6% (gráfica 4-IX) por lo que se deduce que hay moléculas de manitol que interaccionan y dejan de estar en forma de manitol libre.

La gráfica (4-VIII) muestra los resultados obtenidos según el blanco utilizado en la valoración.

-Se llega a absorbancias mayores al utilizar como blanco agua destilada (Serie B), (gráfica 4-VIII) y a medida que el porcentaje de emulgente aumenta.

-El aumento de temperatura supone una disminución de la absorbancia hasta alcanzar un 0,2 % de emulgente, valor a partir del cual afecta menos la temperatura ensayada (Serie B). En los espectros de la serie C la temperatura apenas afecta.

- La gráfica (4-VIII) muestra un primer cambio de pendiente en la intersección de las rectas a partir de 0,08 % de emulgente en la serie C y en 0,01 % en la serie B.

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE Y MANITOL 6%

=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	206	2,775	0,443
0,06	207	2,809	0,448
0,08	208	2,835	0,452
0,10	209	2,885	0,460
0,15	212	2,936	0,467
0,20	215	3,003	0,477
0,25	217	3,043	0,483
0,30	219	3,079	0,488
0,35	221	3,115	0,493
0,40	223	3,148	0,498
0,50	226	3,196	0,504
0,50	225	3,180	0,502

Blanco :agua Ta ambiente SERIE B
=====

(tabla 4-3)

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE Y MANITOL 6%

=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	207	2,515	0,400
0,06	208	2,575	0,410
0,08	209	2,717	0,434
0,10	210	2,782	0,444
0,15	212	2,879	0,459
0,20	215	2,970	0,473
0,25	217	3,016	0,479
0,30	218	3,037	0,482
0,35	221	3,092	0,490
0,40	222	3,109	0,493
0,50	227	3,191	0,503
0,50	226	3,175	0,501

Blanco:solución acuosa de manitol 6%

Ta ambiente . SERIE C

=====

(tabla 4-4)

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE Y MANITOL 6%
=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	206	2,710	0,433
0,06	207	2,756	0,440
0,08	208	2,793	0,446
0,10	210	2,853	0,455
0,15	214	2,954	0,470
0,20	216	2,988	0,475
0,30	218	3,037	0,482
0,40	223	3,124	0,494
0,50	227	3,188	0,503

Blanco: agua T_a 30°C SERIE B
=====

(tabla 4-5)

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE Y MANITOL 6%

=====

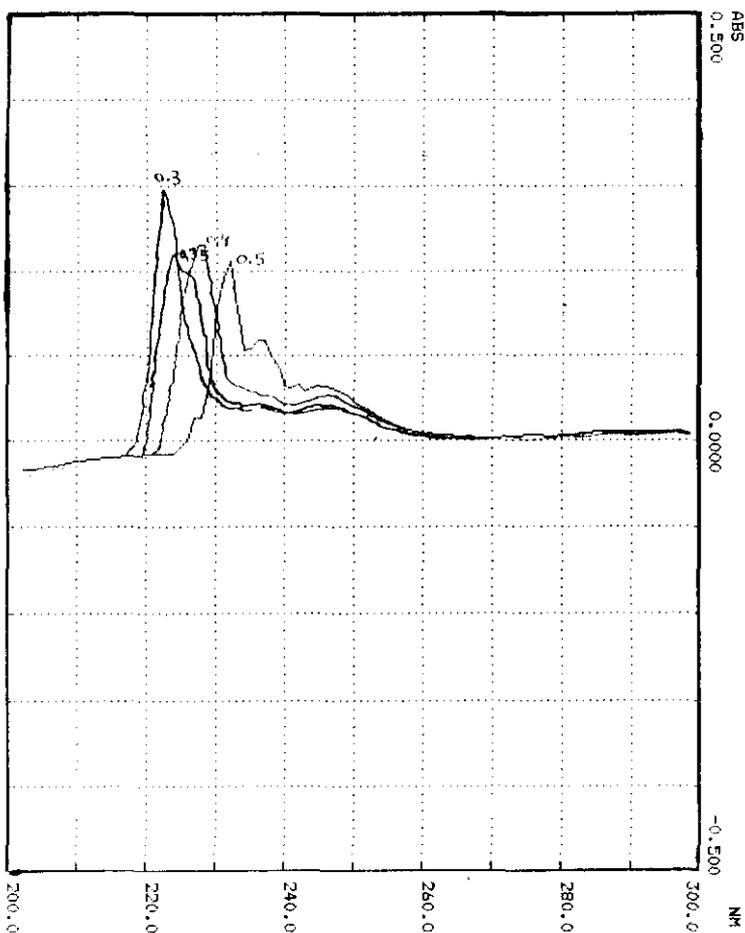
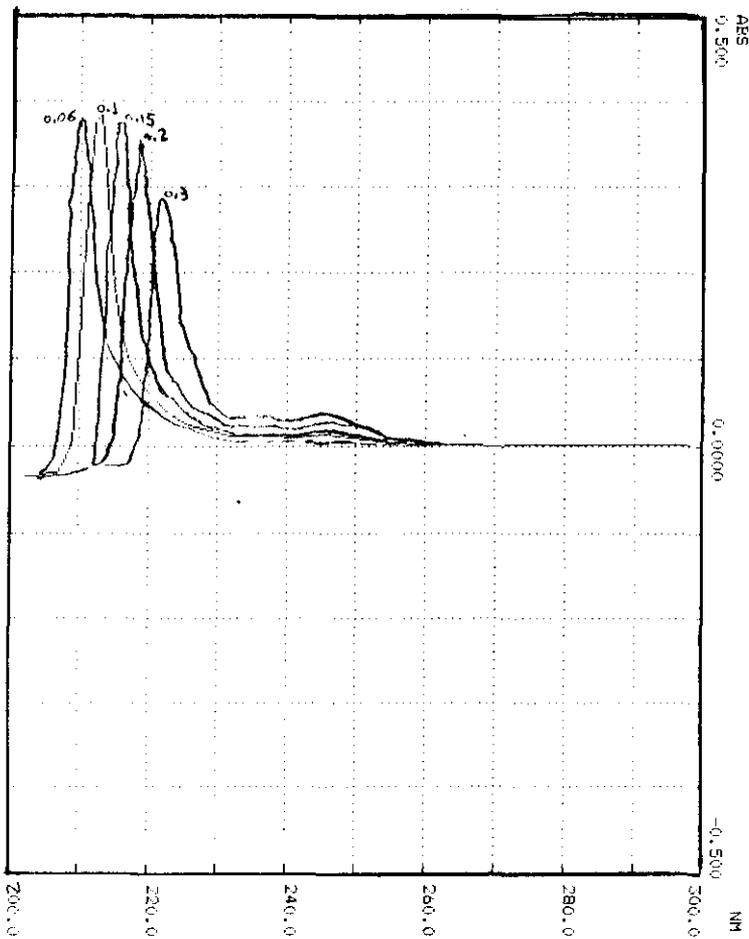
% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	207	2,486	0,395
0,06	208	2,574	0,410
0,08	209	2,717	0,434
0,10	210	2,782	0,444
0,15	212	2,879	0,459
0,20	215	2,970	0,472
0,25	217	3,016	0,479
0,30	219	3,057	0,485
0,35	221	3,092	0,490
0,40	223	3,117	0,493
0,50	227	3,191	0,503

Blanco: solución de manitol 6%

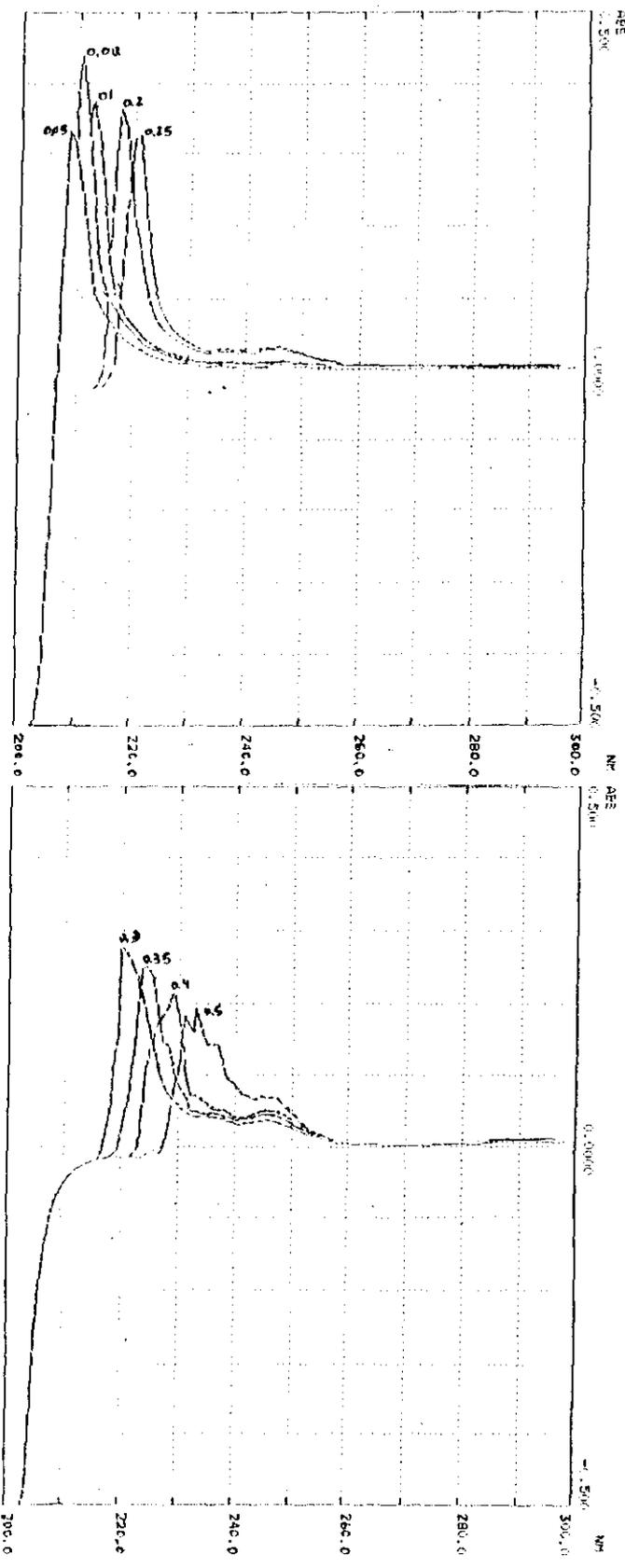
Ta 310C SERIE C
 =====

(tabla 4-6)

1ª DERIVADA SERIE B



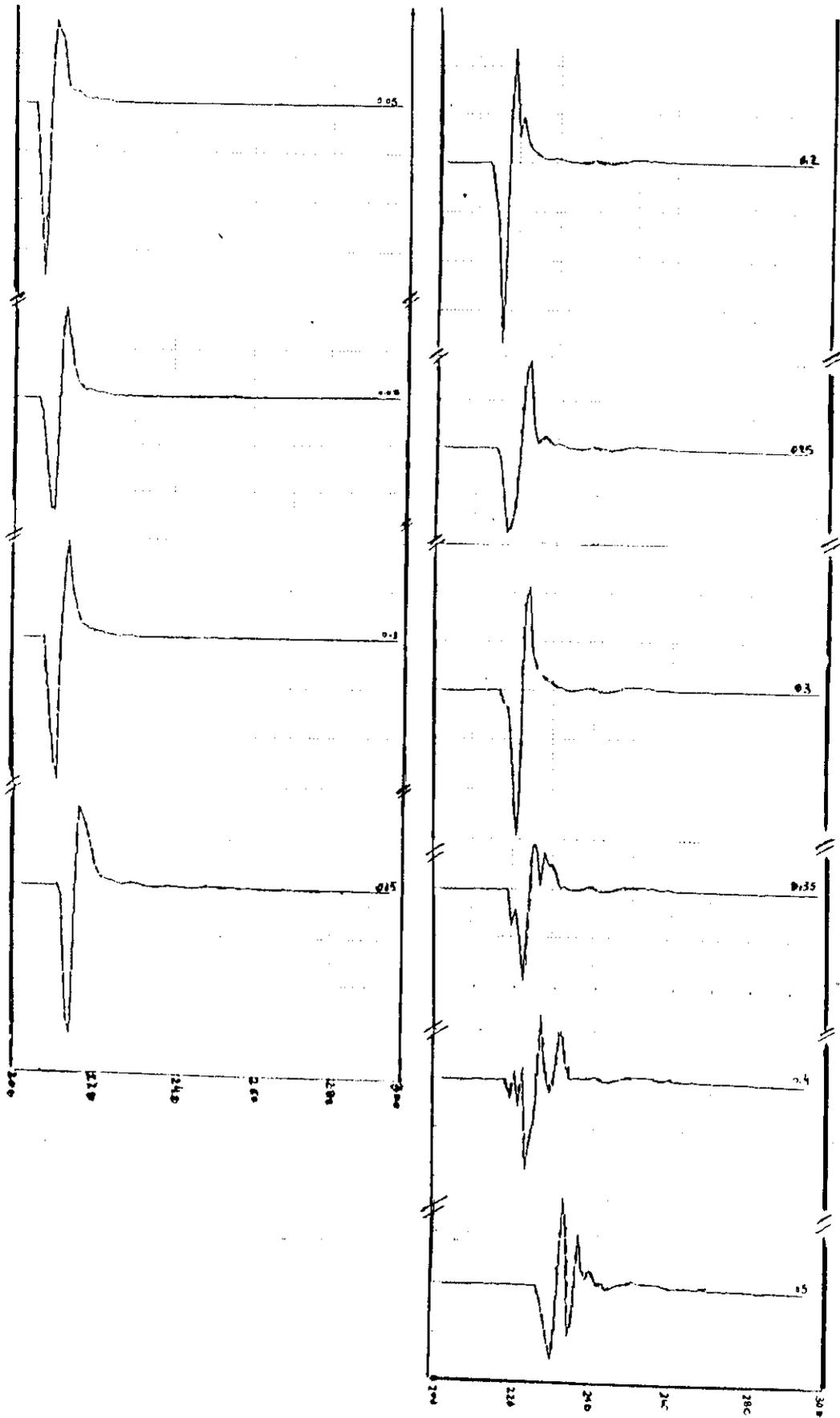
1ª DERIVADA
SERIE C



Gráfica (4-VI)

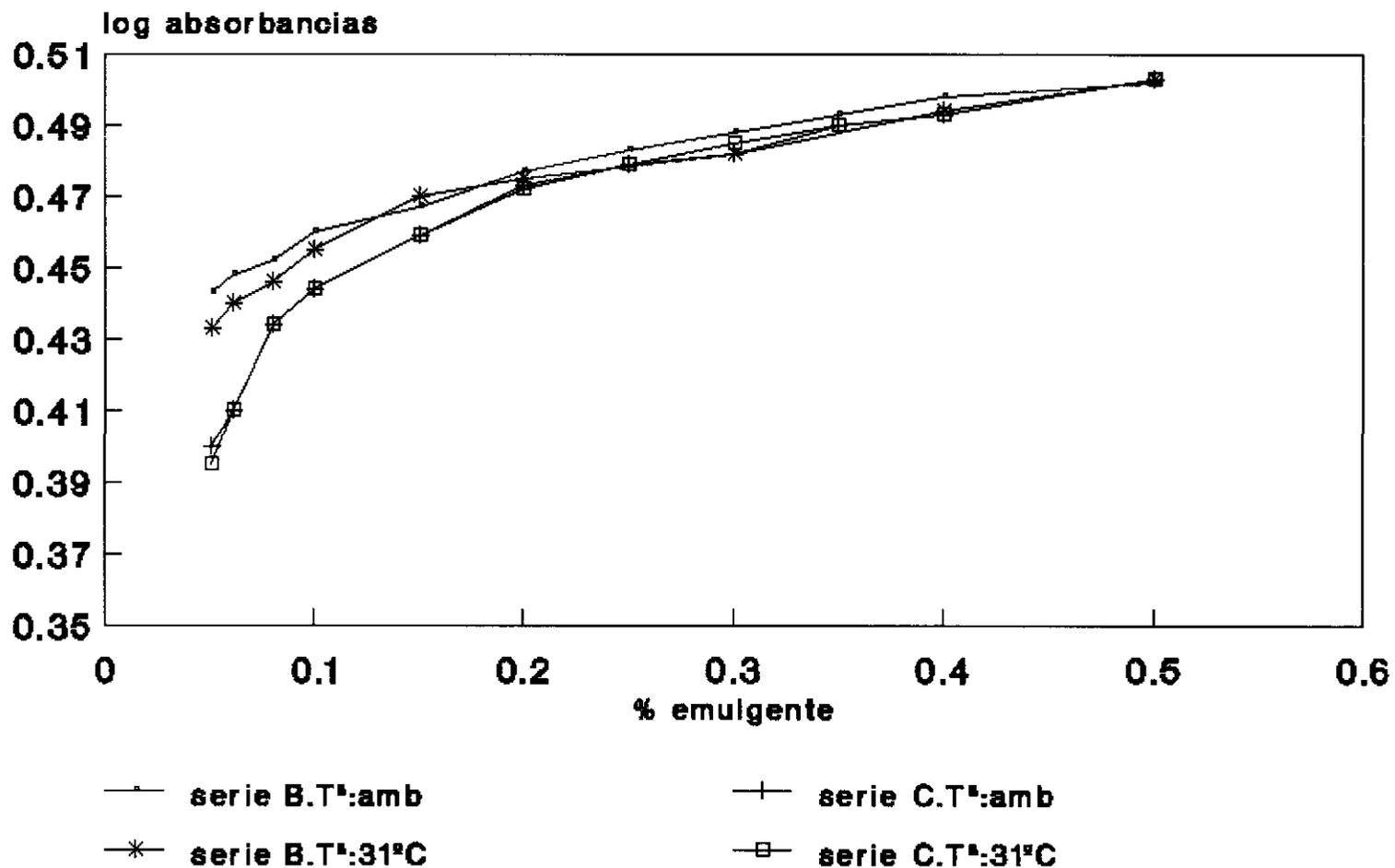
ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

2ª DERIVADA SERIE B



Gráfica (4-VII)

SOLUCION ACUOSA DE EMULGENTE Y MANITOL 6%



244

(gráfica 4-VIII)

8/La dispersión acuosa formada por: carboximetilcelulosa sódica, manitol y emulgente. (Series D,E,F), suponen nuevos cambios en las bandas de absorción. Gráfica (4-I)

El aspecto de las bandas de absorción, así como los espectros de primera y segunda derivada de la serie F, resultan ser totalmente diferentes de los de las otras series.

Según las tablas:(4-7) a (4-13):

-Las longitudes de onda de máxima absorción varían de la forma:

serie D < serie E < serie F

-Las absorbancias difieren en el orden:

serie D > serie E > serie F

9/Los espectros de primera y segunda derivada muestran claras diferencias, no solo al aumentar el porcentaje de emulgente si no también al pasar de una serie a otra (D.E.F). Gráficas (4-IX a 4-XIV)

La segunda derivada muestra en las tres series los primeros cambios destacables a partir de 0,1 % de emulgente.

10/Las gráficas (4-XVI)(4-XVIII), muestran como un aumento de temperatura supone una disminución de absorbancia independiente del porcentaje de emulgente.

Esas mismas gráficas permiten observar un cambio de pendiente en la intersección de las rectas a partir de 0,1 % de emulgente,

mucho mas nítido en la serie F que en D y E.

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
=====
CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
=====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	215	2,948	0,470
0,08	217	2,992	0,476
0,10	218	3,013	0,479
0,15	219	3,033	0,482
0,20	221	3,070	0,487
0,30	224	3,113	0,493
0,40	227	3,170	0,500
0,50	229	3,201	0,505

Blanco :agua T@ ambiente SERIE D
=====

(tabla 4-7)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
 =====
 CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	216	2,920	0,465
0,08	217	2,944	0,469
0,10	219	2,976	0,474
0,15	219	2,989	0,476
0,20	221	3,004	0,478
0,30	222	3,023	0,480
0,40	226	3,092	0,490
0,50	229	3,143	0,497

Blanco: solución acuosa al 6% en manitol

Ta ambiente SERIE E
 =====

(tabla 4-8)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
 =====
 CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	218	1,312	0,118
0,08	219	1,651	0,218
0,10	219	1,838	0,264
0,15	221	2,038	0,310
0,20	222	2,148	0,332
0,30	225	2,514	0,400
0,40	228	2,673	0,427
0,50	230	2,822	0,450

Blanco: dispersión acuosa de manitol 6% y viscosizante 1,3%

Tªambiente SERIE F
 =====

(tabla 4-9)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
 =====
 CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	216	2,912	0,341
0,08	217	2,933	0,467
0,10	218	2,953	0,470
0,20	221	3,009	0,478
0,30	222	3,027	0,481
0,40	225	3,078	0,488
0,50	230	3,140	0,497

Blanco: agua T_a 31°C SERIE D
 =====

(tabla 4-10)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
 =====
 CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====

% Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	217	2,845	0,454
0,08	218	2,864	0,457
0,10	219	2,878	0,459
0,15	220	2,897	0,462
0,20	221	2,920	0,465
0,30	223	2,957	0,471
0,30	222	2,938	0,468
0,40	226	3,013	0,478
0,50	230	3,068	0,487

Blanco: solución acuosa de manitol 6%

Ta 310C SERIE E
 =====

(tabla 4-11)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE-MANITOL (6%) Y
 =====
 CARBOXIMETILCELULOSA SODICA (1,3%)
 =====

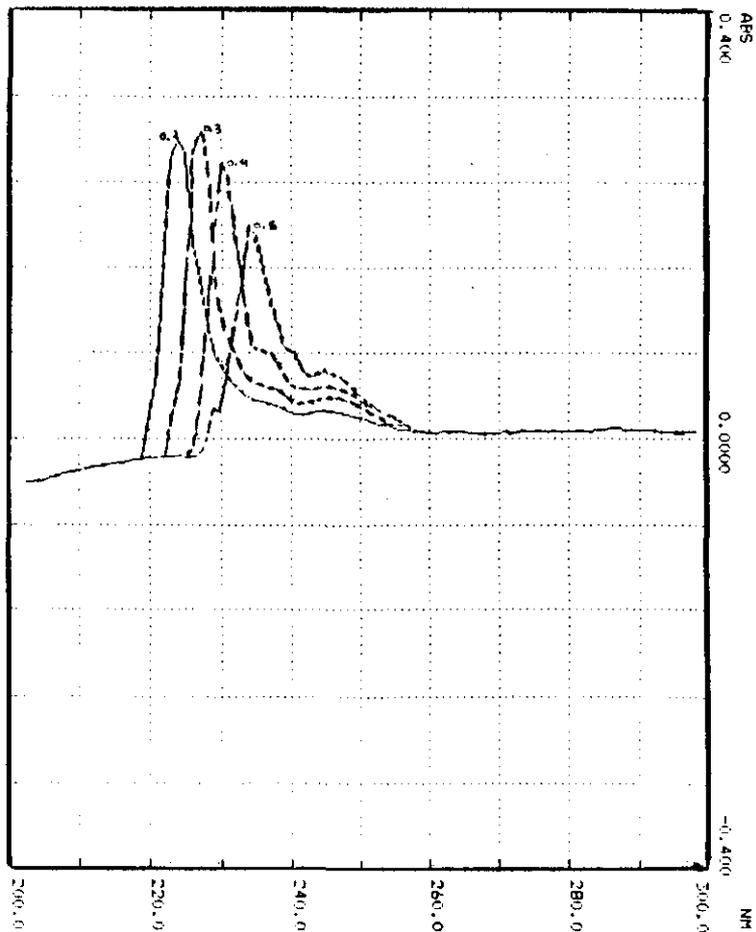
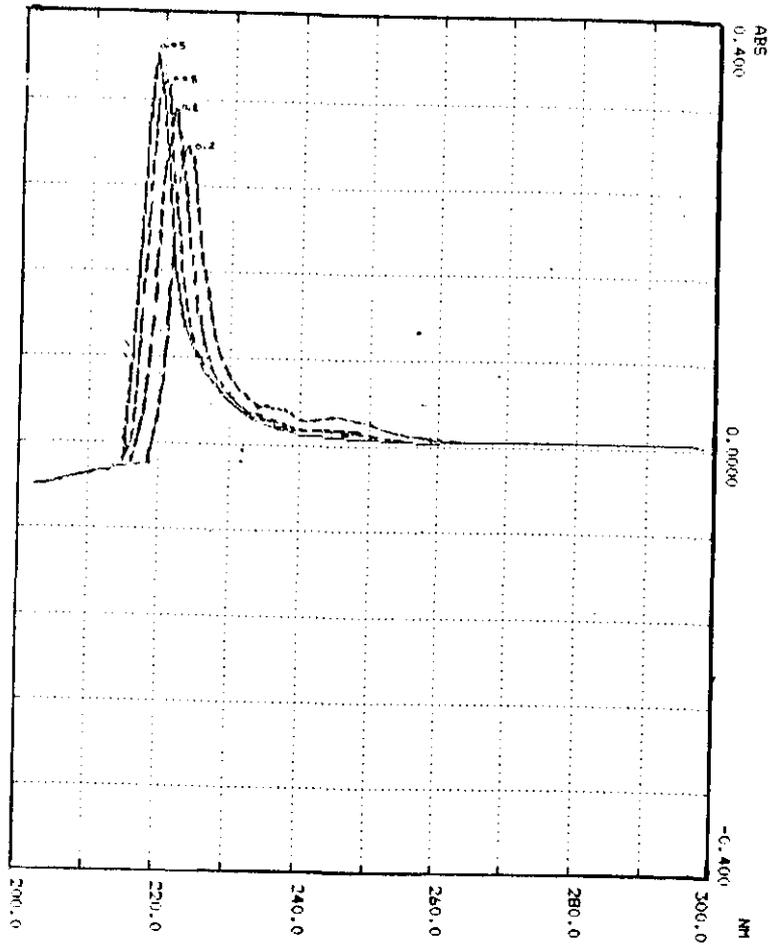
‰ Emulgente	λ	Absorbancia	log absorbancia
0,05	218	1,455	0,163
0,08	218	1,658	0,220
0,10	220	1,887	0,275
0,15	221	2,129	0,328
0,20	222	2,246	0,351
0,30	224	2,427	0,385
0,40	226	2,604	0,415
0,50	229	2,779	0,443

Blanco:dispersión acuosa al 6% de manitol y 1,3% de CMC sódica
 Ta ambiente SERIE F
 =====

(tabla 4-12)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

1ª DERIVADA SERIE D



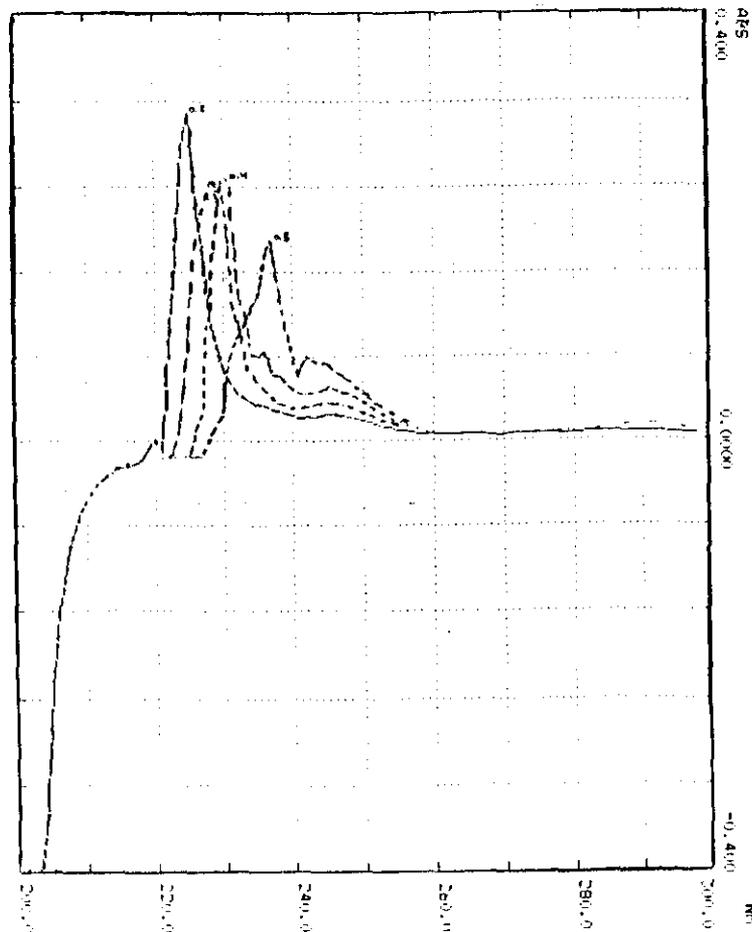
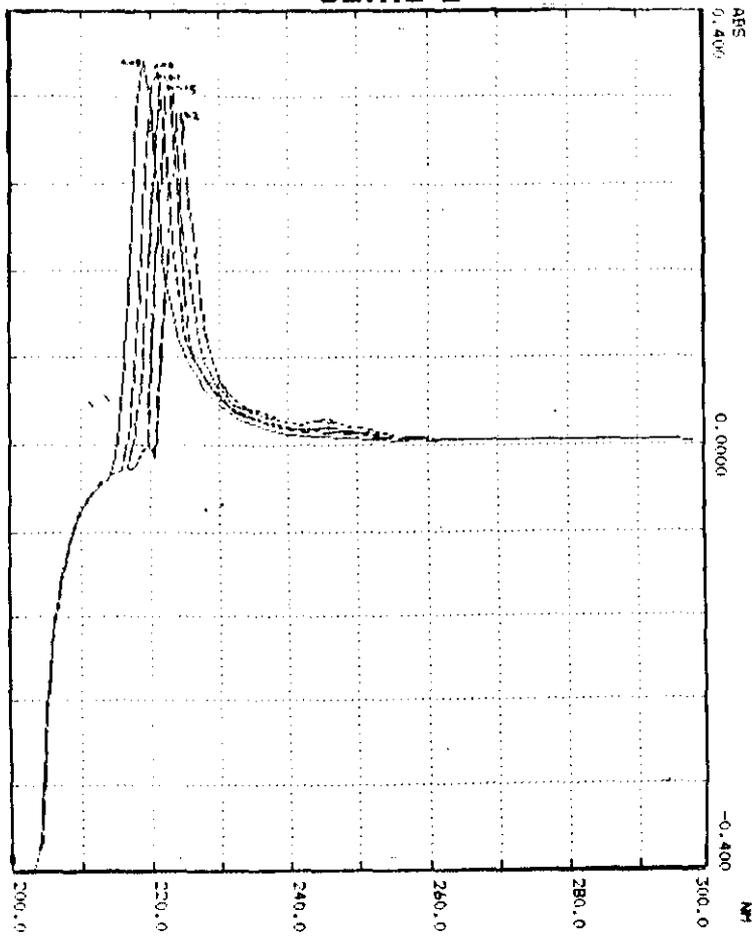
Gráfica (4-IX)

2ª DERIVADA
SERIE D



Grafica (4-X)

1ª DERIVADA SERIE E

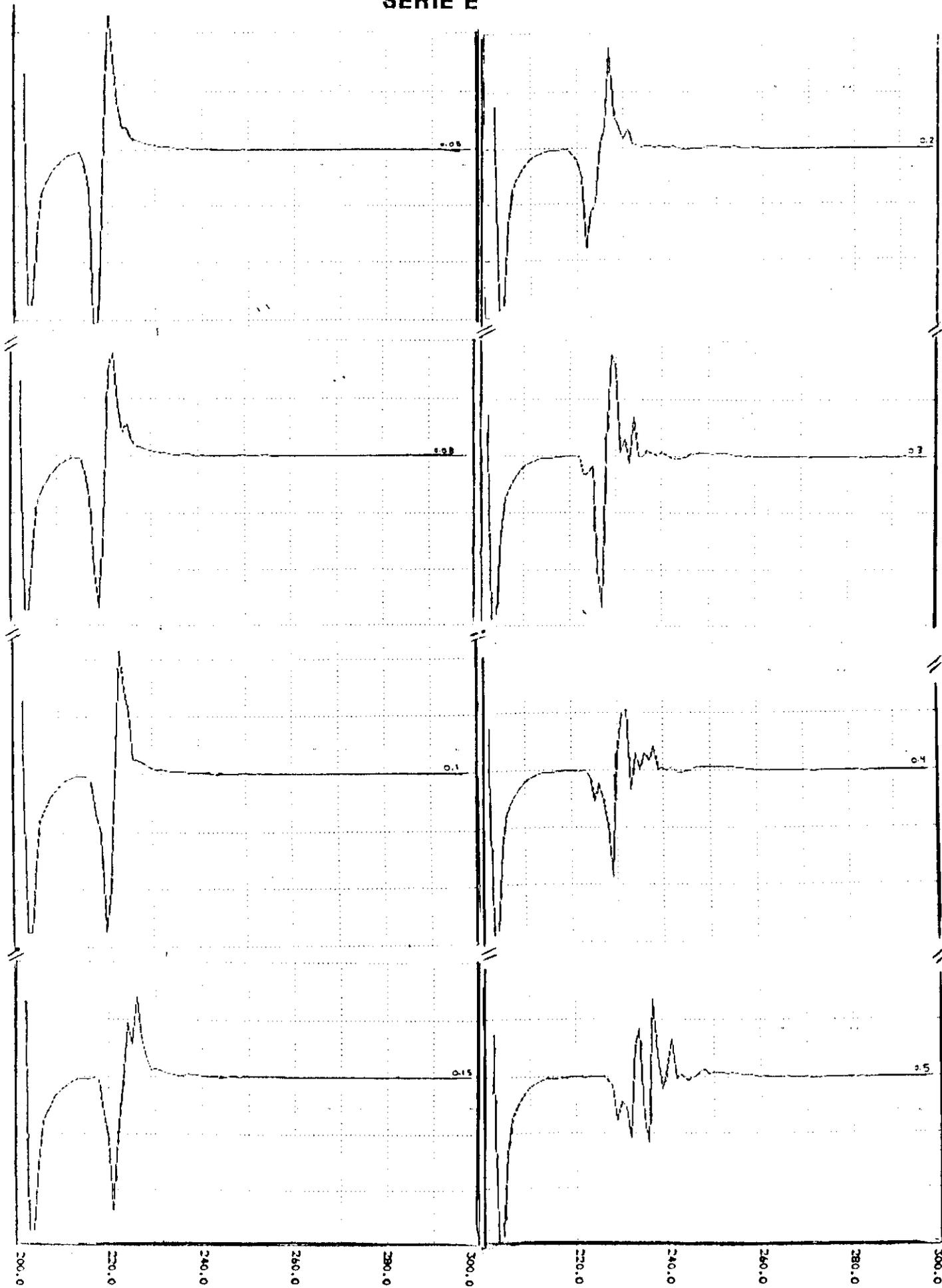


Gráfica (4-XI)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

2ª DERIVADA

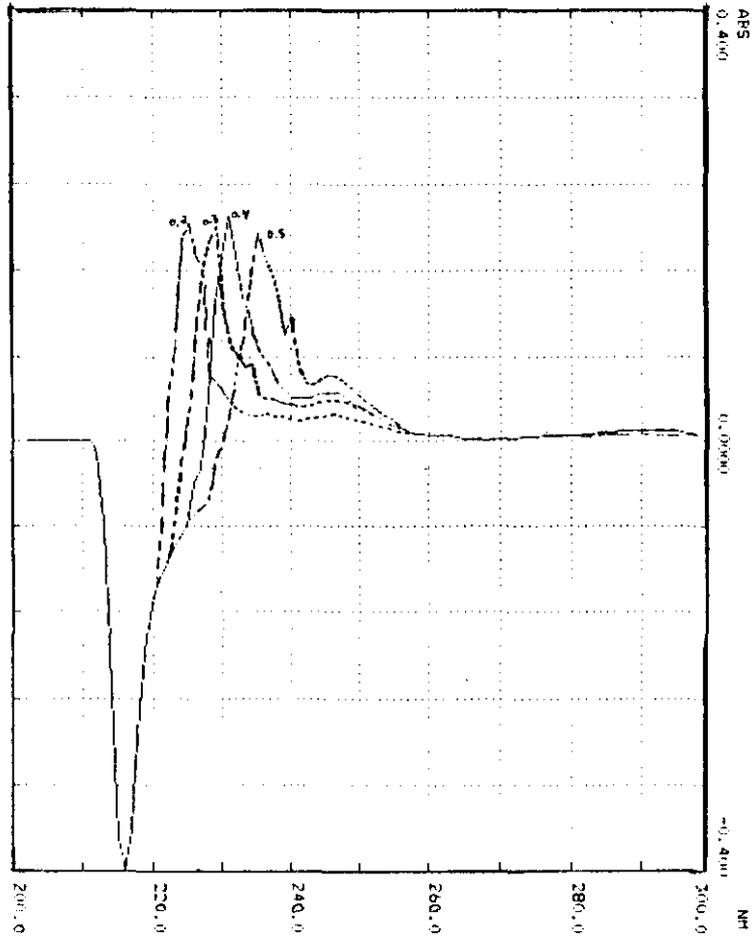
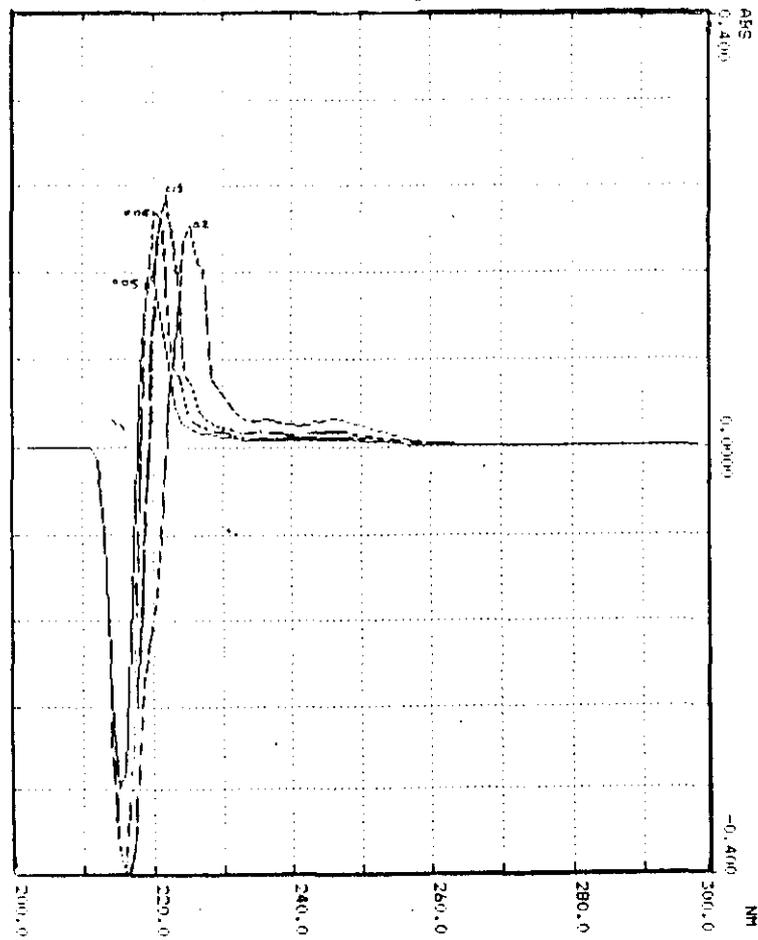
SERIE E



Gráfica (4-XII)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

1ª DERIVADA SERIE F

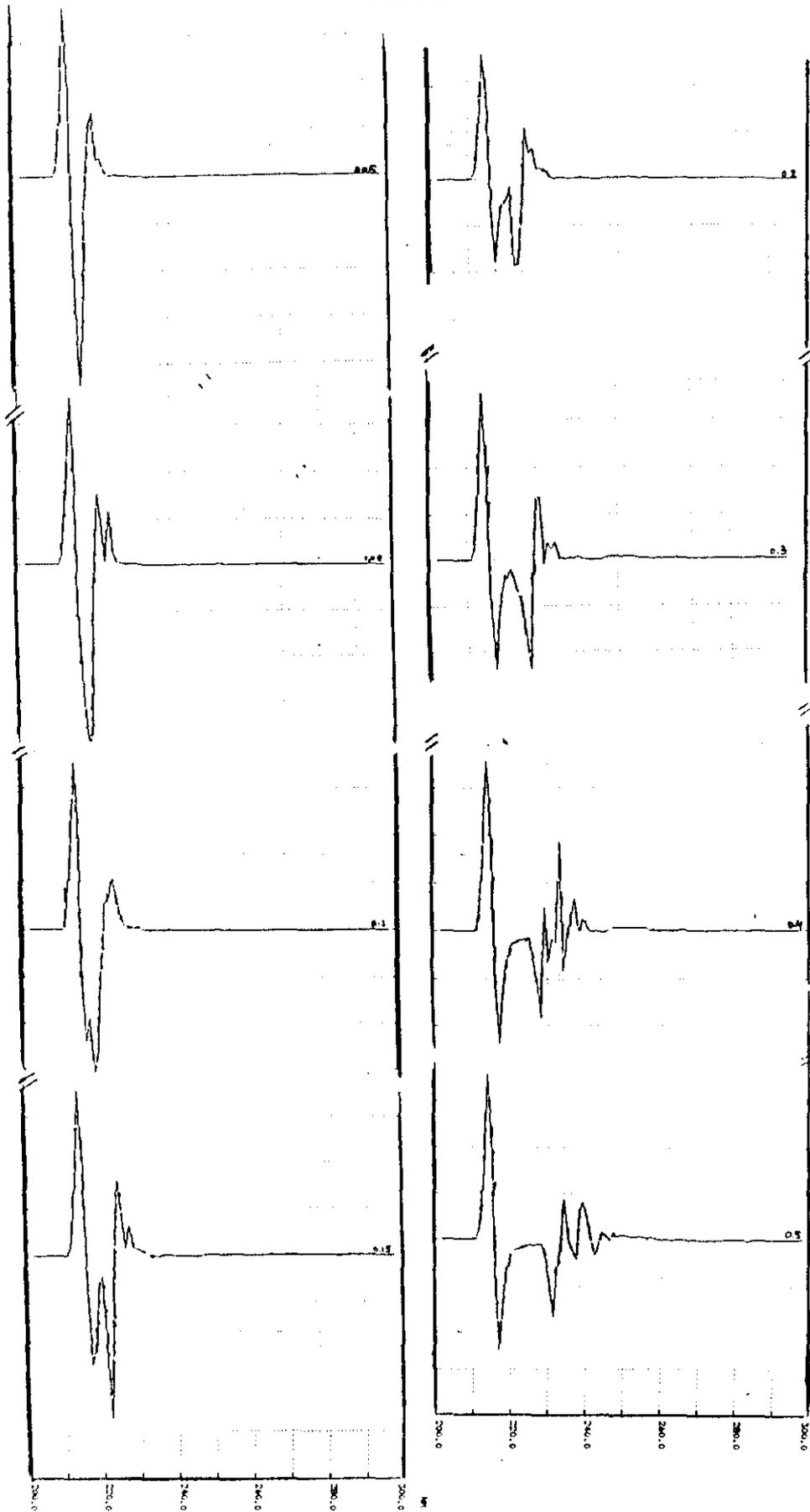


Gráfica (4-XIII)

ESPECTROFOTOMETRO BECKMAN DU-6

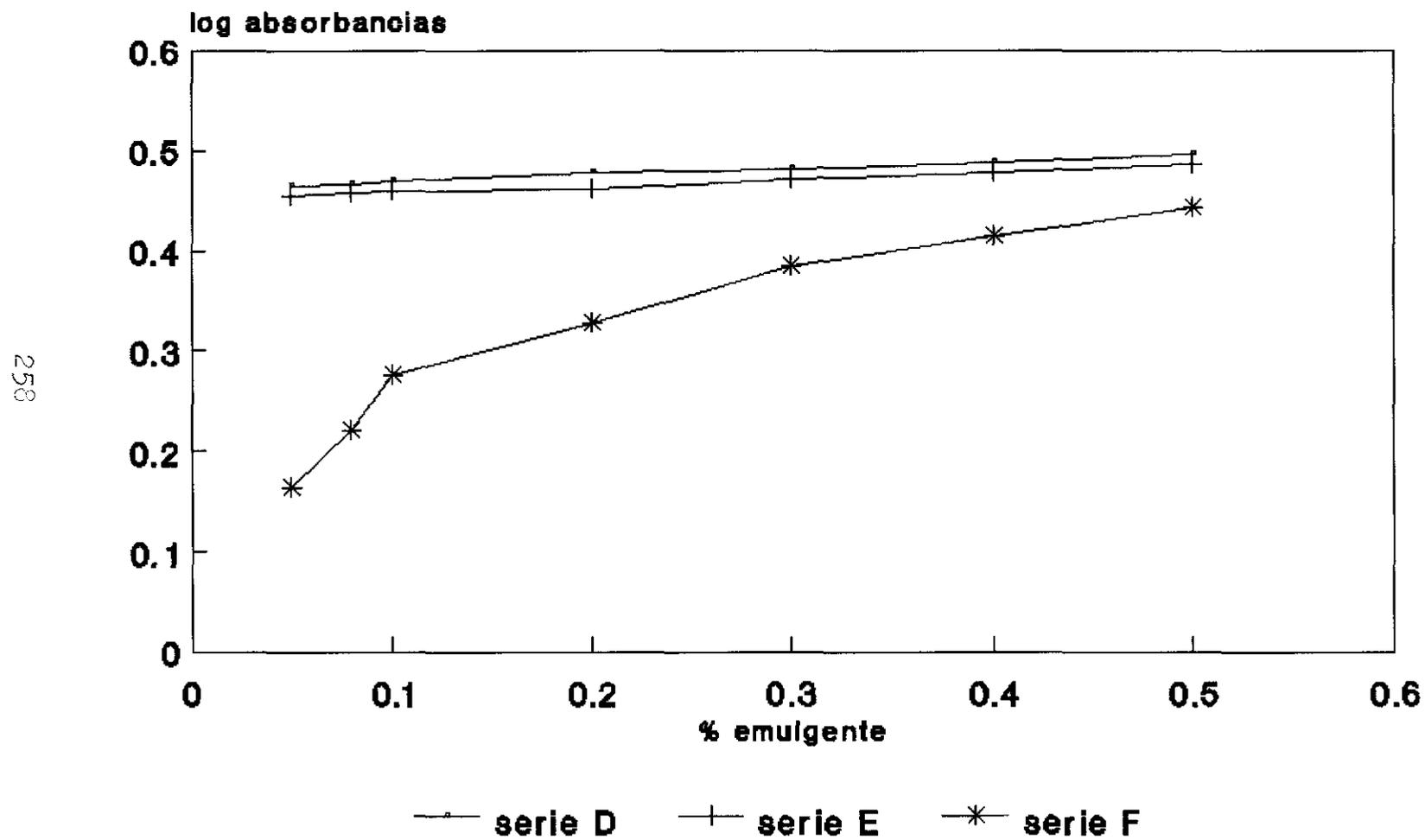
2ª DERIVADA

SERIE F



Gráfica (4-XIV)

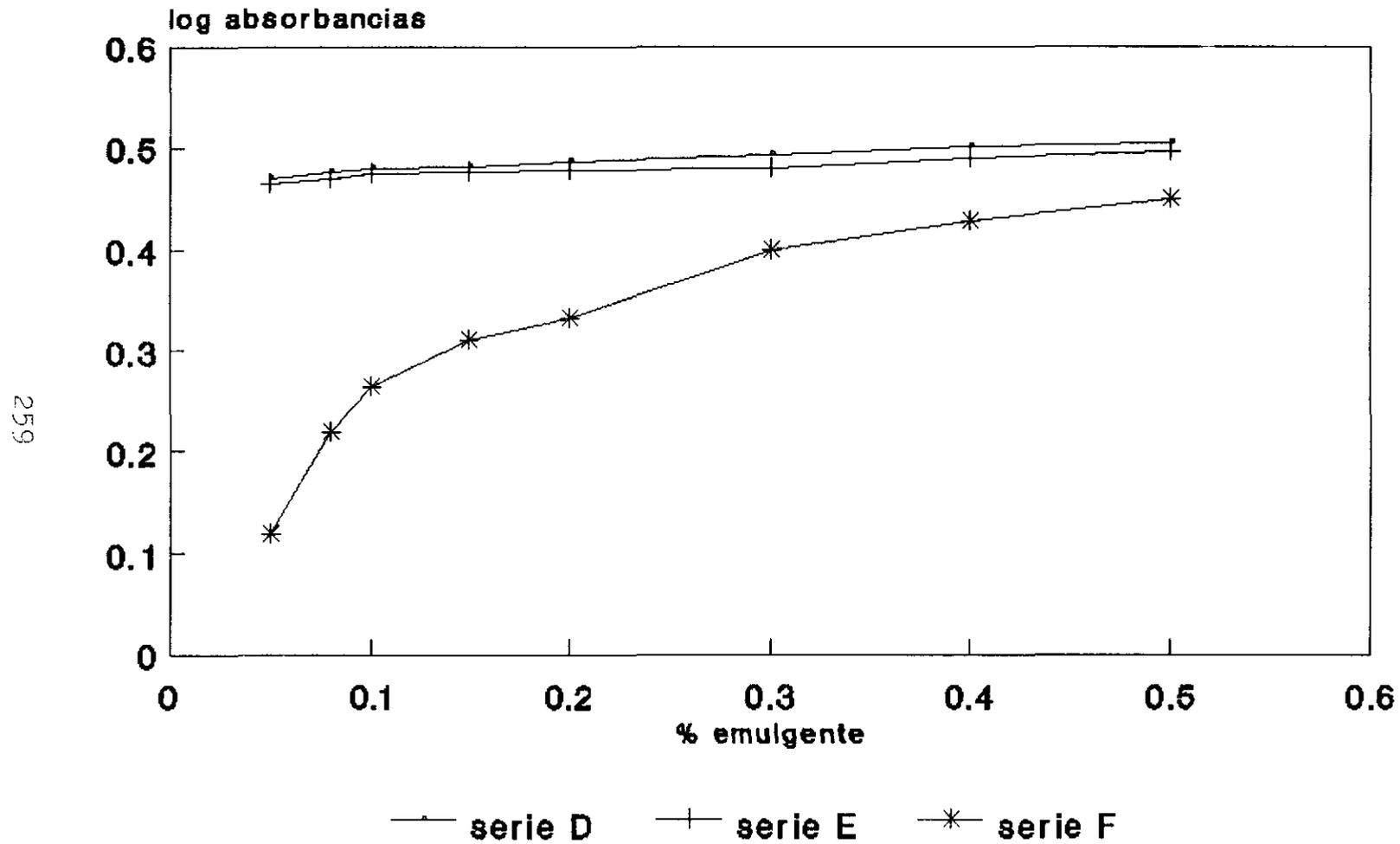
DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE.MANITOL CARBOXIMETILCELULOSA SODICA



T^a:30°C

(gráfica 4-XV)

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE.MANITOL CARBOXIMETILCELULOSA SODICA



Temperatura ambiente

(gráfica 4-XVI)

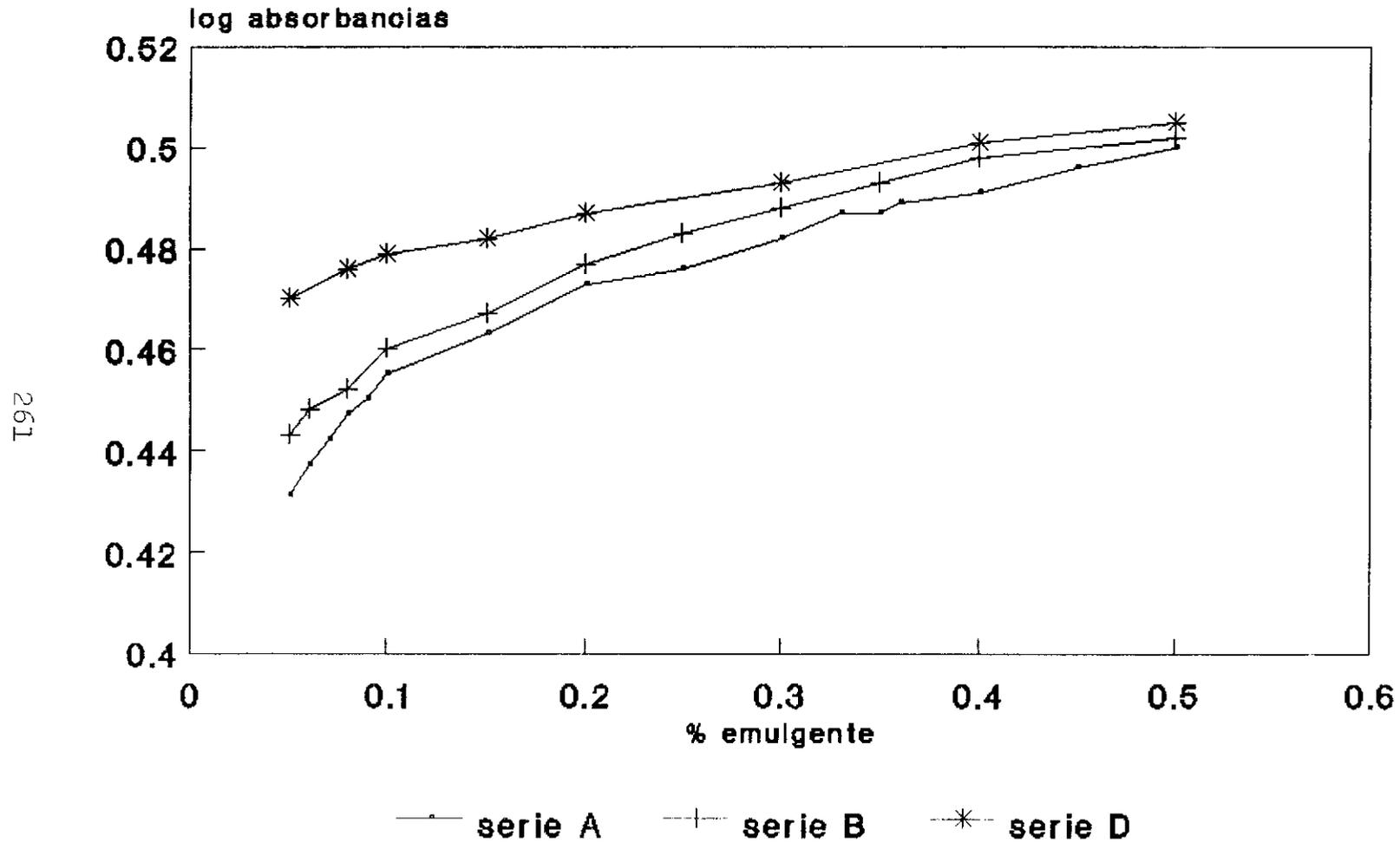
11/Al comparar las series:A , B , D , se observa:

-Las absorbancias varían en el orden:

serie D > serie B > serie A Gráfica(4-XVII)

-Al tratar de superponer los espectros puede apreciarse que a excepción de la zona de máxima absorbancia del espectro , el resto de la banda en las series: A y B puede considerarse incluida dentro de la banda de la serie D

DISPERSION ACUOSA DE EMULGENTE MANITOL 6% Y CMC SODICA 1.3%



T^a:amb .blanco :agua

(gráfica 4-XVII)

12/La tabla (4-13) muestra las absorbancias de una solución acuosa de manitol al 6 % entre 200-220 nm.

El barrido espectral. Gráfica (4-XVIII) entre 200-300 nm , frente a un blanco de agua destilada, demuestra la nó absorbancia a partir de 220 nm.

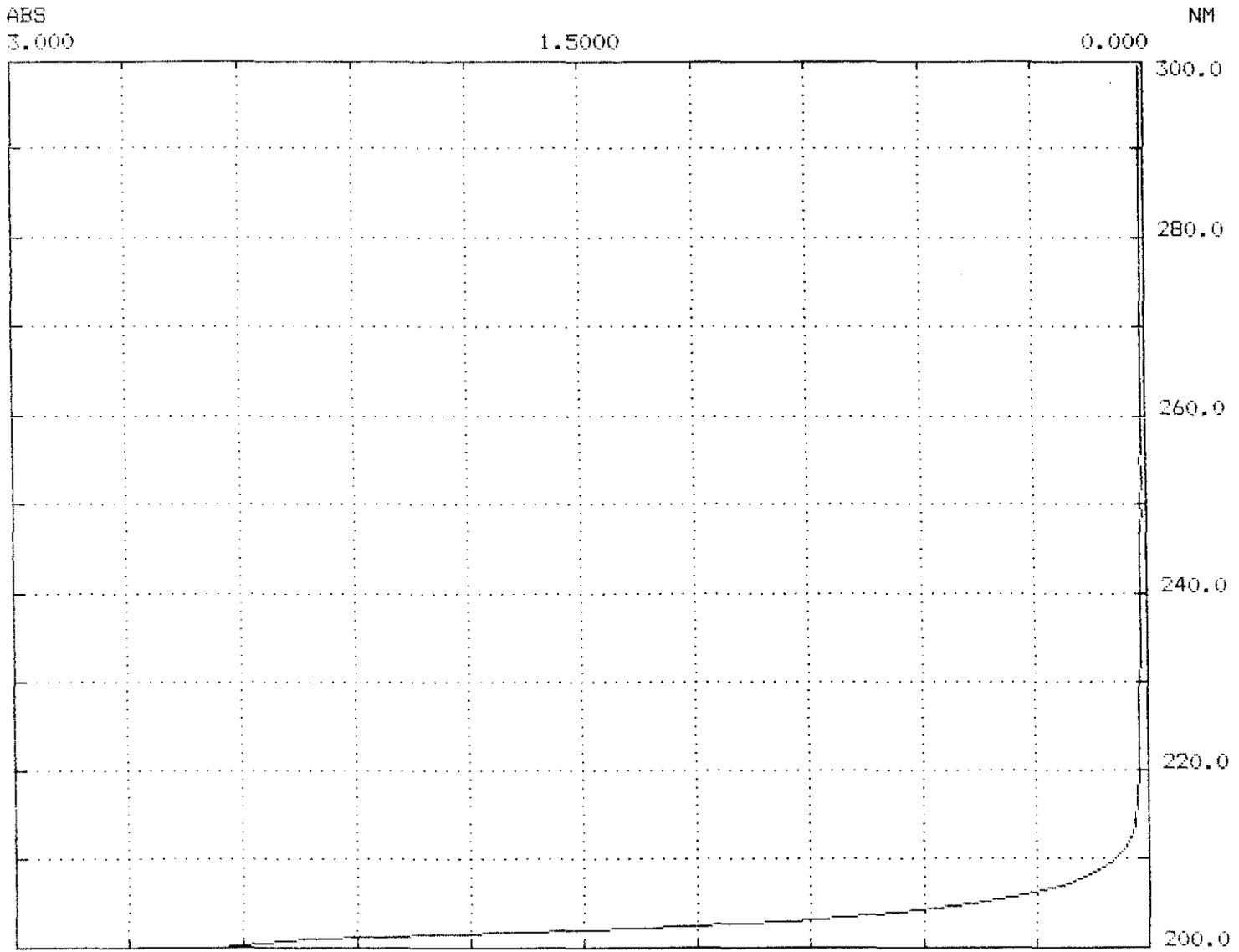
SOLUCION ACUOSA DE MANITOL AL 6%
=====

λ	Absorbancias	Log absorbancias
220	0,005	-2,301
210	0,072	-1,143
209	0,084	-1,075
208	0,131	-0,882
207	0,219	-0,659
206	0,324	-0,489
205	0,453	-0,344
204	0,645	-0,190
203	0,925	-0,034
202	1,574	0,197
201	2,382	0,377
200	2,405	0,381

Blanco:agua T@:ambiente

(tabla 4-13)

ESPECTRO DEL MANITOL EN SOLUCION ACUOSA

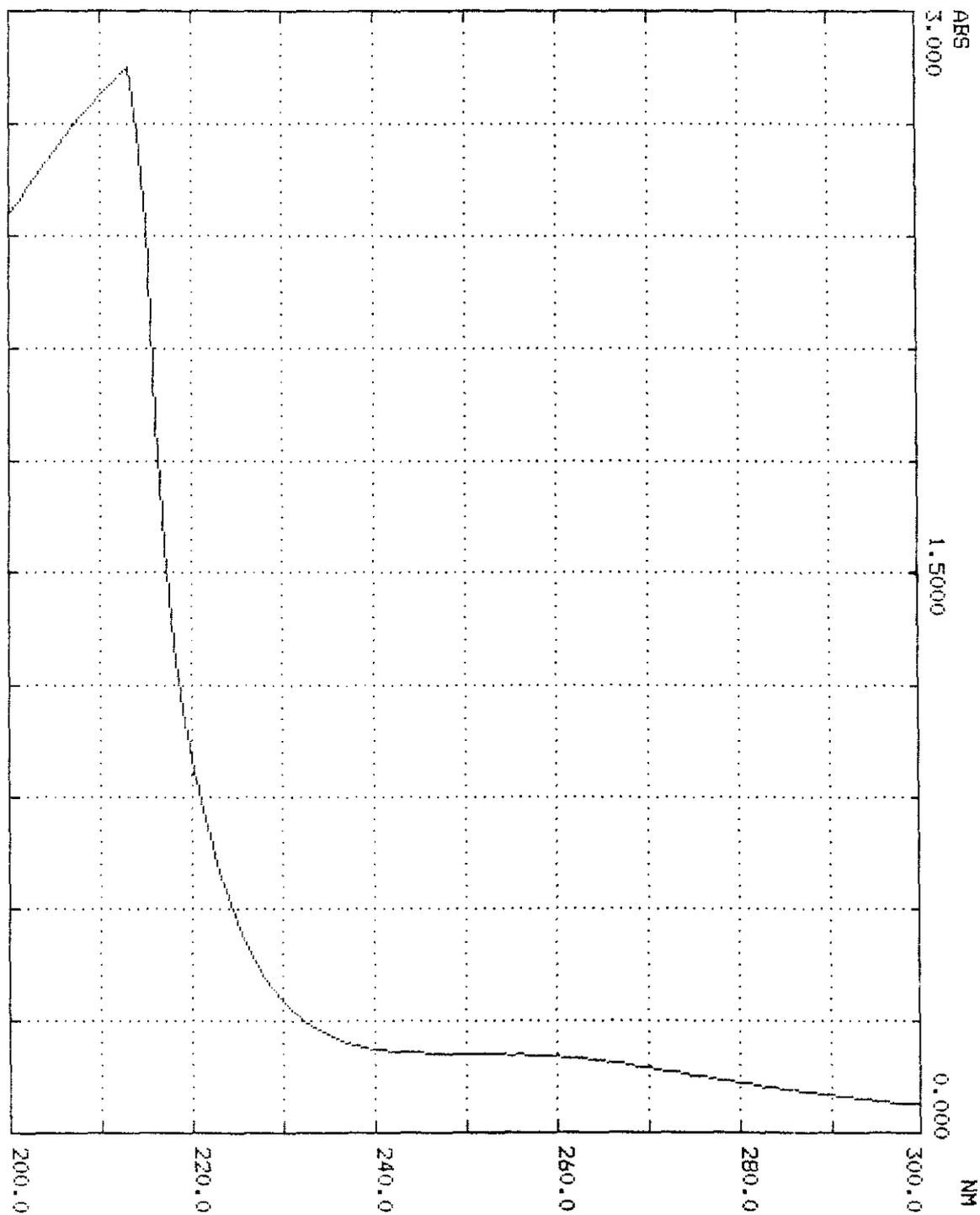


Gráfica (4-XVIII)

13/Las gráficas (4-XIX) (4-XX) muestran las bandas de absorción de la dispersión acuosa de manitol(6%) y carboximetilcelulosa sódica(1,3%) a temperatura ambiente. Los blancos utilizados son respectivamente: agua destilada y solución acuosa de manitol al 6%

Se observa que la zona de absorción coincide con la zona de absorción de micelas objeto de estudio, de lo que se deduce que es la serie F la que aporta información mas correcta, puesto que en ella el blanco utilizado evita errores de absorción por moléculas libres de manitol y viscosizante.

DISPERSION ACUOSA DE MANITOL Y CARBOXIMETILCELULOSA SODICA

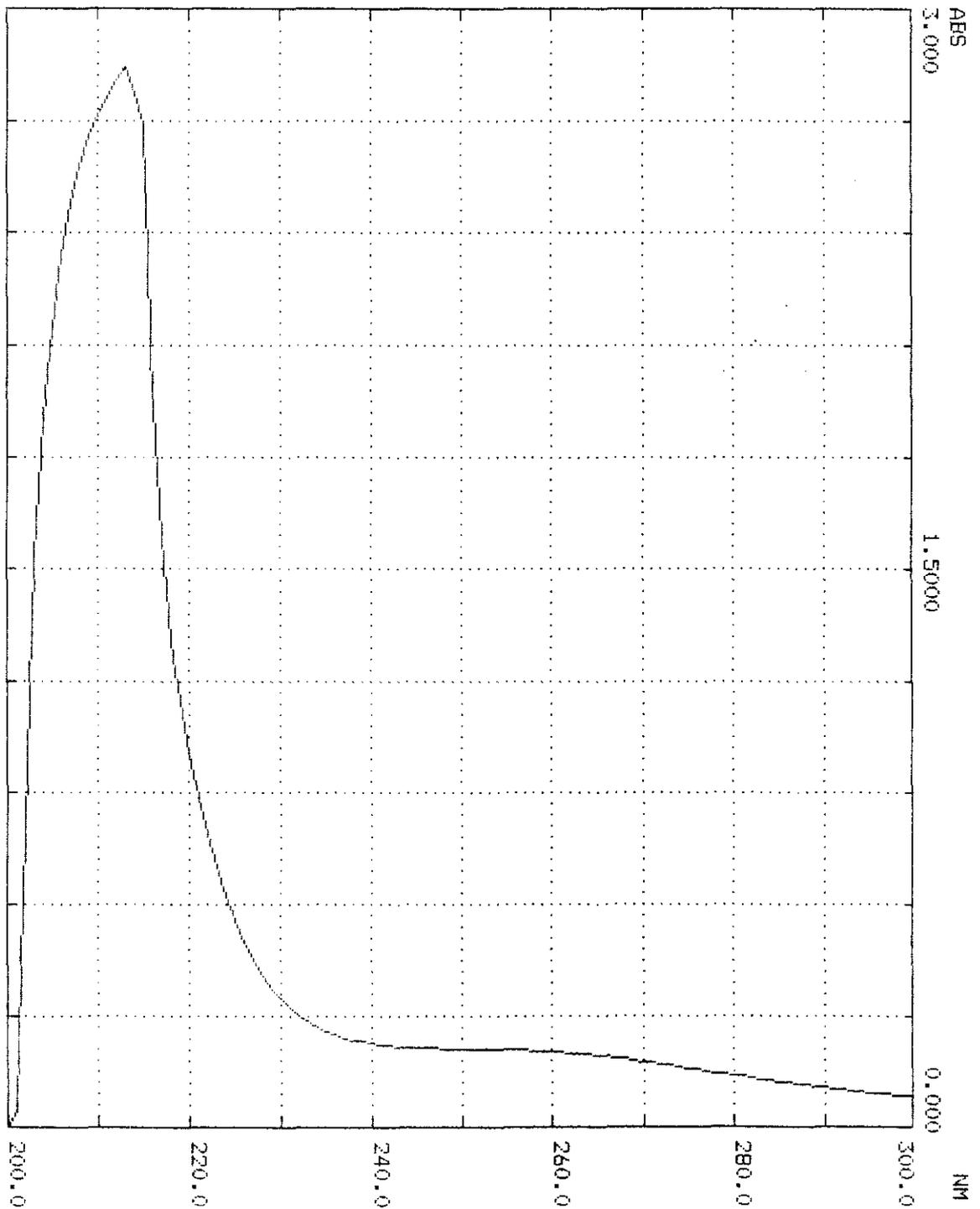


Gráfica (4-XIX)

λ ABS
212.0 2.824

blanco: agua destilada

DISPERSION ACUOSA DE MANITOL Y CARBOXIMETILCELULOSA SODICA



Gráfica (4-XX)

blanco:solución acuosa de manitol

λ ABS
213.0 2.842

4.5. CONCLUSIONES

1/La presencia de micelas y otras asociaciones de moléculas de emulgente, pueden ser detectadas por medidas espectrofotométricas a longitudes de onda superiores a 200 nm .

2/La mínima asociación molecular capaz de detectarse requiere de al menos un 0,04 % de emulgente.

3/Los cambios en las pendientes rectilíneas registradas al representar las absorbancias frente al porcentaje de emulgente , permiten admitir que la concentración crítica micelar se alcanza con un 0,1 % de agente tensioactivo, independientemente de la - composición cualitativa de la fase acuosa.

4/Diferencias espectrales a concentraciones de emulgente superiores a 0,2 % , explican el hecho de que no se forme un único tipo de micela si no la formación de diferentes estructuras químicas , dependientes no solo del porcentaje de emulgente si no también de la presencia o no de manitol y carboximetilcelulosa - sódica.

5/Se considera que el manitol interacciona con las moléculas de emulgente, agregados e incluso con estructuras micelares, pero también existen moléculas de manitol libres. Es por ello por lo que se explica la diferencia entre los espectros de las series B y C. En éstos últimos las moléculas de manitol libre quedan enmascaradas por el blanco y solo se registran las interacciones del -

manitól con otras moléculas y agregados estructurales.

El hecho de que los espectros de la serie C difieran de los de la serie A, justifica las asociaciones :manitól-emulgente.

6/La carboximetilcelulosa sódica también se encuentra libre y asociada a moléculas de emulgente, agregados e incluso a estructuras micelares. Estas asociaciones se detectan en los espectros de la serie F en los que se utiliza como blanco manitól y cmcNa .

7/La presencia de manitól e incluso la presencia de manitól junto a carboximetilcelulosa sódica en solución acuosa de emul - gente, son la causa de modificaciones estructurales en las miche - las formadas.

El aplicar otras técnicas: conductimetría, tensiometría, (en ésta misma memoria), ha permitido relacionar éstos cambios espectrales con diferencias en los valores de conductividad y tensión superficial, según la composición de la fase acuosa.

8/Los espectros de primera y segunda derivada permiten observar que en ausencia de manitól y carboximetilcelulosa sódica, con solo aumentar el porcentaje de emulgente cambia la estructura de la micela y de los distintos agregados que se forman.

Este resultado concuerda con los obtenidos por técnicas de difu - sión de luz, donde se han detectado modificaciones en los coefi - cientes del virial al variar la concentración de emulgente.

CAPITULO 5
ESTUDIO CONDUCTIMETRICO

5. ESTUDIO CONDUCTIMETRICO

5.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

5.2. DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

5.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

5.4. RESULTADOS OBTENIDOS

5.5 CONCLUSIONES

5.1.OBJETIVO DEL ESTUDIO -----

Las medidas conductimétricas llevadas a cabo en la fase acuosa de la emulsión pretenden conocer:

1/El efecto que sobre los resultados obtenidos tiene un aumento en la concentración del emulgente, así como la incorporación de manitol y carboximetilcelulosa sódica.

2/El valor de la concentración crítica micelar.

3/La similitud entre éstos resultados y los obtenidos en otras técnicas.

4/Las medidas de conductividad llevadas a cabo en ambos sistemas: emulsión sin liofilizar y emulsión regenerada tras un proceso de liofilización, pretenden confirmar el signo de la emulsión.

5.2. DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

Se utiliza un conductímetro, modelo METROHM AG-CH-9100 HERISAO

Las determinaciones se realizan a temperatura de 31°C

El electrodo utilizado es de constante $c=0,75 \text{ cm}^{-1}$

5.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Se preparan soluciones acuosas de emulgente: 0,001 % - 0,5 %

En caso de analizar el efecto del manitol, se incorpora en las soluciones de emulgente un 6% de manitol. De forma análoga y con el fin de analizar el efecto conjunto de todos los ingredientes de la fase acuosa, se incorpora carboximetilcelulosa sódica 1,3%. En éste último caso, la dispersión del viscosizante se realiza con un homogeneizador Politrón, modelo PT-3000 , a 11000rpm durante tres minutos.

Con el fin de diferenciar el efecto de cada componente, se mide la conductividad de una solución acuosa de manitol al 6% y de una dispersión de viscosizante 1,3% en agua, con y sin manitol.

En todos los casos se utiliza agua destilada de conductividad 3,6375 microsiemens/cm a temperatura de 31°C.

La medida de conductividad realizada en la emulsión sin liofilizar, se hace directamente una vez finalizada la preparación y el

sistema ha alcanzado la temperatura ambiente (24°C).

Las emulsiones liofilizadas se regeneran con politrón a diferentes revoluciones, a fin de analizar un posible efecto de la agitación en la capacidad de regeneración y con ello, en el valor de su conductividad.

5.4.RESULTADOS OBTENIDOS

1/En todos los casos, independientemente de la composición cuali-cuantitativa de la solución o dispersión acuosa, la conductividad es mayor que la del agua destilada.(tabla 5-1).

MUESTRA PROBLEMA	CONDUCTIVIDAD ($\mu\text{s}/\text{cm}$) $T_a=31^\circ\text{C}$
agua destilada.....	3,63
solución acuosa:manitol 6%	6,22
dispersión acuosa:manitol 6%,CMC Na 1,3%	2250,00
dispersión acuosa :CMC Na 1,3%	2565,00

(tabla 5-1)

2/La carboximetilcelulosa sódica contribuye mucho mas que el manitol en el aumento de la conductividad final.

3/La adición de manitol a la dispersión acuosa de carboximetilcelulosa sódica reduce su conductividad.

Las tablas (5-2), gráficas:(5-I,II), muestran los resultados de conductividad de las distintas soluciones y dispersiones acuosas. En ellas, observamos:

4/La conductividad aumenta al aumentar el porcentaje de emulgente.

5/La adición de manitol a las soluciones acuosas de emulgente, reducen su conductividad.

6/La incorporación de viscosizante a las soluciones de emulgente y manitol, aumenta la conductividad.

7/Al representar la conductividad frente a la concentración de tensoactivo ($\sqrt{g/cc}$), podemos observar un cambio de pendiente en la intersección de las rectas a partir de un 0,1% de emulgente. (gráfica 5-I). A la misma conclusión se llega si la representación se realiza en escala logarítmica, gráfica (5-II).

8/La conductividad de la emulsión regenerada es independiente de las condiciones de regeneración, tabla (5-3) y resulta ser similar a la de la emulsión sin liofilizar.

CONDUCTIVIDAD EN FUNCION DEL PORCENTAJE DE EMULGENTE

EMULGENTE			CONDUCTIVIDAD ($\mu\text{s}/\text{cm}$) T _a 310C		
%	g/cc -3 (10)	$\sqrt{\text{g/cc}}$ -3 (10)	emulgente	emulgente manitol	emulgente manitol cmcNa
			$\mu\text{s} / \log$	$\mu\text{s} / \log$	$\mu\text{s} / \log$
0,001	0,01	3,16	15,52 / 1,19	9,67 / 0,98	2190 / 3,340
0,002	0,02	4,47	-	12,37 / 1,09	-
0,004	0,04	6,32	17,25 / 1,23	18,37 / 1,26	-
0,008	0,08	8,94	31,50 / 1,49	30,75 / 1,48	2190 / 3,340
0,010	0,10	10,00	41,25 / 1,61	35,62 / 1,55	2210 / 3,344
0,030	0,30	17,00	101,25 / 2,00	85,50 / 1,93	2260 / 3,354
0,050	0,50	22,30	165,00 / 2,22	141,00 / 2,15	2360 / 3,372
0,080	0,80	28,20	258,75 / 2,41	216,00 / 2,33	2380 / 3,376
0,100	1,00	31,60	285,00 / 2,45	247,00 / 2,39	2437 / 3,386
0,150	1,50	38,70	-	-	2587 / 3,413
0,200	2,00	44,00	607,50 / 2,78	521,25 / 2,72	2662 / 3,425
0,250	2,50	50,00	-	-	2737 / 3,437
0,300	3,00	54,70	870,00 / 2,93	765,00 / 2,88	2812 / 3,449
0,500	5,00	70,70	1425,00 / 3,15	1215,00 / 3,08	3202 / 3,505

(tabla 5-2)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA: CONDUCTIVIDAD

=====

TIEMPO DE AGITACION (minutos)	rpm	Temperatura (°C)	Conductividad (milisiemens/cm)
6	2600	22-24	2,475
3	6300	22-24	2,475
3	10000	22-24	2,475
3	15000	22-24	2,475
3	25000	22-24	2,475

(tabla 5-3)

EMULSION SIN LIOFILIZAR : CONDUCTIVIDAD

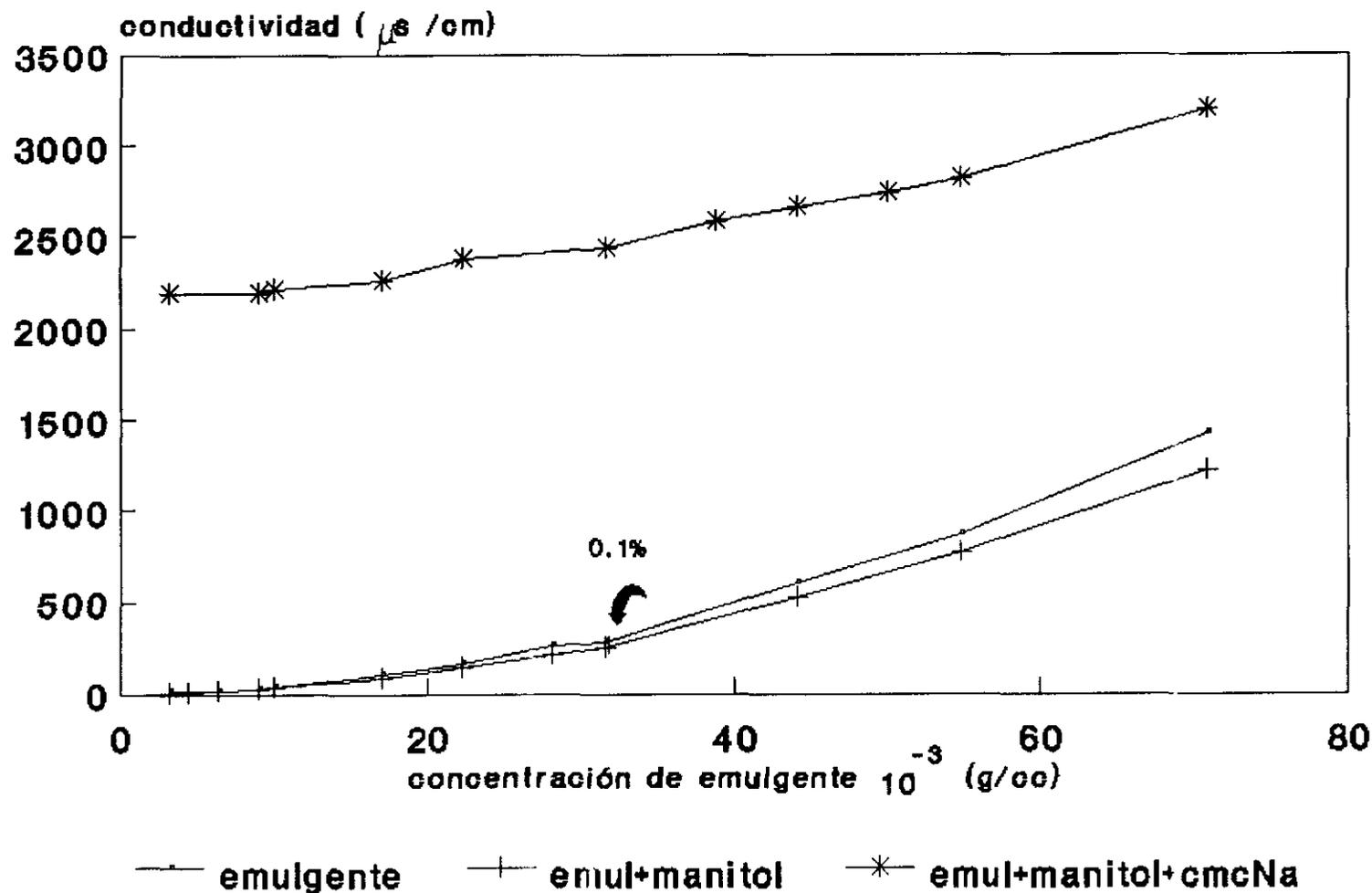
=====

Temperatura: 24°C

Conductividad: 2,505 milisiemens/cm

VARIACION DE LA CONDUCTIVIDAD CON LA CONCENTRACION DE EMULGENTE

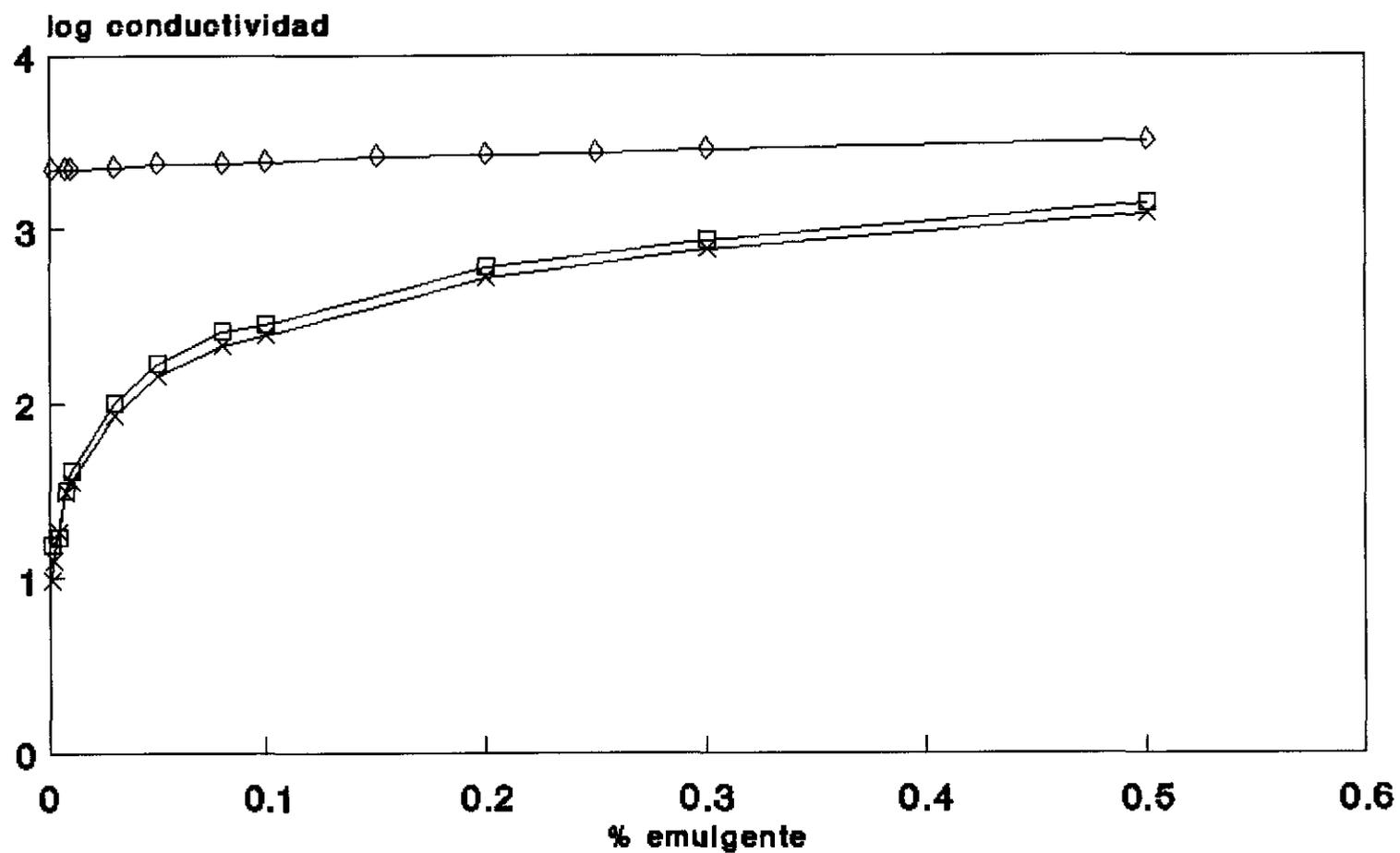
275



temperatura 31°C

(gráfica 5-1)

VARIACION DE CONDUCTIVIDAD



276

—□— emulgente —×— emulg+manitol —◇— emulg+manit+CMC Na

Temperatura 31°C

(gráfica 5-II)

5.5 CONCLUSIONES

1/La capacidad de transmitir la corriente eléctrica por parte de las emulsiones liofilizadas y posteriormente regeneradas , así como de las emulsiones sin liofilizar, permiten asegurar en ambos casos una fase externa acuosa .

2/El hecho de que las condiciones de regeneración de la emulsión liofilizada: (velocidad y tiempo de agitación), no influyan en los valores de conductividad obtenidos, permite deducir que - los posibles cambios granulométricos resultantes de las condiciones de agitación ensayadas, nó suponen modificaciones en el valor de conductividad .

3/La conductividad de la emulsión sin liofilizar coincide con la de la emulsión liofilizada y posteriormente regenerada, de aquí se deduce la nó influencia del proceso de liofilización en la conductividad final.

4/La concentración crítica micelar se fija en 0,1 % de emulgente, lo que explica la correlación entre los resultados aquí obtenidos y los que se deducen al aplicar otras técnicas en ésta misma memoria.

5/Las modificaciones en los valores de conductividad por la adición de manitol y carboximetilcelulosa sódica a las soluciones acuosas de emulgente, se atribuyen no solo a la presencia de éstos componentes en el agua, si no también a posibles interacciones

con moléculas de emulgente y estructuras micelares.

Modificaciones estructurales en presencia de manitol y carboximetilcelulosa sódica detectadas por técnicas espectrofotométricas , son causa de variaciones en la conductividad resultante.

CAPITULO 6
ESTUDIO DE DIFUSION DE LUZ Y
REFRACTOMETRIA

6. ESTUDIO DE DIFUSION DE LUZ Y REFRACTOMETRIA

6.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

6.2. DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

6.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

6.4. RESULTADOS OBTENIDOS

6.5. CONCLUSIONES

6.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

Con los estudios de difusión de luz llevados a cabo en disoluciones acuosas con diferente porcentaje de emulgente se pretende conocer:

1/La influencia de la concentración de emulgente en la intensidad de luz dispersada.

2/El valor de la concentración crítica micelar.

3/El peso molecular de la estructura química resultante

4/El valor del segundo coeficiente del virial, como índice de las interacciones existentes.

5/La correlación entre los resultados obtenidos en ésta y otras técnicas de medida.

6.2.DISPOSITIVO Y TECNICA DE MEDIDA

Para medir la intensidad de luz difundida por las muestras problema se utiliza un fotogoniodifusómetro modelo Sofica 42000. Previo a la lectura, se lleva a cabo la calibración del aparato con benceno. La intensidad de luz difundida por el benceno en un ángulo de 90° es de 39.

La no disimetría del benceno se comprueba al medir la intensidad a 135° y 45°. En ambos ángulos es igual a 53.

Se dispone de un patrón de vidrio cuya intensidad de luz difundida a 90° es de 52.

La disolución a medir va colocada en una célula cilíndrica de vidrio, que se sitúa dentro de una cubeta llena de benceno cuyo índice de refracción es igual al del vidrio.

La célula se aloja en una plataforma giratoria donde puede leerse directamente el ángulo de incidencia de la radiación. La luz difundida converge en un fotomultiplicador que mide la intensidad del orden de 10^{-6} la intensidad de luz incidente, es por ello por lo que se determina $\Delta R(0)$, conocida como Relación de Rayleigh.

En caso de partículas inferiores a $\lambda/20$, la teoría de Rayleigh se ajusta a la siguiente expresión:

$$\frac{K^*(c-cmc)}{\Delta R\theta} = \frac{1}{M^*} + 2 B (c-cmc)$$

donde : M^* = la masa molecular media en peso

c-cmc = diferencia entre la concentración de emulgente y la concentración crítica micelar

B=segundo coeficiente del virial

ΔR_{θ} =incremento de la relación de Rayleigh en la solución

$$K^* = \frac{4 \pi^2 n b^2}{N \lambda^4} (\delta n / \delta c)^2$$

nb=índice de refracción del benceno a la longitud de onda de estudio :1,5066

λ =longitud de onda en el vacío: 5461 Å

π =3,142

N =número de Avogadro : 6,023 10²³

($\delta n / \delta c$)=variación del índice de refracción con la concentración :0,22

El incremento de la relación de Rayleigh viene definido por la siguiente expresión:

$$\Delta R_{\theta} = R \frac{n^2}{b} \frac{(I - I_{cmc})}{I} \quad (1)$$

n =índice de refracción del agua:1,332

R =relación de Rayleigh para el benceno:16,3 10⁻⁶ 10⁻¹ (cm)
b

I(90°)_b=intensidad de luz difundida por el benceno:39

(I-I_{cmc})=diferencia entre las intensidades de luz difundida para una concentración concreta de emulgente y la concentra-

ción crítica micelar.

Al reagrupar términos

$$\frac{K'(c-cmc)}{(I-Icmc)} \quad \frac{I(90^\circ)}{b} \quad \frac{nb^2}{n^2} (\delta n/\delta c)^2 = 1/M^* + 2B(c-cmc)$$

$$\text{de donde } K' = \frac{4 \pi^2 nb^2}{N \lambda^4 \frac{R(90^\circ)}{b}} = 1,044$$

$[(c-cmc)/(I-Icmc)]_0$ = el valor de la ordenada en el origen al extrapolar a dilución infinita , tras representar $(c-cmc)/(I-Icmc)$ frente a $(c-cmc)$

La expresión matemática que permite calcular el peso molecular es la siguiente:

$$1/M^* = 1.044 [(c-cmc)/(I-Icmc)]_0 \quad \frac{I(90^\circ)}{b} \quad \frac{nb^2}{n^2} (\delta n/\delta c)^2$$

En caso de soluciones macromoleculares en las que no existe dependencia lineal, las fluctuaciones de concentración son función de un coeficiente de extinción "la turbidez" (τ), que en caso de luz polarizada vertical viene expresado en cm^{-1} por la siguiente

expresión :

$$\tau = \frac{8 \pi R(90^\circ)}{3}$$

$$R(90^\circ) = \frac{ns^2}{nb^2} (I - I_{cmc}) \frac{R}{I} \frac{b}{b}$$

donde: n_s = índice de refracción de la solución , que se obtiene por la siguiente expresión:

$$n_s = n_0 + (c - c_{mc}) (\delta n / \delta c)^2$$

Conocido n_s , se calcula $R(90^\circ)$ y a partir de éste dato , se conoce el valor de τ .

La relación con la masa molecular es la siguiente

$$\frac{H(c - c_{mc})}{\tau} = \frac{1}{M^*} + 2 B(c - c_{mc})$$

$$H = \text{constante} = \frac{32 \pi nb^2}{3 \lambda^4 N} (\delta n / \delta c)^2$$

La representación gráfica de $[H(c - c_{mc}) / \tau]$ frente a $(c - c_{mc})$, permite conocer el peso molecular del agregado y el segundo coeficiente del virial.

La medida del índice de refracción se lleva a cabo en un interferómetro, modelo C. Zeiss. (esquema del aparato)

Mediante una lente se focaliza un haz de luz blanca sobre un espejo y se refleja hacia un prisma de reflexión total, desde allí alcanza una rendija colimadora y una segunda lente .

Los rayos paralelos atraviesan dos compartimentos donde están : la muestra problema y el medio de disolución, hasta alcanzar un último espejo en el que los rayos retroceden y recorren el mismo camino.

Existe otro par de haces de luz que en vez de pasar por las vasijas, lo hacen por debajo. La finalidad no es otra que la de actuar como sistema de referencia al no atravesar el compartimento de muestra.

En el ocular se observan dos series de franjas de interferencias separadas por una línea oscura. En cada serie hay una banda brillante totalmente blanca y las bandas adyacentes adquieren tonalidades azules y rojas en los bordes. La referencia es la banda acromática.

Un tambor graduado permite hacer coincidir las bandas blancas de cada serie y medir el desplazamiento.

El número de divisiones de la escala, es una medida de la diferencia del índice de refracción del problema y del solvente. n

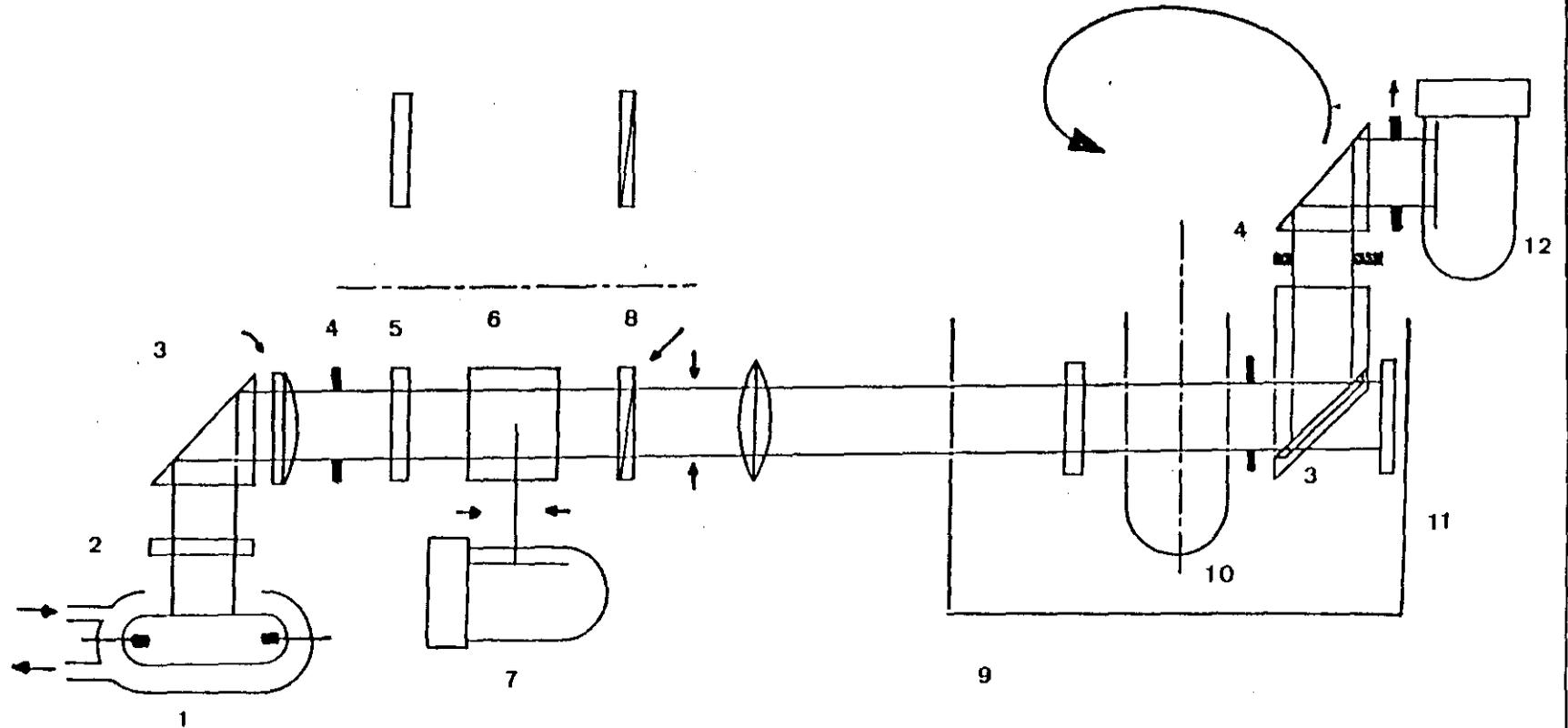
$$\Delta n = \frac{N \lambda}{L}$$

donde:

N= número de franjas de interferencia a la longitud de onda dada (5460 Å). Cada vuelta corresponde a siete franjas.

L= espesor de la célula de medida. Este espesor es el doble del real, debido a que los rayos procedentes de la fuente de luz atraviesan las células que contienen la solución y el solvente, se reflejan en un espejo y vuelven a atravesar de nuevo la célula .L = 2*3,8 cm=7,6 cm

FOTOGONIODIFUSOMETRO

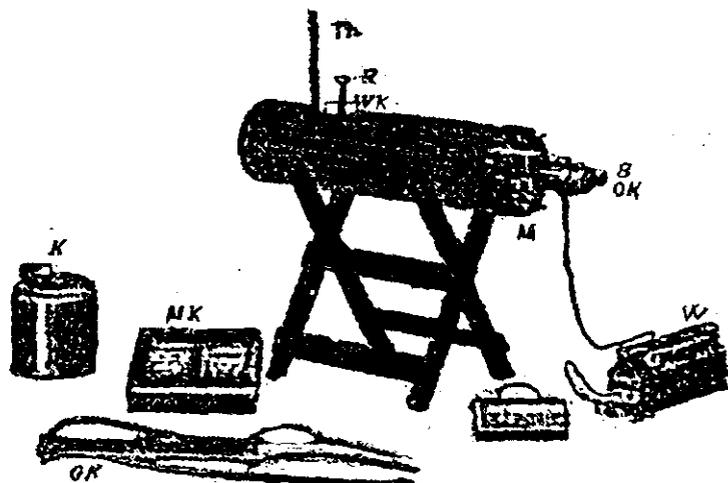


1. Lámpara de vapor de mercurio
 2. Vidrio anticalórico
 3. Prismas de reflexión total
 4. Diafragmas
 5. Filtros ópticos
 6. Vidrio difusor

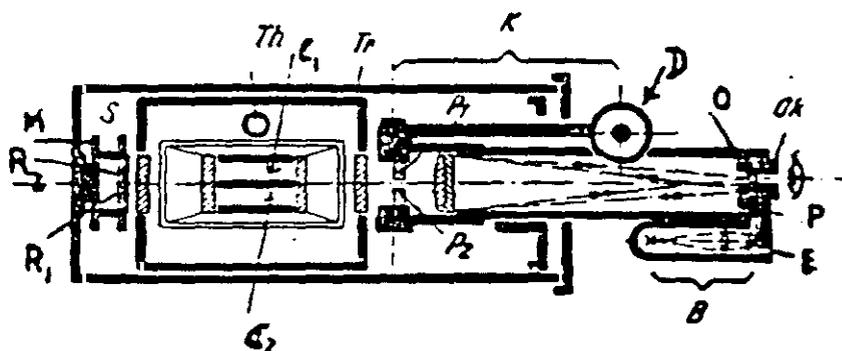
7. Fotomultiplicador
 8. Polarizador
 9. Cuba
 10. Célula de medida
 11. Trampa para luz
 12. Fotomultiplicador de medidas

INTERFEROMETRO -LOWE

C.ZEISS. JENA.



TH:termómetro ; R:agitador ; MK:cubetas para líquidos ;
 OK:ocular ; WK:baño de agua ; GK:cubeta para gases ; K:tapa
 del sistema de observación ; W: resistencia de la lámpara ; M:
 tambor de medida ; B:sistema de iluminación ; V:tapa del baño



(corte horizontal)

B:sistema de iluminación ; M:espejo ; OK:ocular ; E:prisma de
 reflexión total ; C2 , C3 :cubetas para líquidos ; D:tam-
 bor graduado de compensación ; P1 , P2:placas de vidrio plano
 paralelas

6.3.CONDICIONES EXPERIMENTALES

Una lámpara de mercurio suministra una radiación electromagnética de longitud de onda de 546,1 nm, e incide bajo un ángulo de 90° sobre la muestra problema.

El fotogoniodifusómetro se calibra con benceno y se comprueba el ajuste con el patrón de vidrio.

Los estudios de dispersión de luz se llevan a cabo en soluciones acuosas de (0,004 % - 0,5 %) de emulgente . El agua destilada utilizada como solvente, así como las muestras problema se filtran a través de un filtro de 0,2 micrometros.

Se mide la intensidad de luz que difunde el agua utilizada como solvente, éste valor se restará a los obtenidos con las muestras problema a fin de evitar posibles errores debidos a la difusión de partículas dispersas en el agua.

La variación del índice de refracción se estudia en soluciones acuosas de emulgente :(0,02 % - 0,03 % - 0,04 % - 0,05 % - 0,08 % - 0,1 % - 0,15 % - 0,2 %) , a temperatura ambiente.

Se calibra el interferómetro al aire

A través de un filtro de 0,2 micrómetros, las muestras se filtran directamente en las cubetas de 3,8cm de largo.

6.4 RESULTADOS OBTENIDOS

1/ La intensidad de luz difundida depende del porcentaje de emulgente analizado: (tabla 6-1).(gráfica 6-I)

2/Al aumentar el porcentaje de emulgente desde 0,01 % hasta 0,35 % , se detecta un aumento en la intensidad de luz difundida, pero a partir de 0,4 % , la intensidad disminuye .

3/El índice de refracción depende de la concentración de emulgente (tabla 6-2) , (gráfica 6-II)

4/Las medidas del índice de refracción permiten conocer el - valor de la concentración crítica micelar y fijarla en 0,1 % de emulgente, correspondiente a la coordenada(x) del punto de intersección (x,y) de dos rectas de pendientes diferentes. (gráfica 6-II)

5/La intersección de dos rectas: $Y=3350X-47$; $Y=450X+257,5$. obtenidas con los datos de la tabla (6-1) , correspondientes a tramos ascendentes de la gráfica (6-I) , permiten fijar la concentración crítica micelar en 0,1 % de emulgente.

6/Se observa una menor variación en la intensidad de luz difundida en las proximidades de la concentración crítica micelar.

7/ Al representar $(C-cmc)/(I-I_{cmc})$ frente a $(C-cmc)$, gráfica (6-III) , la ordenada en el origen permite calcular el peso molé -

cular de la estructura micelar (M^*) y de su pendiente se deduce el valor del segundo coeficiente del virial (B) ;como índice de las interacciones existentes.

EMULGENTE (%)		

(0,10 - 0,35)	$1/M^* = 1,054 \cdot 10^{-5}$	$M^* = 94838$
	$2 B = 2,92 \cdot 10$	$B = 1,46 \cdot 10^{-3}$

8/ Al representar: $[H(c-cmc)/\tau]$ frente (c-cmc): (tabla 6-3) (gráfica 6-IV) y extrapolar el tramo rectilíneo a concentración nula, se obtiene el inverso del peso molecular del agregado y la pendiente da información de las interacciones susceptibles de producirse entre las moléculas presentes en el medio.

EMULGENTE (%)		

(0,10 - 0,35)	$1/M^* = 1,056 \cdot 10^{-5}$	$M^* = 94696$
	$2 B = 6,00 \cdot 10$	$B = 3,00 \cdot 10^{-3}$

Como puede observarse en las gráficas (6-III) ,(6-IV) , un porcentaje de emulgente superior al 0,35 % supone un valor negativo para la ordenada en el origen al tratar de extrapolar a concentración cero, es por ello por lo que nó puede conocerse el peso

moléculas de los agregados que se forman .

Los cambios de pendiente que se observan en los tramos rectilíneos (gráficas:(6-III)(6-IV), son indicativos de las diferentes interacciones inter-intramoleculares que suceden al aumentar la concentración de agente tensioactivo y a su vez explican la presencia de distintas estructuras con diferente capacidad para dispersar la luz que incide sobre ellas .

9/ Tras aplicar la ecuación de difusión de Rayleigh y el coeficiente turbidimétrico, no hay gran diferencia entre los resultados obtenidos al calcular el peso molecular del asociado micelar.

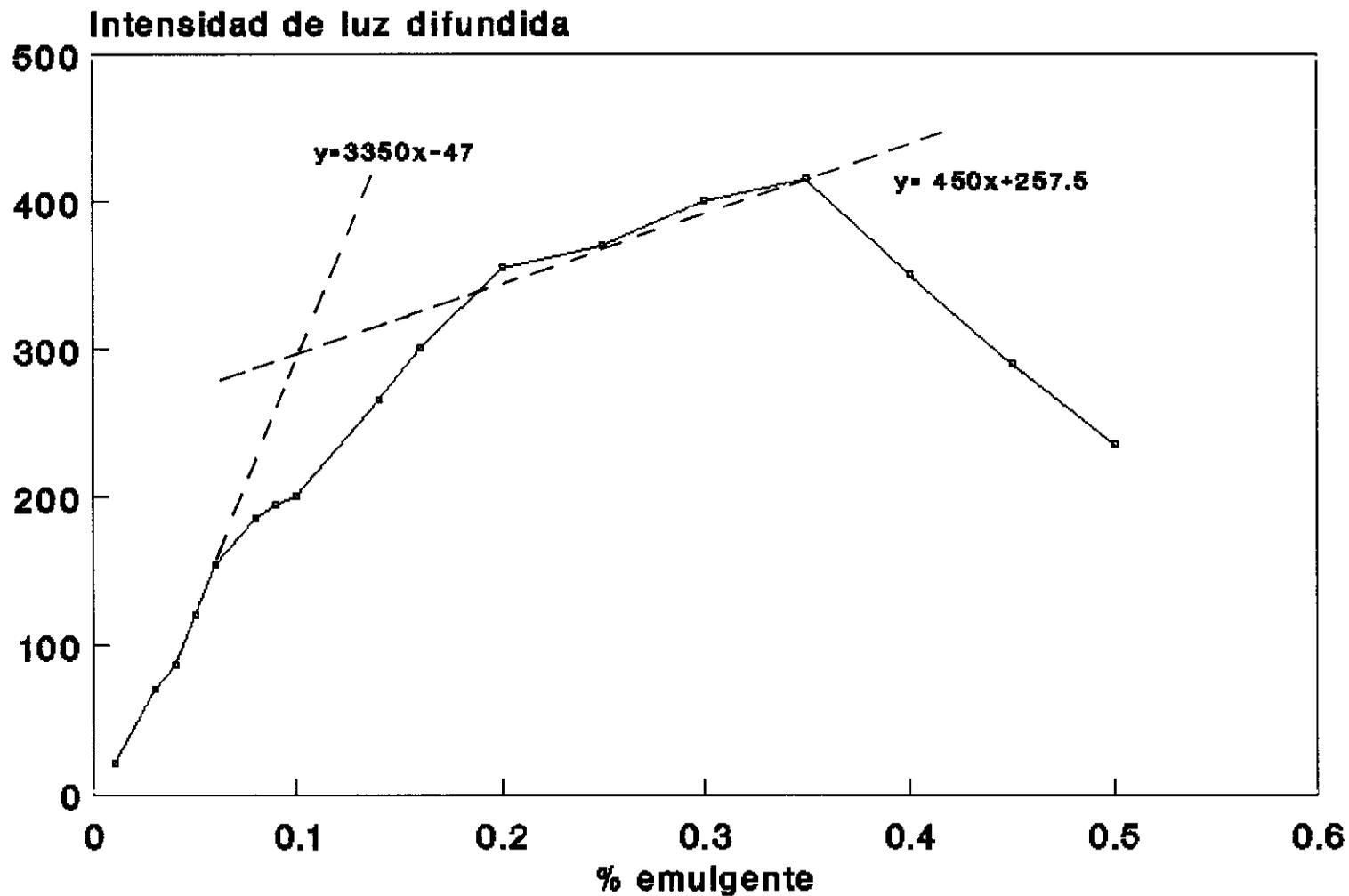
DIFUSION DE LUZ. CONCENTRACION DE EMULGENTE

=====

EMULGENTE %	INTENSIDAD DE LUZ DIFUNDIDA	$I - I_{cmc}$	$(C - c_{mc})^{-3}$ g/ml 10	$\frac{(C - c_{mc})^{-6}}{(I - I_{cmc})^{10}}$
0,01	20		-0,9	
0,03	70		-0,7	
0,04	87		-0,6	
0,05	120		-0,5	
0,06	154		-0,4	
0,08	185		-0,2	
0,09	195		-0,1	
0,10	200		0,0	0,000
0,14	270	70	0,4	5,71
0,16	300	100	0,6	6,00
0,20	355	155	1,0	6,45
0,25	370	170	1,5	8,80
0,30	400	200	2,0	10,00
0,35	415	215	2,5	11,62
0,40	350	150	3,0	20,00
0,45	290	90	3,5	38,80
0,50	235	35	4,0	114,00

(tabla 6-1)

CONCENTRACION DE EMULGENTE/INTENSIDAD DE LUZ DIFUNDIDA



293

Angulo 90°

(Gráfica 6-l)

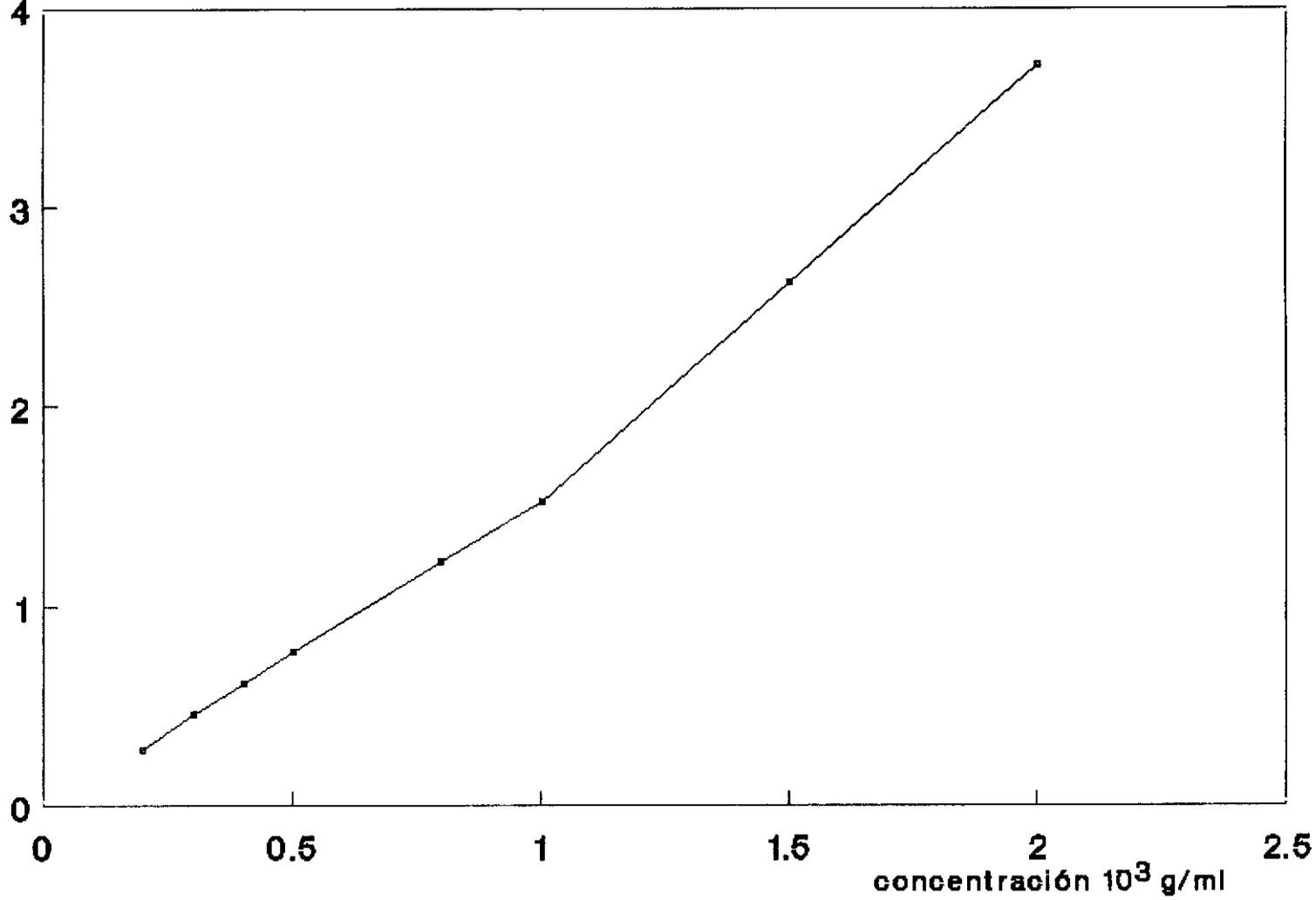
VARIACION DEL INDICE DE REFRACCION CON
 =====
 LA CONCENTRACION DE EMULGENTE
 =====

EMULGENTE		NUMERO DE VUELTAS	NUMERO DE FRANJAS	VARIACION DE INDICE DE REFRACCION -4 10
%	⁻³ g/ml (10)			
0,02	0,20	0,54	3,78	0,271
0,03	0,30	0,90	6,30	0,453
0,04	0,40	1,20	8,40	0,603
0,05	0,50	1,54	10,87	0,770
0,08	0,80	2,50	17,50	1,250
0,10	1,00	3,02	21,15	1,520
0,15	1,50	5,21	36,47	2,620
0,20	2,00	7,38	51,66	3,710

(tabla 6-2)

VARIACION DEL INDICE DE REFRACCION CON LA CONCENTRACION DE EMULGENTE

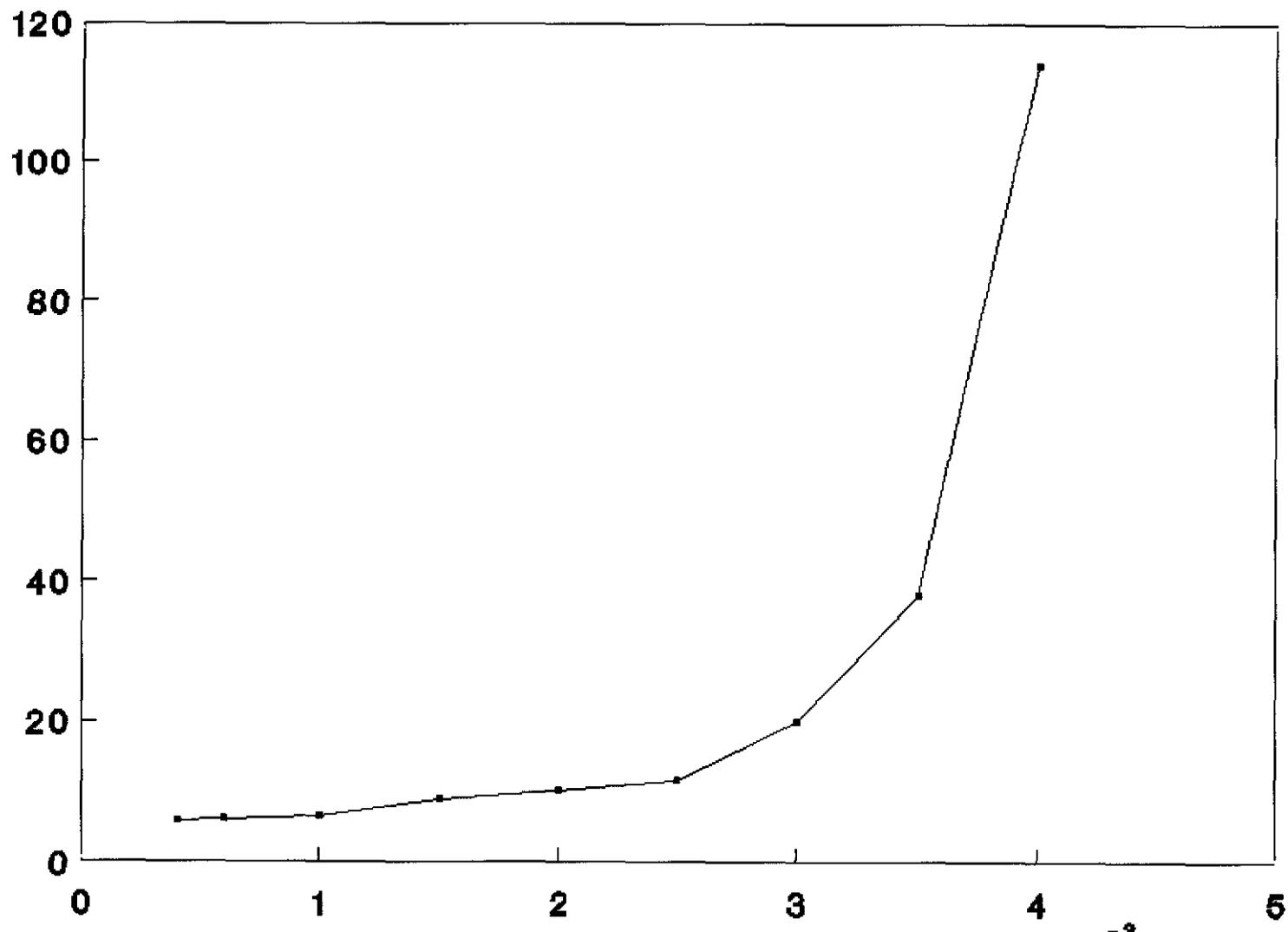
$\Delta n (10)^{-4}$



(Gráfica 6-II)

DIFUSION DE LUZ

$(c-cmc)/I_{-cmc} \cdot 10^{-6}$



(Gráfica 6-III)

$(c-cmc) \cdot 10^{-3} \text{ g/ml}$

TURBIDEZ EN FUNCION DE LA CONCENTRACION DE EMULGENTE

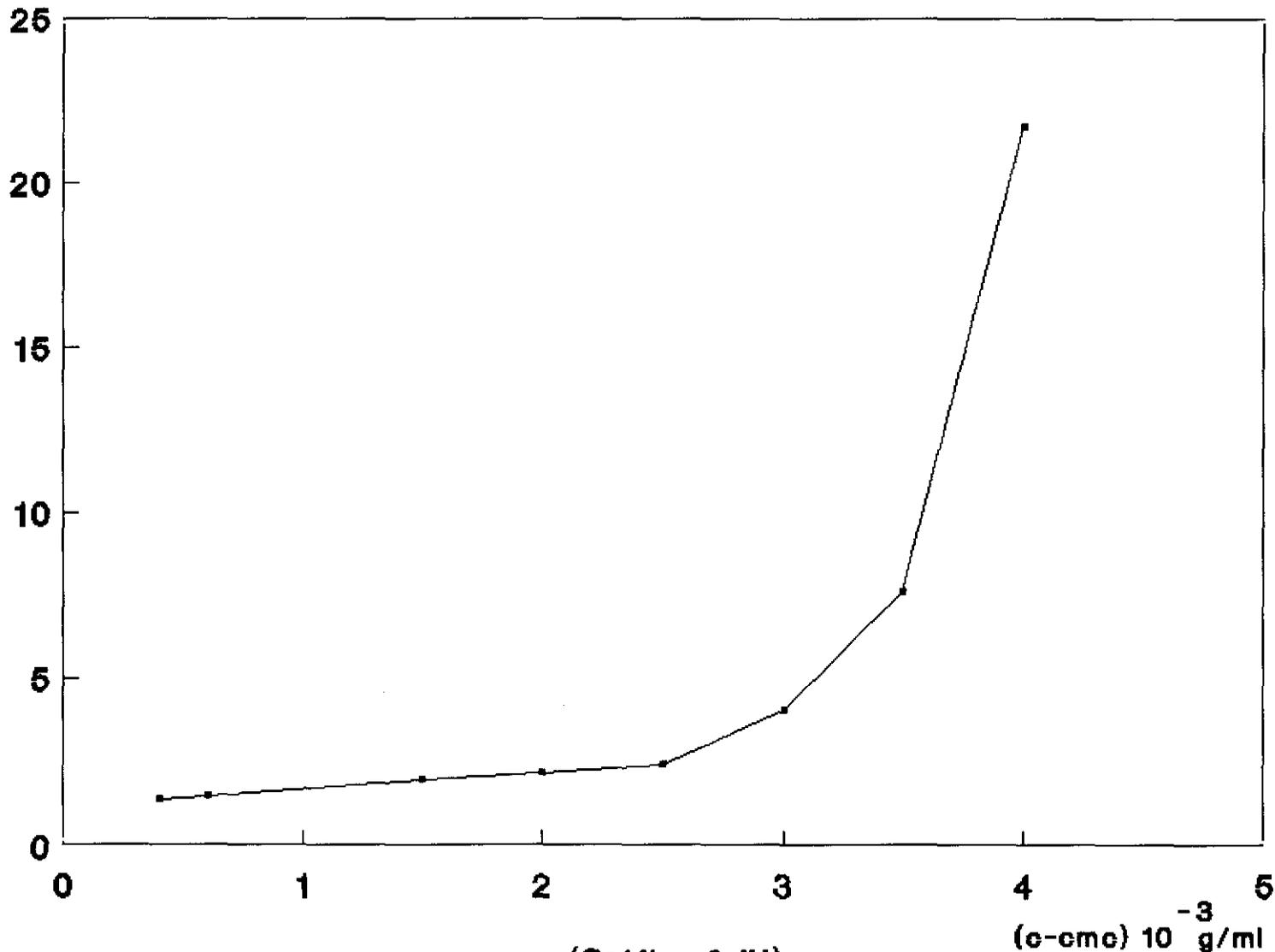
=====

$C-cmc$ (10) ⁻³	ns	$R(90)$ (10) ⁻⁵	τ (10) ⁻⁴	$\frac{H(c-cmc)}{\tau}$ (10) ⁻⁵
0,4	1,352	2,35	1,97	1,37
0,6	1,362	3,41	2,80	1,45
1,0	1,381	5,44	4,55	1,49
1,5	1,405	6,17	5,07	1,96
2,0	1,429	7,51	6,29	2,15
2,5	1,454	8,35	7,00	2,42
3,0	1,478	6,02	5,04	4,03
3,5	1,502	3,73	3,12	7,58
4,0	1,526	1,49	1,25	21,69

(tabla 6-3)

TURBIDIMETRIA . DIFUSION DE LUZ

$H(\theta - \theta_0) / \lambda \cdot 10^{-5}$



(Gráfica 6-IV)

6.5 CONCLUSIONES

1/ La difusión de luz y las medidas del índice de refracción permiten, no solo conocer la concentración crítica micelar de un emulgente, si no que aportan cierta información sobre las estructuras micelares que complementan hechos experimentales observados en otras técnicas de medida.

2/ La difusión de luz permite conocer el peso molecular de la estructura micelar. El hecho de no disponer de un emulgente puro, impide calcular en número de agregación

3/ Ambas técnicas: difusión de luz y medidas de índice de refracción permiten fijar el valor de concentración crítica micelar en 0,1 % de emulgente, lo que por otro lado, concuerda con los resultados obtenidos en otras técnicas de medida realizadas en ésta misma memoria.

4/Al modificar el porcentaje de emulgente, los resultados espectrofotométricos de absorción, así como sus espectros de primera y segunda derivada, muestran cambios acusados en las estructuras químicas que pueden, posiblemente complementarse con las fluctuaciones que se observan en las medidas de difusión de luz.

5/A partir de 0,35% de emulgente se observa:

a/Una disminución de la intensidad de luz difundida

b/Un aumento en la tensión superficial

c/modificaciones en los espectros de primera y segunda derivada.

Y de todo esto se deduce que:

A partir de esta concentración de emulgente, las asociaciones intermoleculares explican continuos cambios estructurales que son indicativos de la presencia de otras estructuras diferentes a la micela. La aplicación de todas estas técnicas apoyan esta conclusión.

CAPITULO 7
ENSAYO "IN VIVO"

7. ENSAYO "IN VIVO"

7.1. OBJETIVO DEL ESTUDIO

7.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

7.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

7.4. METODO ANALITICO

7.5. RESULTADOS OBTENIDOS

7.6. CONCLUSIONES

7.1..OBJETIVO DEL ESTUDIO

1/ Analizar la efectividad de la emulsión ensayada ante una posible situación de colestasis o colelitiasis.(150)(151).

2/ Comparar la biodisponibilidad de la vitamina A, administrada por via oral en dos formas farmacéuticas diferentes: cápsulas de gelatina blanda (laboratorios Alcon) y emulsión liofilizada; regenerada en el momento de la administración.

7.2. DISPOSITIVO DE MEDIDA

Se utiliza un cromatógrafo de líquidos HPLC, modelo GILSON, que dispone de un detector UV con longitud de onda variable, modelo 116 y un inyector automático 231 XL .El equipo está acoplado a un integrador SP 270.

7.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES

Se seleccionan nueve conejos blancos de Nueva Zelanda, cuatro machos y cinco hembras, con peso comprendido entre 3,80 - 4,99 Kg. Durante todo el ensayo se les mantiene con la dieta habitual ad libitum. La composición cuali-cuantitativa del pienso suministrado por Mejias S.A. es la siguiente:

Constituyentes analíticos:(Humedad:11% , proteínas:16,50% , materia grasa bruta:2,3% , celulosa bruta:16% , cenizas:9,5% , calcio:1,4 Kg , fósforo:0,5 Kg , vitamina A:8000 UI/Kg , vitamina D3: 1600 UI/Kg) .

Ingredientes: (forrajes:44% , granos de cereales:20% , subproductos de cereales:23% , semillas oleaginosas:11% , minerales:2%)

A:Conejos sin sufrir operación quirúrgica

Las condiciones estandar de laboratorio a las que estan sometidos son: Temperatura: 21°C - 22°C . Humedad: 70% .Un ciclo de luz / oscuridad: 12/12 , excepto en caso de reproducción en el que el ciclo luz/oscuridad es de 14/10 .

1a:Previa a la administración de cualquier formulación vitaminica, se toma muestra de sangre arterial a fin de analizar los niveles plasmáticos basales de vitamina A:retinol. (152),(153),(154).

2a:Se administra por via oral una dosis de 25000 U.I de vitamina A

palmitato, en forma de cápsula de gelatina blanda.

3a: Se toma muestra de sangre a las seis y veinticuatro horas

4a: Transcurridos seis días, se administra igual dosis de vitamina A palmitato por vía oral, en forma de emulsión liofilizada rege - nerada en el momento de administración.

5a: Se toma muestra de sangre a las seis y veinticuatro horas

TOMA DE MUESTRAS:

La toma de muestra se lleva a cabo tras dilatar los vasos sanguíneos de la oreja con xileno y se extrae sangre de la arteria central con ayuda de una aguja heparinizada.

La sangre se centrifuga a temperatura de (- 5°C) durante veinte minutos a 25000 rpm. El plasma se separa en alícuotas y se conserva congelado a temperatura de (- 30 °C) hasta el momento del análisis .

PREPARACION Y ADMINISTRACION DE FORMULACIONES:

A fin de asegurarnos una perfecta dosificación de la formulación ensayada, la emulsión liofilizada se conserva a temperatura de 5°C en atmósfera de nitrógeno hasta el momento de su utilización. El análisis espectrofotométrico permite confirmar que la potencia vitamínica se mantiene durante todo el periodo ensayado.

En el momento de la administración, se dispersa el sistema lio-

filizado en agua con ayuda de un agitador magnético durante diez minutos y se administra con ayuda de una sonda .

B:Conejos sometidos a operacion quirúrgica

Los conejos se mantienen en ayunas veinticuatro horas previas a la operación.

La cirugía se lleva a cabo mediante anestesia general por vía intramuscular con una mezcla:(2:2:1) de Rompun:(1 mg/Kg) , Ketolat:(10 mg/Kg) , Atropina:(1 inyectable de 1 mg/ml).

Se depilan los conejos por la zona ventral, a fin de realizar una laparotomía media en dirección caudal desde la apófisis sifoidea. Tras desinfectar la zona con una solución de armil (cloruro de benzalconio 1:1000) , se hace una incisión cutánea por la línea alba. Una vez alcanzado el peritoneo se realiza una incisión mas profunda a fin de acceder a la cavidad abdominal .

A siete de los nueve conejos se les realiza una coledocotomía y a los otros dos conejos, una ligadura de colédoco.

Se localiza el colédoco y se liga por la zona de conexión al duodeno a través de una sutura de seda. Posteriormente y en caso de coledocotomía, se canula el colédoco en dirección al extremo en el que confluyen el conducto hepático y cístico.

La sonda se exterioriza a través de una perforación transcutánea a fin de que la secreción biliar no quede acumulada en el hígado ni en la vesícula biliar.

La sutura se hace en dos planos . En primer lugar el peritoneo a través de una sutura esteril reabsorbible (catgut) y se finaliza con una sutura de seda.

En caso de realizar una ligadura de coledoco, se liga unicamente por la zona cercana al duodeno.

El conejo operado se introduce en jaulas climatizadas a temperatura 25°C - 27°C y se les mantiene en ayunas veinticuatro horas , periodo tras el cuál se les aporta la dieta ad libitum
Cada dia de postoperatorio se controla el peso y la temperatura corporal.

Previa a la administración de la formulación, se toma una muestra de sangre arterial ó venosa de la oreja y seis horas después, se extrae una segunda muestra a fin de evaluar la posible absorción de la vitamina A administrada.(155).

7.4. METODO ANALITICO

7.4.1.METODO DE EXTRACCION DEL RETINOL PLASMATICO

7.4.2.METODO DE VALORACION DEL RETINOL PLASMATICO

7.4.2.1.CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

7.4.2.2.LINEALIDAD

7.4.2.3.PRECISION

7.4.2.4.EXACTITUD

7.4.2.5.LIMITES DE DETECCION

7.4.2.6.FACTORES DE RESPUESTA.CONCENTRACION DE RETINOL EN PLASMA

7.4.1.METODO DE EXTRACCION DEL RETINOL PLASMATICO

Se toma una fracción de 0,6 ml de plasma conservado a -300 C y descongelado a temperatura ambiente. Se le añade 1 ml de agua destilada y 2 ml de cloroformo (Merk). Se agita durante un minuto en un agitador de tubos (marca) y se deja reposar durante cinco minutos. La extracción se continua añadiendo 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, tras agitar durante un minuto se centrifuga a 2500rpm durante cinco minutos.

Se separa el sobrenadante (fase acuosa) y se evapora a sequedad en atmósfera de nitrógeno la fase clorofórmica.

Al residuo sólido, se le añade 1,5-2,5 ml de solución :cloroformo-

metanol (1:4) y se sonica durante veinte minutos.

Se filtra a través de un filtro milipore y se inyecta en el cromatógrafo

7.4.2. METODO DE VALORACION DEL RETINOL PLASMATICO

7.4.2.1.CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

Se utiliza una columna C18 Spherisorb ODS de longitud 15 * 0,4 cm y con un relleno de 2,5 micras

Las condiciones cromatográficas son:

Flujo : 0,7 ml/m

Fase movil : agua : metanol (5:95)

Sensibilidad :0,01

λ :330 nm

Inyección: 20 microlitros

7.4.2.2.LINEALIDAD

Se preparan soluciones patrón de retinol(marca) en metanol (Merk): 0,2-1,4 microgramos/ml. Previa a la inyección en el cromatógrafo se filtran a través de un filtro milipore.

A fin de determinar la linealidad, se llevan a cabo los siguientes test:

1-Coeficiente de variación de factores de respuesta

En una calibración lineal, los factores de respuesta: relación - entre lectura y concentración, deben ser semejantes entre sí, próximos al valor de la pendiente de la recta de regresión e inferiores al 5%

2-Significación estadística de la varianza y desviación estandar de la pendiente

$$\frac{\% S}{b} \leq 2\%$$

3-Análisis de la varianza de la regresión

7.4.2.3.PRECISION

El estudio de precisión del método requiere la repetición del análisis sobre una misma muestra, es por ello, por lo que se toman diferentes alícuotas de plasma, correspondiente a un mismo conejo

Se extrae y se valora el retinol plasmático por el método descrito anteriormente.

El ensayo se realiza seis veces.

La precisión se determina:

1- A partir del coeficiente de variación de las áreas obtenidas.

se admite $Cv=2-3\%$

2-Límites de confianza $\bar{X} + TS$

\bar{X} :media de las areas

t :Tstudent para un 95% y n-1 grado de libertad

7.4.2.4.EXACTITUD

La exactitud se expresa en porcentaje de recuperación de la cantidad de analito presente en la muestra, ó bién en forma de diferencia entre el valor hallado y el verdadero.

Se prepara una solución en metanol de acetato de retinol:4 microgramos/ml, de la que se toman 4 ml y se enrasa a 10 ml con metanol.

El ensayo se repite seis veces .

Se calcula el área media y el coeficiente de variación. El valor de área media (A_{st}) corresponde al 100% de extracción de acetato de retinol.

A 0,6 ml de plasma se le añade 1 ml de la solución de acetato de retinol (4 microgramos /ml) y se extraen las vitaminas por el método indicado anteriormente. El ensayo se realiza seis veces. Se calcula el área media (\bar{A}_p) y el coeficiente de variación.

Se efectua el Test T de student para determinar si el valor \bar{A}_p

difiere o nó significativamente del valor Ast, para una probabilidad determinada

$$T_{exp} = \frac{|A_{st} - \bar{A}_p| \sqrt{n}}{S}$$

n: número de determinaciones

SiT exp < T tabuladoexactitud

$$\alpha = 0,05$$

$$n-1 \text{ gl}$$

Si.....T exp > T tabuladohay error por defecto o por exceso, expresado por la diferencia |Ast - \bar{A}_p |

Al trabajar con porcentajes de recuperación, se conoce el porcentaje de analito recuperado por la expresión:

$$\% = \frac{\bar{A}_p \cdot 100}{A_{st}}$$

y el test T se expresa matemáticamente de forma diferente:

$$T_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}| \sqrt{n}}{Cv}$$

7.4.2.5.LIMITES DE DETECCION

De forma aproximada, puede calcularse el límite de detección a través de la expresión:

$$\frac{3 |a|}{b} + \frac{1}{\sqrt{n}}$$

a:ordenada en el origen de la recta de regresión lineal.

b:pendiente de la recta de regresión lineal

7.4.2.6.FACTORES DE RESPUESTA.CONCENTRACION DE RETINOL EN PLASMA

SOLUCION A: acetato de retinol en metanol:1 microgramo/ml

SOLUCION B: retinol en metanol :1 microgramo/ml

SOLUCION C: 0,6 ml de la solución A se mezclan con 0,6 ml de la solución B y se llevan a 10 ml con metanol.Las concentraciones de ambas vitaminas es de 0,06 microgramos/ml.Se filtran y se inyectan en el cromatógrafo

De las áreas obtenidas, se calcula el factor de respuesta del retinol, para ello se considera el factor de respuesta del acetato de retinol como la unidad

$$F_i = \frac{\text{Area del acetato}}{\text{Area del retinol}}$$

La concentración de retinol plasmático puede conocerse a partir del factor de respuesta,según la expresión:

$$C_{st} = \frac{A_i}{A_{st}} C_{st} F_i$$

F_i :factor de respuesta del retinol

C_{st} :concentración de acetato de retinol

A :área del acetato de retinol
st

A :área de retinol plasmático
i

Otro método para conocer la concentración plasmática de retinol, consiste en extrapolar el área obtenida en el cromatograma en la recta patrón de retinol.

7.5.RESULTADOS OBTENIDOS

7.5.1.CURVA PATRON DE RETINOL:LINEALIDAD

7.5.2.FACTORES DE RESPUESTA .TIEMPOS DE RETENCION

7.5.3.EXACTITUD

7.5.4.PRECISION

7.5.5.LIMITES DE DETECCION

7.5.6.CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL EN CONEJOS SANOS

7.5.7.INTERPRETACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS

7.5.8.CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL EN CONEJOS SOMETIDOS

A OPERACION QUIRURGICA.

7.5.1.CURVA PATRON DE RETINOL:LINEALIDAD

A partir de una solución en metanol de vitamina A :retinol,se -
preparan las siguientes diluciones, se filtran por un filtro
milipore y se inyectan 20 microlitros.

Concentración de Retinol(microg./ml)	Area media		
	recta n°1	recta n°2	recta n°3
0,2	116153	116198	116115
0,4	231632	231677	231594
0,6	348996	349041	348951
0,8	461091	461130	461053
1,0	576571	576616	576530
1,2	693244	693291	693206
1,3	751804	751849	751761
1,4	809927	809975	809889

r= 0,99998 b=577395,48 a=675,30

1:Coeficientes de variación de los factores de respuesta

Concentración de retino (microg./ml)	Factores de respuesta		
	0,2	580765,0	580990,0
0,4	579080,0	579192,5	578985,0
0,6	581660,0	581735,0	581585,0
0,8	576363,7	576420,0	576320,0
1,0	576571,0	576616,0	576530,0
1,2	577703,3	577742,5	577671,6
1,3	578310,7	578345,4	578277,7
1,4	578519,3	578553,5	578492,1

Cv=0,30 % hay linealidad

2. Significación estadística de la varianza. Desviación estandar de la pendiente

Varianza de la pendiente..... $S^2_b = \frac{S^2_{yx}}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}$

$$S^2_{yx} = \frac{\Sigma y^2 - a\Sigma y - b\Sigma xy}{n-2}$$

$\Sigma y^2 = 7,30732 \cdot 10^{12}$	$\Sigma y = 11968294$	$\Sigma xy = 12641618,2$	$n=24$
$S^2_{yx} = 1118272,72$	$\Sigma x^2 = 21,87$	$\Sigma x = 20,7$	

$$S^2_b = 278437,03$$

$S_b = \sqrt{S^2_b} = 527,67$	$\frac{S_b}{b} \cdot 100 = 0,09$	$\%S_b = 0,09$.linealidad
-------------------------------	----------------------------------	----------------------------

Límites de confianza de la pendiente..... $b \pm t \cdot S_b$
 $t = 2,074$ $(n-2) \text{ gl} = 22$ $\alpha = 0,05$

$$\text{límites} = 577395,48 \pm 1092,9$$

Test T..... $T_{exp} = \frac{|b|}{S_b} = 1094,23$

b

$T_{exp} > T_{tab}$ incluso para $P=0,001$ (0,1%), lo que significa que la probabilidad de que la pendiente sea distinta de cero es muy elevada, superior al 99,9%.

3. Análisis de la varianza de la regresión

Estudio de la correlación:

$$S_y^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} \quad S_x^2 = \Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n} \quad S_{xy} = \Sigma xy - \frac{(\Sigma x \Sigma y)}{n}$$

Suma de los cuadrados totales:	$S_y^2 = \Sigma y^2 - \frac{(\Sigma y)^2}{n} = 1,33898 \cdot 10^{12}$
Suma de los cuadrados de la regresión:	$(S_{xy})^2 / S_x^2 = 1,33895 \cdot 10^{12}$
Suma de los cuadrados residual:	$S_y^2 - [(S_{xy})^2 / S_x^2] = 3 \cdot 10^7$
varianza de la regresión:	$\frac{(S_{xy})^2 / S_x^2}{1} = 1,33895 \cdot 10^{12}$
varianza residual:	$\frac{S_y^2 - [(S_{xy})^2 / S_x^2]}{n-2} = 1363636,36$

Razón de varianzas :	$\frac{\text{regresión}}{\text{residual}} = 981200$
----------------------	---

Estudio de la linealidad:

Suma de cuadrados de error puro: $\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2/n = 2\ 10$

$$\text{varianza del error puro: } \frac{\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2/n}{n-K} = 1250000 \quad K=8 \quad n=24$$

Suma de cuadrados de falta de ajuste: residual -error puro:
 $[\Sigma y^2 - [(Sxy)^2/Sx^2]] - [\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2/n] = 1\ 10^7$

Varianza de la falta de ajuste:

$$\frac{[\Sigma y^2 - [(Sxy)^2/Sx^2]] - [\Sigma y^2 - (\Sigma y)^2/n]}{(n-2)-(n-k)} = 1666666,6$$

Razón de varianzas: falta de ajuste/error puro = F=1,33

F (tab) $\frac{6}{16} = 2,74$

F(exp) < F(tab)...linealidad

7.5.2. FACTORES DE RESPUESTA .TIEMPOS DE RETENCION

Se inyectan cuatro muestras con una concentración 0,4 microg/ml de ambas vitaminas. Los resultados obtenidos se presentan en la siguiente tabla.

MUESTRA	ACETATO DE RETINOL		RETINOL		FACTOR DE RESPUESTA RETINOL
	AREA	TR	AREA	TR	
1	166643	6,89	221889	4,25	0,75
2	164922	6,86	225341	4,26	0,73
3	165321	6,86	224178	4,25	0,73
4	166215	6,88	225013	4,26	0,73

$$\bar{A}_{st}=165775,25 \quad \bar{A}_{ret}=224105,25 \quad \bar{F}_{resp}=0,73$$

$$Cv=0.47 \% \quad Cv=0.69 \% \quad Cv =1.36\%$$

7.5.3. EXACTITUD

A partir de una solución de acetato de retinol en metanol(4µg/ml), se preparan seis muestras de 1,6 µg/ml y se inyectan en el cromatógrafo en las mismas condiciones cromatográficas que al analizar el retinol en plasma.

Las áreas obtenidas son las siguientes:

Muestra	Area
1	695129
2	688849
3	702321
4	690931
5	688631
6	679985

A = 690974,5 cv=1,076%

Con el fin de averiguar el porcentaje de recuperación del acetato de retinol presente en una muestra plasmática, a 0,6 ml de plasma se le incorporan 1 ml de la solución de acetato de retinol(4 μ /ml) Al residuo que queda tras evaporar la fase clorofórmica se le añaden 2,5 ml de metanol-cloroformo (4:1), para asegurarnos que la concentración de la vitamina acetato es la misma que la inyectada anteriormente y poder considerar que el área media obtenida corresponde al 100% de extracción .

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Muestra	Area	% Recuperación
1	643297	93,10
2	607988	87,99
3	658015	95,23
4	670383	97,02
5	650690	94,17
6	663473	96,02

\bar{A} = 648974,33 \bar{R} = 93,92%
Sd=22205,09 Sd=3,21
cv=3,42% cv=3,42%

$$T_{exp} = \frac{|\bar{A}_s - \bar{A}_p| \sqrt{n}}{S} = 4,53 \qquad T_{exp} = \frac{|100 - \bar{R}| \sqrt{n}}{cv} = 4,26$$

$T_{tab} = 2,571$ para $\alpha = 0,05$ $gl = (n-1) = 5$
 $T_{tab} = 4,773$ $\alpha = 0,005$

$T_{exp} > T_{tab}$ para $\alpha = 0,05$, existe un error por defecto = 42000; ésto es: hay diferencia significativa entre las áreas obtenidas, a menos que se considere un $\alpha = 0,005$

7.5.4. PRECISION

A fin de estudiar la precisión del método utilizado, se analizan diferentes alicuotas de plasma procedentes de un mismo conejo .

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Muestras	Area
1	91324
2	95961
3	93921
4	96941
5	91975
6	94321

A=94073,83 sd=2183,26 cv= 2,32%

Podemos admitir precisión debido a que el $Cv=2-3\%$

Los límites de confianza $\bar{A} \pm TS$

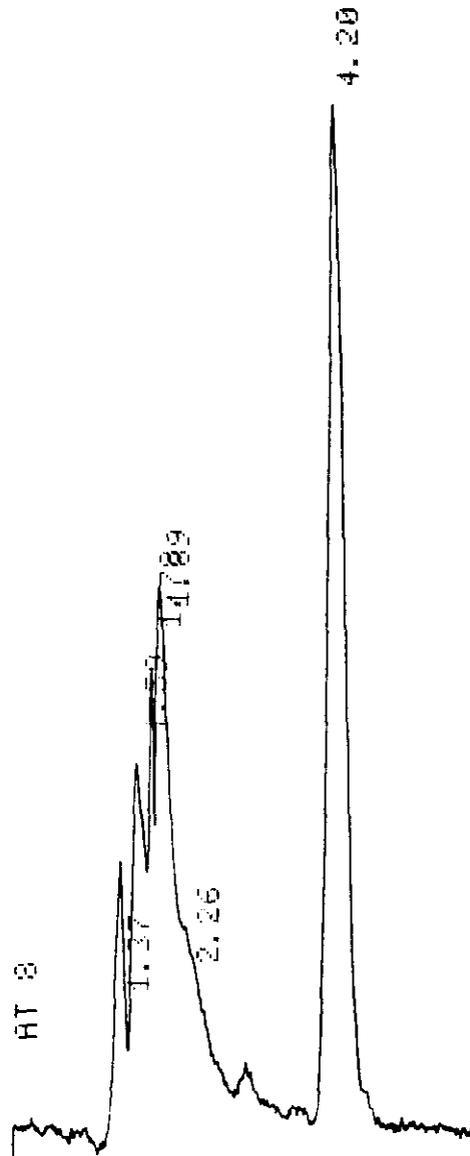
$$94073,83 \pm 2,448 * 2183,26 = [99418,45 - 88729]$$

7.5.5. LIMITES DE DETECCION

En base a los resultados obtenidos en la recta patrón ,se calcula el límite de detección aproximado.

$$\frac{3|a|}{b} \frac{1}{\sqrt{n}} = 1,24 \cdot 10^{-3} (\mu\text{g/ml})$$

CROMATOGRAMA - RETINOL PLASMATICO



sensibilidad 0,01
 λ 330nm
atenuación 8

7.5.6. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL

En las siguientes tablas se exponen los resultados obtenidos en conejos a los que no se les ha sometido a ninguna operación quirúrgica.

(MUESTRA BASAL)

Conejo	Area	Ci ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (μg)	Volumen plasma (ml)	Retinol plasma ($\mu\text{g/ml}$)
1	34090,0	0,06	1,5	0,090	0,20	0,45
2	190878,0	0,33	1,5	0,493	0,60	0,82
3	95454,5	0,17	1,5	0,255	0,60	0,42
4	81818,5	0,14	1,5	0,219	0,60	0,36
5	140055,0	0,24	1,75	0,422	0,60	0,70
6	146079,5	0,35	2,0	0,504	0,60	0,84
7	130717,0	0,22	1,5	0,337	0,60	0,56
8	133695,0	0,23	1,5	0,345	0,60	0,57
9	104545,5	0,18	1,5	0,277	0,60	0,46

(tabla 7-1)

(CAPSULAS DE GELATINA BLANDA).....muestra tomada a las seis

 horas de su administración

Conejo	Area	Ci ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (μg)	Volumen plasma (ml)	Retinol plasma ($\mu\text{g/ml}$)
1	137025,0	0,24	1,5	0,360	0,41	0,88
2	180180,0	0,31	2,5	0,775	0,60	1,29
3	107727,5	0,19	2,5	0,475	0,60	0,79
4	111623,0	0,19	2,0	0,384	0,60	0,64
5	122662,0	0,21	2,5	0,527	0,60	0,88
6	154374,0	0,26	2,5	0,665	0,60	1,11
7	88636,5	0,15	2,5	0,392	0,60	0,65
8	88036,5	0,15	2,5	0,390	0,60	0,65
9	107432,0	0,18	2,5	0,472	0,60	0,79

(tabla 7-2)

(CAPSULAS DE GELATINA BLANDA).....muestra tomada a las veinti-

 cuatro horas de su administración

Conejo	Area	Ci (µg/ml)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (µg)	Volumen plasma (ml)	Retinol plasma (µg/ml)
1	129935,0	0,22	1,5	0,334	0,60	0,56
2	136255,0	0,23	2,0	0,468	0,55	0,85
3	68750,0	0,12	2,0	0,246	0,55	0,44
4	80001,0	0,14	1,45	0,204	0,40	0,51
5	127839,0	0,22	2,0	0,440	0,60	0,73
6	126831,5	0,22	1,5	0,330	0,35	0,93
7	122493,5	0,21	1,6	0,336	0,60	0,56
8	138236,0	0,23	1,5	0,357	0,60	0,59
9	170032,0	0,29	1,5	0,439	0,60	0,73

(tabla 7-3)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA.....muestra tomada a las

 seis horas de la administración

Conejo	Area	Ci (µg/ml)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (µg)	Volumen plasma (ml)	Retinol plasma (µg/ml)
1	162181,5	0,27	2,0	0,558	0,60	0,93
2	154600,0	0,26	2,5	0,665	0,60	1,10
3	103636,5	0,18	2,5	0,455	0,60	0,76
4	94090,9	0,16	2,5	0,412	0,60	0,69
5	119411,0	0,20	2,5	0,512	0,60	0,85
6	173292,0	0,29	2,5	0,745	0,60	1,24
7	97520,0	0,16	2,0	0,334	0,55	0,61
8	124705,0	0,21	2,0	0,430	0,60	0,72
9	70909,5	0,12	2,5	0,312	0,60	0,52

(tabla 7-4)

EMULSION LIOFILIZADA Y REGENERADA.....muestra tomada a las

 veinticuatro horas de la administración

Conejo	Area	Ci (µg/ml)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (µg)	Volumen plasma (ml)	Retinol plasma (µg/ml)
1	86931,5	0,15	2,0	0,306	0,60	0,51
2	174358,0	0,30	2,0	0,600	0,60	1,00
3	111652,5	0,19	1,7	0,326	0,60	0,54
4	74247,5	0,13	1,7	0,222	0,60	0,37
5	104983,5	0,18	1,7	0,314	0,43	0,73
6	154099,0	0,26	1,7	0,452	0,53	0,85
7	137563,0	0,23	1,5	0,355	0,60	0,59
8	107638,5	0,19	1,8	0,344	0,55	0,62
9	66153,5	0,11	1,7	0,198	0,43	0,46

En la siguiente tabla se muestra de forma comparativa los resultados obtenidos tras la administración de ambas formulaciones

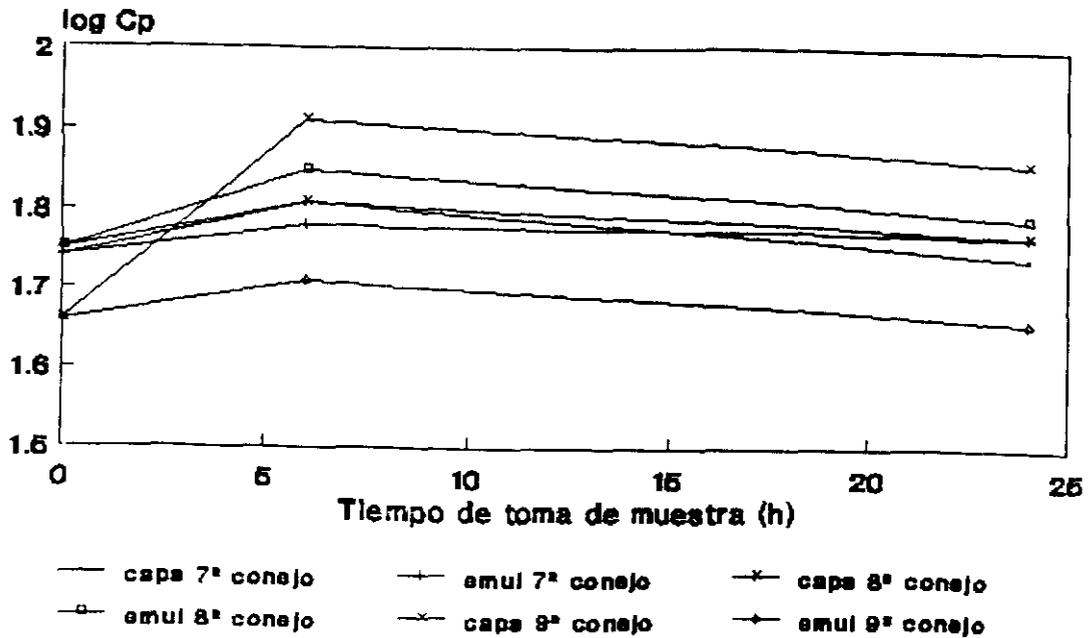
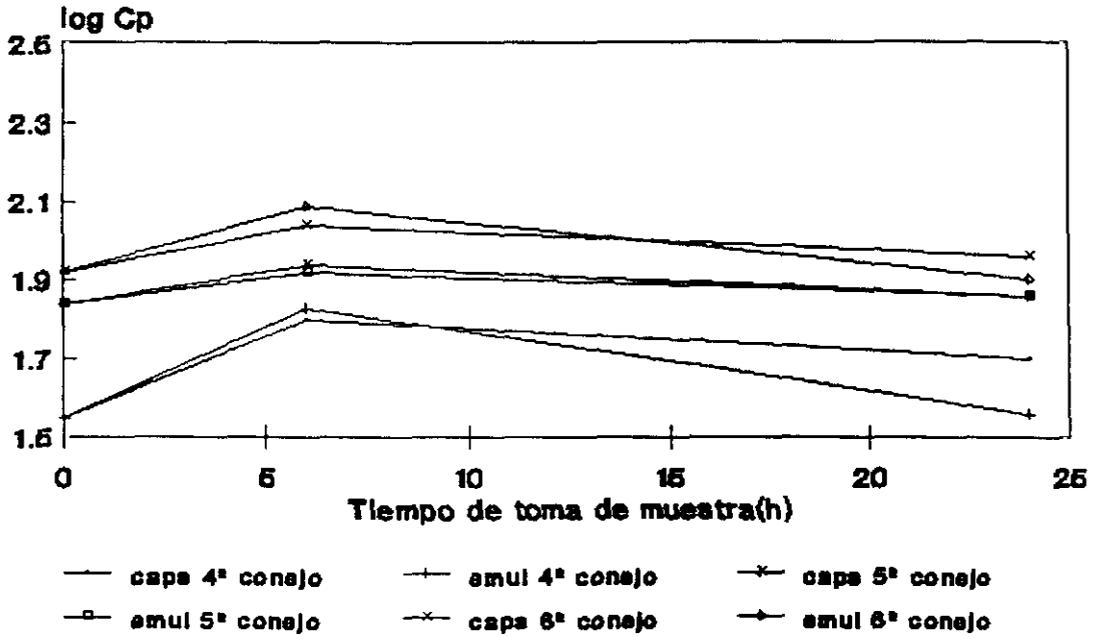
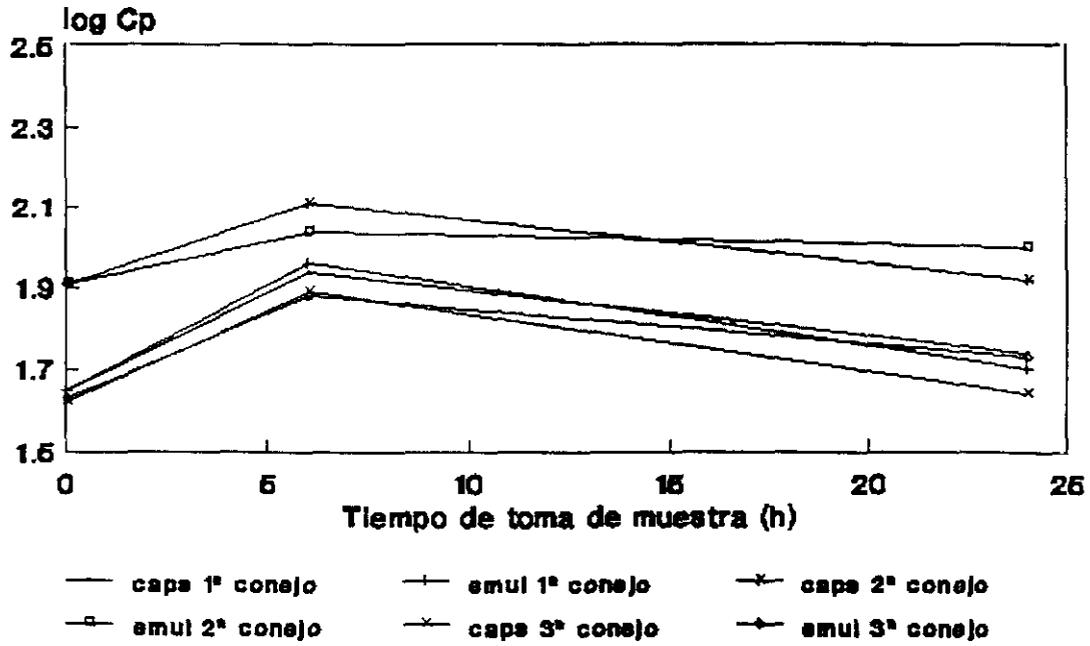
RETINOL PLASMATICO ($\mu\text{g/dl}$)

Conejo	Muestra basal	caps.gelatina blanda		emuls.liofilizada regenerada	
		Vit A palmitato		Vit A palmitato	
		6 horas	24 horas	6 horas	24 horas
1	45	88	56	93	51
2	82	129	85	110	100
3	42	79	44	76	54
4	36	64	51	69	37
5	70	88	73	85	73
6	84	111	93	124	85
7	56	65	56	61	59
8	57	65	59	72	62
9	46	79	73	52	46

\bar{X} = 57,55	85,33	65,55	82,44	63,00
Cv= 30,42%	26,01%	24,97%	28,19%	31,54%

(tabla 7-6)

CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE RETINOL



7.5.7. INTERPRETACION ESTADISTICA DE LOS RESULTADOS

Se pretende comparar las dos formulaciones de vitamina A palmitato: cápsulas de gelatina blanda y emulsión liofilizada. Se dispo - nen de los niveles plasmáticos de retinol al cabo de seis horas de su administración.

TRATAMIENTO DE VARIANZAS : TEST F .(149)

Se considera:

Hipótesis nula; $H_0: \sigma^2_1 = \sigma^2_2$..varianzas iguales

Hipótesis alternativa ; $H_1 : \sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$..varianzas diferentes

Se utiliza el estadístico $F = \frac{S^2_2}{S^2_1}$

Para admitirse la hipótesis nula ha de cumplirse que: $F_{exp} < F_{tab}$ para $(n_1 - 1)$ y $(n_2 - 1)$ grados de libertad.

Cápsulas : $\bar{X}_1 = 85,33$	$S_1 = 26,01$	$S^2_1 = 676,52$
Emulsión: $\bar{X}_2 = 82,44$	$S_2 = 23,24$	$S^2_2 = 540,09$
$F = \frac{676,52}{540,09} = 1,25 = F_{exp}$		

$\alpha = 0,1$	$\alpha/2 = 0,05$	$F_{\frac{8}{8}} = 3,44$	$1,25 < 3,44$
$\alpha = 0,05$		$\alpha/2 = 0,025$		" = 4,43		$1,25 < 4,43$
$\alpha = 0,020$		$\alpha/2 = 0,01$		" = 6,03		$1,25 < 6,03$

...se admite H_0 para $\alpha \leq 0,1$

Conocidos los grados de libertad y el error α , se define un intervalo de valores de F , cuyo extremo superior : $F_{\text{tab}} = F_{\frac{8}{8}}$ y el extremo inferior = $1 / F_{\frac{8}{8}}$. La diferencia de varianzas no es significativa en caso de que F_{exp} esté incluido en dicho intervalo.

$\alpha = 0,1$	$0,29 < 1,25 < 3,44$
$\alpha = 0,05$	$0,22 < 1,25 < 4,43$
$\alpha = 0,02$	$0,15 < 1,25 < 6,43$

...no hay diferencia de varianzas significativa

Conclusiones semejantes se obtienen por el método de la desviación reducida: estadístico ϵ

Valores de $\epsilon < 2$, permiten admitir que las varianzas no difieren significativamente.

Si $\epsilon > 2$, el grado de significación viene dado por el valor de α de la tabla ϵ

$$\epsilon = \frac{S_1^2 - S_2^2}{\left(\frac{2S_1^2}{n_1} + \frac{2S_2^2}{n_2} \right)^{\frac{1}{2}}}$$

$$\epsilon = 0,334$$

TRATAMIENTO DE MEDIAS

A fin de reducir la variabilidad que proviene de las unidades experimentales, se comparan las medias con observaciones apareadas. Se considera $H_0: \mu_1 - \mu_2 = d_0 = \mu_d = 0$

Se calcula el estadístico: $t = \frac{(\bar{d} - d_0)}{S_d / \sqrt{n}}$ $S_d = \frac{[\sum (d - \bar{d})^2]^{\frac{1}{2}}}{(n-1)^{\frac{1}{2}}}$

con (n-1) gl. S_d y \bar{d} representan la desviación estandar y la media de la muestra de las diferencias obtenidas para los distintos pares de valores.

conejo	d	(d - \bar{d}) ²
1	-5	62,09
2	19	259,85
3	3	0,01
4	-5	62,09
5	3	0,01
6	-13	252,17
7	4	1,25
8	-7	97,61
9	27	581,77
	26	1316,86

$\bar{d} = 26/9 = 2,88$ $Sd = 12,82$ $T_{exp} = 0,44$ $gl = 16$

$\alpha = 0,2$	$T_{tab} = 1,337$ 16	$0,44 < 1,337$
$\alpha = 0,1$	" = 1,746	$0,44 < 1,746$
$\alpha = 0,05$	" = 2,12	$0,44 < 2,12$
$\alpha = 0,02$	" = 2,583	$0,44 < 2,583$

..se acepta H_0 para un $\alpha \leq 0,2$

TRATAMIENTO DE MEDIANAS : PRUEBA DE WILCOXON : TEST U

La hipótesis nula, considera igualdad de medianas

Se utiliza el estadístico: $U_i = W_i - [n_i (n_i + 1)/2]$

W_i : es el sumatorio de los números de orden de cada formulación

n_i : número de resultados de cada tratamiento

Se consideran las medianas iguales si el valor tabulado de U para un error $(\alpha/2)$ y n grados de libertad, es menor que cualquier valor experimental de U .

	conejo	cápsulas	emulsión
1		88 (13)	93 (14)
2		129 (18)	110 (16)
3		79 (10)	76 (8)
4		64 (3)	69 (6)
5		88 (12)	85 (11)
6		111 (15)	124 (17)
7		65 (5)	61 (2)
8		65 (4)	72 (7)
9		79 (9)	52 (1)
		89	82

U cápsulas =53 U emulsión =46

$\alpha = 0,002$ $U = \frac{9}{9} = 7$ $7 < 46$
 $\alpha = 0,02$ " = 14 $14 < 46$
 $\alpha = 0,05$ " = 17 $17 < 46$
 $\alpha = 0,1$ " = 21 $21 < 46$

...medianas iguales para $\alpha \leq 0,1$

7.5.8. CONCENTRACIONES PLASMATICAS DE RETINOL EN CONEJOS SOMETIDOS
A OPERACION QUIRURGICA.

A continuación se muestran las variaciones de peso y temperatura así como, el tipo de operación quirúrgica a la que son sometidos los conejos ensayados.

Conejo nº / peso(Kg) operación	Postoperatorio			
	1º dia peso /t(°C)	2º dia peso /t(°C)	3º dia peso /t(°C)	4º dia peso /t(°C)
1 / 3,720 coledocotomia	3,500 /38,6	3,400 /39,4	muere	
2 / 3,350 coledocotomia	3,050 /38,6	3,100 /39,7	2,970 /39,5	muere
3 / 3,950 coledocotomia	3,780 /38,3	3,720 /37,3	muere	
4 / 4,560 coledocotomia	4,500 /37,0	muere		
5 / 3,750 coledocotomia	3,580 /39,0	3,450 /39,3	muere	
6 / 3,950 ligadura	3,800 /38,8	3,720 /39,0	3,540 /38,8	muere
7 / 3,890 ligadura	3,640 /38,6 muere			
8 / 4,650 coledocotomia	muere			
9 / 4,125 coledocotomia	muere			

En todos los casos se observa:

- 1/ Pérdida de peso
- 2/ Aumento de la temperatura corporal.
- 3/ Hipotensión que se manifiesta en la dificultad para extraer la sangre arterial y venosa
- 4/En ningún caso la supervivencia es mayor a tres días

Particularmente se observa:

1/De los conejos sometidos a una coledocotomía, los números: 3 y 5 secretan bilis regularmente durante los días del ensayo . El número 1 deja de secretar en el segundo día de postoperatorio y el número 2 se extrae la sonda el primer día de postoperatorio.

2/ De todos los conejos operados, el que sobrevive más tiempo es el número 2 , en el que la secreción biliar alcanza el peritoneo, es por ello y con el fin de tratar de averiguar si existe o no alguna relación entre la supervivencia y la presencia de bilis en la zona peritoneal, a los conejos 8 y 9 se les realiza la coledocotomía sin sondar al exterior el colédoco, sin embargo no se llega a ningún resultado debido a que no sobreviven ni veinticuatro horas tras la operación.

3/Los conejos :4 - 8 - 9 , cuyo peso excede los cuatro kilos , tardan cerca de dos horas en despertar y presentan signos de taquicardia . En todos ellos la dosis normal de anestesia resultó

ser insuficiente y por ello, al conejo número 4 se le inyectó doble dosis y los conejos 8 y 9 despertaron durante la operación y tuvieron que ser anestesiados con eter.

El conejo número 9 presenta taquicardia momentos antes de morir.

4/ El resto de los conejos ensayados, en los que la dosis de anestesia corresponde a la especificada anteriormente, se observa :

-despiertan al cabo de una media hora y presentan una respiración normal.

-pesan menos de cuatro kilos en el momento de la operación.

5/A los conejos números :3 y 5 se les administra por via intramuscular 0.4 ml de solución de monocid (0.04 mg/ml) en clorhidrato de lidocaina, a fin de evitar posibles infecciones que pudiesen ser la causa de la muerte, sin embargo no con ello se alarga la supervivencia ni tampoco se consigue encontrar explicación alguna.

Debido a la pequeña supervivencia postoperatoria es imposible dar las dos formulaciones al mismo conejo, es por ello por lo que se sigue la siguiente pauta de trabajo y previamente a la administración de cualquier forma farmacéutica se toma una muestra de sangre a fin de evaluar los niveles plasmáticos de retinol.

Conejo	Forma de administración /día postoperatorio		
1	cápsula de gelatina	/	20
2	emulsión regenerada	/	20
3	emulsión regenerada	/	20
5	emulsión regenerada	/	20
6	emulsión regenerada	/10 dia	-dosis doble

Es de destacar que en caso del conejo número 6, se administra la emulsión regenerada el primer día de postoperatorio. Se pretende disponer de las mejores condiciones fisiológicas, puesto que se supone, empeoran con el tiempo transcurrido desde la operación y a su vez se administra dosis doble de emulsión regenerada. El motivo de aumentar la dosis se debe a que en los casos anteriores - no se observa fenómenos de absorción que podrían estar justificados por los siguientes motivos:

- Incapacidad de absorción debido al estado fisiológico del conejo.

- Posible necesidad de dosis mayores

- No coincidir el momento de toma de muestra con el de mayor nivel plasmático de vitamina A retinol.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes

MUESTRAS BASALES

=====

Conejo	Area	Ci ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (μg)	Volumen plasmático (ml)	Retinol plasma ($\mu\text{g/dl}$)
1	24854	0,041	2	0,083	0,6	13,9
2	38212	0,064	2	0,128	0,5	25,6
3	30932	0,052	2	0,104	0,2	52,4
5	67723	0,116	2	0,232	0,5	46,4
6	58584	0,098	2	0,196	0,4	49,2

\bar{X} =37,5 cv=44,95% sd=16,85

(Tabla 7-7)

CAPSULAS DE GELATINA BLANDA

=====

Conejo	Area	Ci ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (μg)	Volumen plasmático (ml)	Retinol plasma ($\mu\text{g/dl}$)
1	22900	0,038	1,5	0,0577	0,6	9,6

(Tabla 7-8)

EMULSION REGENERADA
=====

Conejo	Area	Ci ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de dilu. (ml)	Retinol valorado (μg)	Volumen plasmático (ml)	Retinol plasma ($\mu\text{g/dl}$)
2	37957	0,064	2	0,129	0,50	25,8
3	17999	0,030	2	0,060	0,12	50,0
5	52299	0,089	2	0,178	0,40	44,7
6	29388	0,048	2	0,097	0,08	121,5

(tabla 7-9)

1/ Los niveles plasmáticos basales resultan ser inferiores a los obtenidos en conejos sanos . (161)

2/La cápsula de gelatina blanda nó parece absorberse en conejos a los que se les ha realizado una coledocotomia No solo se observa la nó absorción de la vitamina administrada, si no que los niveles plasmáticos se reducen drásticamente en tan - solo seis horas desde 13,6 $\mu\text{g/dl}$ hasta 9,3 $\mu\text{g/dl}$

3/En caso de administrar la emulsión regenerada, en tres de los cuatro conejos ensayados no se detectan signos de absorción ,

pero los niveles plasmáticos de retinol no disminuyen de forma tan considerable.

4/ Es de destacar el hecho que solo en caso del conejo número 6 en el que se administra dosis doble de emulsión regenerada, se observa claramente signos de absorción.

Este último resultado no ha podido corroborarse en otros conejos por haber sido el último operado y por detenerse el estudio hasta averiguar cual es la causa de la pronta defunción .

7.6. CONCLUSIONES

1/ Al administrar a conejos sanos dos formas farmacéuticas diferentes de vitamina A palmitato: cápsulas de gelatina blanda y la emulsión regenerada objeto de estudio, no se han encontrado diferencias significativas en los niveles plasmáticos de retinol.

2/En ambos casos, los niveles aumentan a las seis horas de su administración y se recuperan los valores normales a las veinticuatro horas.

3/El hecho de que el aumento en el retinol plasmático no sea muy considerable en ninguno de los tratamientos, se justifica debido a que al conejo se le mantiene con una dieta ad libitum cuyo aporte vitamínico resulta ser suficiente y por ello no cabe esperar una gran tendencia a la absorción.

4/La coledocotomía y la ligadura de colédoco, resultan ser dos técnicas útiles a la hora de inhibir la secreción biliar en el duodeno, sin embargo no se conoce si existe una relación directa entre la muerte de los animales operados y la ausencia de sales biliares.

5/Los niveles plasmáticos de retinol en conejos operados resultan ser inferiores a los detectados en conejos sanos. La justificación se debe a las reservas hepáticas y al hecho de que la ausencia de bilis impide la absorción de la vitamina A del pienso.

6/El único caso en el que se administró una cápsula de gelatina blanda a un conejo sometido a una coledocotomía, demuestra la incapacidad de absorción de esa forma farmacéutica, puesto que no solo no aumentan los niveles plasmáticos, si no que se detecta una disminución de retinol en plasma

7/De los cuatro conejos operados a los que se les administra la emulsión regenerada, solo uno muestra niveles de absorción considerables y en los otros tres, parecen estabilizarse los valores plasmáticos .

De éstos resultados se deduce que es importante la dosis de emulsión administrada. Un aumento en la dosificación no solo aporta más vitamina si no que a su vez, se dispone de más emulgente que resulta ser el promotor de la absorción .

De ser reproducible y aceptable éste último resultado, la hipótesis de partida quedará justificada y se dispondrá de una formulación capaz de solventar la hipoabsorción de vitamina A en caso de problemas de colestasis .

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES =====

1.- La utilización de técnicas: tensiometría, espectrofotometría, conductimetría, difusión de luz y refractometría, permiten conocer la concentración crítica micelar, imprescindible para fijar las condiciones de emulsificación, así como justificar y complementar los resultados que se obtienen en cada técnica por separado.

El valor de la concentración crítica micelar es de 0,1% de emulgente. Porcentajes superiores, suponen asociaciones moleculares debidas a distintas interacciones, cuantificadas por el segundo coeficiente del virial y que motivan los cambios en la capacidad de difusión de luz y modificaciones observadas en las estructuras químicas.

2.- La liofilización de emulsiones es un proceso tecnológico a tener en cuenta a la hora de evitar la necesidad de incorporar conservantes a sistemas emulsificados e incluso, a su vez, permite disponer de un sistema sólido, estable termodinámicamente desde el punto de vista físico y con capacidad de regenerar la emulsión inicial tras incorporar el agua perdida durante el proceso de liofilización .

3.- Al comparar la emulsión liofilizada y regenerada con el sistema emulsificado inicial, se concluye:

3a/ La viscosidad disminuye al regenerar el sistema liofilizado respecto al valor de viscosidad que presenta la emulsión sin liofilizar, independientemente del momento en que se lleve a cabo el proceso de esterilización, así como el porcentaje de carboximetilcelulosa sódica utilizado .

3b/ En sistemas regenerados, a menos que se utilicen iguales condiciones de regeneración que las empleadas al preparar la emulsión de partida, se obtienen partículas de mayor tamaño y distinta distribución granulométrica.

En sistemas sin liofilizar, el diámetro medio área/volumen de glóbulo de fase interna aumenta al aumentar la temperatura y período de almacenamiento, sin superar los dos micrómetros al cabo de un año a temperaturas: ambiente y 50C.

En sistemas liofilizados, las condiciones de agitación durante el proceso de regeneración: (tiempo y número de revoluciones por minuto), así como la temperatura de almacenamiento, afectan a la granulometría final.

La capacidad de regeneración (en iguales condiciones de agitación) se mantiene a temperatura de 50C durante el primer año de almacenamiento .

3c/ La estabilidad física del sistema emulsificado sin liofilizar, aumenta al disminuir la temperatura de almacenamiento y es mayor que la del sistema regenerado.

3d/ Los sistemas liofilizados incrementan la estabilidad de la vitamina A palmitato, respecto a los sistemas sin liofilizar, tanto más a medida que las condiciones de almacenamiento son más desfavorables (temperatura de 45°C, ausencia de atmósfera inerte, presencia de radiación ultravioleta de 254nm).

Errores superiores a un $\alpha=0,02$, permiten detectar diferencias estadísticamente significativas entre ambos sistemas.

4.- Los niveles plasmáticos de retinol en conejos sanos, a los que se les ha administrado la emulsión regenerada, son significativamente iguales (para un $\alpha =0,05$), a los obtenidos tras administrar cápsulas de gelatina blanda de vitamina A palmitato, de lo que se concluye la eficacia de la formulación ensayada en cuanto a su capacidad de absorción.

5.-De los resultados obtenidos en conejos a los que se les ha sometido a ligadura de colédoco o a una coledocotomía, concluimos: que en el momento en que se consiga fijar las condiciones idóneas a fin de que el animal de experimentación supere el trauma de la operación quirúrgica, se podrá confirmar el dato experimental ya observado, en el cuál se muestra la ventaja del sistema ensayado respecto a las formulaciones comercializadas. La presencia de sales biliares permite la emulsificación e incluso el conejo al

que se le ha realizado una ligadura de colédoco, absorbe la vitamina A palmitato, lo que no ocurre cuando se le administra fórmulas de Vitamina A sin la presencia de sales biliares.

Este resultado hasta ahora alcanzado, apoya la hipótesis de partida: disponer de un sistema eficaz ante una situación de colestasis.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- DANIELSSON H., Mechanisms of bile acid Biosynthesis, in the -
bile acids . 2, P.P.NAIR and KRITCHEVSKY, Eds. Plenum
Press, New York 1973, p.1.
- 2.- RUZICKA, L. Annu Rev.Biochem.42:1-20 (1973).
- 3.- CAREY J.B., Bile salt metabolism in man, in the bile acids2
P.P.NAIR and KRITCHEVSKY, Eds.Plenum Press, New York,1973,p.55.
- 4.- EVA KARIN ANDERBERG.,CHRISTER NYSTRÖN.,PER ARTURSON. Journal
of Pharmaceutical Sciences .84.nº 9 .septiembre (1992).
- 5.- T.NOOK.,E.DOELKER.,P.BURI.Pharm.Acta Helv 62.Nº10-11 (1987)
- 6.- WINNE D.,NAUNYN-SCHMIEDEBERG'S. Arch Pharmacol.307,265 (1979)
- 7.- PALMA.R.,VIDON.N.,HOUIN.G.,PFEIFFER.A.,RONGIER.M.,BARRE.J.,
BERNIER. J.J.Eur.J.Clin.Pharmacol.31:19-325 (1986)
- 8.-ICHIHASHI.T.,KINOSHITA.H.,YAMADA.H. Xenobiotica 21:873-880
(1991a)
- 9.-ICHIHASHI.T.,KINOSHITA.H.,TAKAGISHI.Y.,YAMADA. H.Pharm Res.8
1302-1306 (1991b)
- 10.-TERUHISA ICHIHASHI.,HARUKI KINOSHITA.,YASUSHI TAKAGISHI y HIDEO
YAMADA. J.Pharm.Pharmacol.44:565-569 (1992)
- 11.-PARKPOOM TENGAMNUAY., ASHIM K.MITRA.Pharmaceutical Research
7.Nº2.(1990)
- 12.-S.J.HERSEY.,R.T.JACKSON. Journal of Pharmaceutical sciences
76.Nº12.(1987).

- 13.-GARY P.MARTIN .,CHRISTOPHER MARRIOTT .J.Pharm.Pharmacol.31
754-759 (1981)
- 14.-GARY P.MARTIN.,LINDA M.EL-HARIRI.,CHRISTOPHER MARRIOTT.J.Pharm.
Pharmacol.44:646-650 (1992)
- 15.-LINDA M.EL-HARIRI.,CHRISTOPHER MARRIOTT., GARY P.MARTIN.
J.Pharm.Pharmacol.44:651-654 (1992)
- 16.-JUSKO W.J.,LEVY G.,YAFFE S.J.,ALLENJ.E. Am.J.Dis.Child.121,
48 (1987)
- 17.-SIMMONDS W.J.,Aust. J.Exp.Biol.Med.Sci.50,403(1972)
- 18.-THEODORE R.BATES.,MILO GIBALDI y JOSEPH L.KANIG.Journal of
Pharmaceutical Sciences. 55.nº2 (1966).
- 19.-THEODORE R.BATES.,MILO GIBALDI y JOSEPH L.KANIG.Journal of
Pharmaceutical Sciences. 55.NO9 (1966).
- 20.-CAREY.M.C.,SMALL.D.M.,BLISS.C.M., Annu.Rev.Physiol.45:
651.(1983)
- 21.-KUNIEDA.H.,HANNO.K.,YAMAGUCHI.S.,y SHINODA.K. J.Colloid
Interface Sci.107:129 (1985)
- 22.-HIRONOBU.KUNIEDA.,KAZUO.YAGO.,y KOZO.SHINODA .Journal of
Colloid and Interface Science. 128.nº2.(1989)
- 23.-M.GALLARATE.,F.PATTARINO.,E.MARENGO y M.R.GASCO. S.T.P.Pharma
Sciences 3(5):413-418 (1993).
- 24.-P.SCHURTENBERGER.,R.BERTRAN.,W.KANZIG. Journal of Colloid and
Interface Science . 114.nº1 noviembre (1986).
- 25.-TAPPEINER. A.J.F.H.Wien.Akad.Sitzber.77:281-304 (1978)

- 26.-HOFMANN.A.F.,G.MOLINO.M.MILANESE.,G.BELFORTE. J.Clin.Inves.
71:1003-1022(1983)
- 27.-FERRARIS.R.,G.COLOBATTI.,M.T.FIORENTINI.,R.CAROSSO.,W.AROSSA.,
M.DE LA PIERRE. Dig.Dis.Sci.28:129-136 (1983)
- 28.-FESTI.D.,A.M.M.LABATE.,A.RODA.,F.BAZOLI.,R.FRABBONI.,P.RUCCI.,
F.TARONI.,R.ALDINI.,E.RODA., L.BARBARA. Hepatology.3707-
714 (1983)
- 29.-A.RODA.,A.M.BELLINI.,E.MENCINI.,A.MINUTELLO.,A.FINI y M.GUAR-
NERI. Journal of Pharmaceutical Sciences. 81.nº3.marzo
(1992).
- 30.-MEKHJIAN.H.S.,S.F.PHILLIPS., A.F.HOFMANN. J.Clin.Invest.50
1569-1577 (1971)
- 31.-ADVANCES IN PHARMACEUTICAL SCIENCES.1.(1964)
- 32.-C.CABOS,J.MARIGNAN y E.BOURRET. J.Physique 48:1377-1383
(1987).
- 33.-JEREMY N.NESS.,DEBORAH K.MOTH.Journal of Colloid and Interfa-
ce Sciences 123.nº2.(1988).
- 34.-TORVARD C.LAURENT y HAKAN PERSSON. Biochim.Biophys.Acta,
106:616-624 (1965)
- 35.-BENGT BORGSTROM.Biochim.Biophys Acta,106:171-183.(1965).
- 36.-J.P.KRATOVIL.,W.P.HSU.,M.A.JACOBS.,T.M.AMINABHAVI., Y.MUKUNO-
KI.Colloid & Polymer Sci 261:781-785.(1983).
- 37.-JOAO P.S.CABRAL*., A.R.W.SMITH. Journal of Colloid and
Interface Science. 149.nº1.(1992)

- 38.-KOJI TAMORI.,*KUNIO ESUMI.,*KENJIRO MEGURO.,* HEINZ HOFFMANN.
Journal of Colloid and Interface Sciences. 147.Nº1(1991)
- 39.-M.S.HIPOLITO-REIS .,E A.M.ROQUE DE SILVA. Revista Portuguesa de
Farmacia, XXXVI.nº3.(1986)
- 40.-VOCHTEN.R.,JOOS.P. Chemistry Physics,67:1372-1379,(1968)
- 41.-KIYOSHI SHIMIZU*., MOTOHARU IWATSURU. Chem.Pharm.Bull.38(3)
744-747(1990)
- 42.-KIYOSHI SHIMIZU*., MOTOHARU IWATSURU.Chem.Pharm.Bull.38(5)
1353-1358(1990).
- 43.-ELWORTHY,P.H.,J.Pharm.,Lond.12,293-299(1960).
- 44.-M.VALIENTE Y E.RODENAS.,Anales de Química.Vol 85,192-196(1988)
- 45.-YOSHIKIYO MOROL*., YUJI IZAKI*., MASAHIKO SAITO. Journal of
Colloid and Interface Science . 149.nº2.(1992)
- 46.-JAN JAAP H.NUSSELDER., JAN B.F.N.ENGBERTS. Journal of Colloid
and Interface Science. 148.nº2.(1992)
- 47.-SERGEY M.BEZRUKOV., MARK A.PUSTOVOIT., AUGUSTIN I.SIBILEV.,
Journal of Colloid and Interface Science. 148.nº2.(1992)
- 48.-JOHN H.VAN ZANTEN.,HAROLD G.MONBOUQUETTE. Journal of Colloid
and Interface Sciences. 146.nº2.(1991)
- 49.-T.GONZALEZ-YESTA y A.GALERA GOMEZ.Journal of Colloid and In -
terface Science. 153.nº1.(1992).
- 50.-DIMITER N.PETSEV., NIKOLAI D.DENKOV. Journal of Colloid and
Interface Sciences. 149.nº2(1992)
- 51.-GALERA GOMEZ.P.A.,SIGUENZA PINILLA .C.,y OTERO AENLLE.E. An.
Quím.,77,418 (1981).

- 52.-GALERA GOMEZ.P.A.,SAINZ VILLANUEVA M.C.,SIGUENZA PINILLA.C.,y
OTERO AENLLE.E. An.Quím.,79,694(1983).
- 53.-SHIGEYOSHI MIYAGISHI., MORIE NISHIDA., Journal of Colloid
and Interface Science. 78,n01.(1980)
- 54.-TORBJÖRN WÄRNHEIM.,BJÖRN BERGENSTÄHL.,ULF HENRIKSSON.,ANN-
CHARLOTTE MALMVIK., PEDER NILSSON. Journal of Colloid and
Interface Science. 118.n01(1987).
- 55.-MUKERJEE.P.,MYSELS.K.J., KAPANAN.P. J.Phys.Chem.,71,4166
(1967)
- 56.-P.A.GALERA GOMEZ Y M.BALLESTEROS. Anales de Química .85
197-200(1987).
- 57.-J.COISY.,F.FALSON.,A.M.ORECCHIONI., M.SEILLER 40 Congreso de
Farmacia (1986)
- 58.-COURCHENE W.L.,J.Phys.Chem 68,1870.(1964)
- 59.-PETER MCFADYEN.Circle Reader Service Card n036 (1986)
- 60.-DEPRAETERE (P).,SEILLER(M).,PUISIEUX(F). Sci Techn.Pharm10
55-65 (1981).
- 61.-P.DEPRAETERE et J.M.BOBEE.S.T.P.Pharma 5(67)455-461(1989)
- 62.-LEVESQUE G.,MOITIE V.,BACLE B., DEPRAETERE P. Polymer 24
2271.(1988).
- 63.-T.L.WHATELEY.,G.STEELE.,J.URWIN.,G.A.SMIL. Journal of Clini-
cal and Hospital Pharmacy9.113-126 (1984)
- 64.-F.J.MOLINA LUCAS.,F.HERNANDEZ FORT y S.ENGUIDANOS SANCHIS
Anales de Química . 85 .186-191 (1988)

- 65.-C.WASHINGTON.,K.SHAKESHEFF.,J.ADLER.Int.J.Pharmaceut.66:1-21
(1990).
- 66.-DAVIES.S.S.,SMITH.A.,(1976).Theory and Practice of Emulsion
Technology ,Smith,A.L. ed .,Academic Press,London.
- 67.-M.KOYCHA,M.H.ROCHAT., A.VERAIN. J.Pharm.Belg.,43:413-424
(1988)
- 68.-VINCENT.B.,(1984).Surfactants,Tadros,T.F.ed Academic Press,
London.
- 69.-TAKAMURA.A.,ISHI.F.,NORO., KOISHI.M. Chem Pharm Bull.,31
2786 (1983).
- 70.-HIGGINS.D.M., SKAUNEN.D.M.,J.Pharm.Sci..61,1567 (1972)
- 71.-EBERTH.K., MERRY.J., Int . J.Pharm..14,349 (1983).
- 72.-MERRY.J., EBERTH.K., Int.J.Pharm..19,43 (1984)
- 73.-GRIMES.G.,VERMESS.M.,GALLELLI.J.F.,GIRTON.M., CHATTERJI.D.
C., J.Pharm Sci..68,52 (1979)
- 74.-LAVAL-JEANTET.A.M.,LAVAL-JEANTET.M., BERGOT.C., Invest
Radiol..17,617 (1982).
- 75.-BURNHAN.W.R.,HANSRANI.P.K.,KNOTT.C.E.,COOK.J.A.,DAVIS.,S.S.
Int.J.Pharm.13,9 (1983)
- 76.-J.RASSING., D.ATTWOOD.Int.J.Pharm 13,47-55.(1983)
- 77.-BRUN.A.M.,y WADE.W.H. J.Colloid Interface Sci 139,93-104
(1990)
- 78.-MULLER.B.W., MULLER.R.H., J.Pharm Sci.73,915 (1984)
- 79.-MULLER .B.W., MULLER.R.H., J.Pharm Sci.73,919 (1984)
- 80.-ATTWOOD.O.,DOUGHTY,D.,MOSQUERA,V y PEREZ VILLAR.J.Colloid In-

- terface Sci.141,316-.321 (1991)
- 81.-FRANCISCO ORTEGA GOMEZ.Industria Farmacéutica-julio/agosto
(1991)
- 82.-PHILLIES.G.D.,Anal.Chem.62,pags.1049A-1057A,(1990)
- 83.-McCONNEL.M.L. Anal.Chem.53,pags.1007A-1018A,(1981)
- 84.-N.BOTTAZZINI. Boll.Chim.Farmaceutico - Anno 128 - n^o12
diciembre 1989
- 85.-N.BOTTAZZINI. Boll.Chim.Farmaceutico - Anno 129 -n^o1
enero (1990)
- 86.-PAIVI.JOKELA.,PAUL.D.I.FLETCHER.,ROBERT AVEYARD.,JIAN -RENLU
Journal of Colloid and Interface Science 134n^o 2 febrero
(1990).
- 87.-JULIUS.Z.KNAPP.Journal of Parenteral Science Technology 42
n^o1. (1988).
- 88.-OLIVIER.LUZT.,ZAHIA.MERAIHI.,JEAN-LUC MURA.,ANNY FREY.,GERARD
H.RIESS.,ANDRE C.BAC. Am.J.Clin.Nutr.50:1370-81 (1989).
- 89.- TERENCE ALLEN .Particle Size Measurement.Third edition 1981
- 90.-WHORLOW R.W. Rheology Techniques.Halstged Press,New york
(1980).
- 91.-MARTIN.A.N.,SWARDBTICK.J., CAMMARATA.A. Physical Pharmacy, 3^a
ed.Lea & Febiger, Philadelphia.(1983).
- 92.-YALABIK-KAS H.S. Stability Assesment of Emulsion Systems .S.T
P.Pharma 1:978-984 (1985).
- 93.-SHERMAN P.Industrial Rheology.Academic Press,New York (1970).
- 94.-C.ARNO.GARCIA.,B.ARTALEJO.ORTEGA.,A.BAMIO NUEZ.,M.BARRACO.

- SERRA. Industria Farmaceutica marzo -abril (1992).
- 95.-M.DOLZ-PLANAS.,C.ROLDAN-GARCIA.,J.V.HERRAEZ-DOMINGUEZ.,R.BELDA MAXIMINO. Journal of Pharmaceutical Sciences 80 n^o 1 enero (1991).
- 96.-M.DOLZ PLANAS.,F.GONZALEZ RODRIGUEZ.,R.BELDA MAXIMINO.,V.HERRAEZ-DOMINGUEZ . Journal of Pharmaceutical Sciences 77 n^o 9 , septiembre (1988).
- 97.-ROGER CHERNG-CHYI FU .,DEBORAH M.LIDGATE. Journal of Pharmaceutical Sciences 74 .marzo (1985)
- 98.-ROGER L.SCHNAARE.,RAFIQ.M.SHEIKH.,PAUL J.NIEBERGALL., EDIWIN T.SUGITA. Journal of Pharmaceutical Sciences 65 n^o9,septiembre (1976).
- 99.- METZNER,A.B., J.Rheol.,29,739-775.(1985)
- 100.-GEORGE B.THURSTON .,ALFRED MARTIN. Journal of Parmaceutical Sciences 67.n^o11,noviembre (1987).
- 101.-T.A.IRANLOYE. Arch.Pharm.Chem.Sci. .11:48-60 .ed 1983
- 102.-M.AUVILLAIN.,G.CAVE.,H.FESSI., J.P.DEVISSAGUET. S.T.P.Pharma 5 (11)738-744.(1989)
- 103.-T.A.JENNINGS .Journal of Parenteral Science & Technology. 42 n^o 4/julio-agosto (1988).
- 104.-L.BAUVAL.,G.CAVÉ.,G.COURRAZE.,.BENSOUDA .,F.PUISIEUX.5^{eme}
Congres International de Technologie Pharmaceutique.Paris
(1989)

- 105.-Y.BENSOUDA.,G.CAVÉ.,M.SEILLER.,F.PUISIEUX. Pharm Acta Helv
64 n^o2 (1989)
- 106.-Y.BENSOUDA.,G.CAVÉ.,M.SEILLER.,F.PUISIEUX.Pharm Acta Helv
63 n^o 8 (1988)
- 107.-Y.BENSOUDA. Etude de la cryodessiccation d'une emulsion iodée
L/H injectable pour hepatographie.These de doctorat détat
essiences pharmaceutiques.Univ Paris-Sud,serie E.n^o 240 (1986)
- 108.-Y.BENSOUDA,G.CAVÉ,M.SEILLER et F.PUISIEUX.S.T.P.Pharma 3
(8) 658-663 (1987)
- 109.-Y.BENSOUDA,G.CAVÉ,M.SEILLER et F.PUISIEUX. S.T.P.Pharma 5
(4) 257-261 (1989)
- 110.-Y.BENSOUDA ,M.SEILLER,G.CAVÉ et F.PUISIEUX.4^{eme} Congres In-
ternational de Technologie Pharmaceutique.Paris(1986)
- 111.-Y.BENSOUDA.3^{eme} Congres International APGI ,2.241-50
Paris junio (1983)
- 112.-NEWTON.D.L.,HENDERSON.W.R., SPORN.M.B. Cancer Res.40
3414-3425.(1980).
- 113.-M.C.A. WOOD ., J.H.PLANE .International Journal Pharmaceutics
19,207-213.(1984).
- 114.-ALLWOOD.M.C. Clin.Nutr 1,63-70.(1982).
- 115.-DAVIES.A.,DEANE.G.H.W., DIFFEY.B.L. Nature (Lond),261
169-170. (1976)
- 116.-BERNE B.,ROLLMAN G.,VAHLQUISTA.Photodermatol-Photoimmunol.
Photomed.7(4):146-52.agosto (1982).

- 117.-Chemical Stability of Pharmaceuticals .CONNERS.K.A.,AMIDON.G.L.,
KENNONL.,Wiley.Interscience p.327.
- 118.-A.MARIANI.,R.GUAITOLINI. Boll Chim Farm,114 (1975).
- 119.-GOODMAN.D.S.:Vitamina A metabolism and the liver, biology and
patology,2nd Ed ARIAS.I.M. y col.Eds Raven Press,Nueva Yrok,
467-474.(1988)
- 120.-UNDERWOOD.B.A.:Vitamina A in animal and human nutrition,en The
retinoids,SRRPRON.M.B.,ROBERT.A.B.,GOODMAN.D.S.,Eds.vol.1,capi-
tulo 6,Academic Press,Nueva York.281-392 (1984).
- 121.-HENDRIKS.H.F.J.,BREKELMANS.P.J.A.M.,BUYTENHEK.R.,BROUWER.A.,
DE LEEUW.A.M.,KNOOOK.D.L .Lipids 22 266-273 (1987).
- 122.-MORIWAKI.H.,BLANER.W.S.,PIANTEDOSI.R.,GOODMAN.D.S., J.Lipid
Res 29:1523-1534.(1988).
- 123.-GOODMAN.D.S.,N.Engl.J.Med.,310:1023-1031.(1984)
- 124.-DIGOVANNA.J.J.,PECK.G.L..Vitamin A and the retinoids,en nutri-
tion and the skin,ALAN.R.Liss,Inc.,Nueva York,45-62.(1986).
- 125.-ZACHMAN-RD.,CHEN-XH.J.Nutr 121(2):187-91.febrero (1991).
- 126.-ROCCHI E.,BORGHI-A.,PAOLILLO F.,PRADELLIM.,CASALGRANDI.G.
J.Lab.Clin-Med.118(2):176-85.agpsto (1991).
- 127.-MARIA ANNA LEO.,CHO-IL KIM.,CHARLES LIEBER.J.Nutr 119
993-1000 (1989).
- 128.-ALBERTS DS.,Mc DONALD-L.,EDWARDS L.,PENG YU.,XU MJ.,SLYMEN-
DJ.,EARNEST DL. Cancer-Detect-Prev.13(1):55-64 (1988).
- 129.-ITO.Y.,OCHIAI.J.,SASAKI.R.,SUZUKI.S.,KUSUHARA.Y.,MURIMISU.Y.,
OTANI.M.,Clin-Chim-Acta dec 24;194(2-3):131-44 .(1990)

- 130.-PANTH.M.,YOHN.A.,SIVAKUMAR.B., Y.Exp.Biol. 27:1044-1047
(1989).
- 131.-BAYFIELD.R.F.,COLE.E.R.,Methods Enzymol 67:189-195(1980).
- 132.-BLATZ .P.E.,ESTRADA.A.,Anal Biochem 44:570-573(1972).
- 133.-OLIVER.L.K.,Methods Enzymol76:196-199(1980).
- 134.-GARRY.P.J.,POLLCK.J.D.,OWEN.G.M.Clin.Chem16:766-772(1970)
- 135.-PESCE.A.J.,KAPLAN.L.A.,Eds.Methods in clinical chemistry;Mos-
BY:ST.Louis,chapter 72 (1987).
- 136.-VAN-HAARD.PM.,ENGEL.R.,POSTMA.T.,Biomed-Chromatogr2(2):
79-88.(1987) .
- 137.-KALMAN.DA.,GOODMANN.GE.,OMENN.GS.,BELLAMY.G.,ROLLINS.B.,
Y.Natl.Cancer.Inst. nov;79(5):975-82 (1987).
- 138.-PENG.YM.,XU.MJ.,ALBERTS.DS., Y.Natl,Cancer.Inst. jan;78(1):
95-9 .(1987).
- 139.-MACCREHAN.WA.,SCHONBERG.E., Y.Chromatogr.Jun 5;417(1):65-78
(1987).
- 140.-K.E.SAVOLAINEN.,K.M.PYNNÖNEN.,S.P.LAPINJOKI.,and M.T.VIDGREN.,
Yournal of Pharmaceutical Sciences vol77;n^o 9 september
(1988).
- 141.-SILVIA ALIE.,RAMON DEULOFEU.,ALBERT PARES.,AMERICA GIMENEZ.,
JOAN CABALLERIA.,JOAN RODES.,Rev.Diag.Biol.,38:150-154
(1989).
- 142.-CATIGNANI.G.L.,BIERI.J.G.,Clin Chem 29:708-712 (1983)
- 143.-DRISKELL.W.J.,NEESE.J.W.,BRYANT.C.C .,BASHOR.N.M.,J.Chroma-
togr.231:439-444(1982).

- 144.-BESNER.J.G.,LECLAIRE.R.,BAND.P.R.,J.chromatogr.183:346-351
(1980).
- 145.-DERUYTER.M.G.M.,DELEENHEER.A.P.,Clin Chem 24:1920-1923
(1978).
- 146.-MEJIA.L.A.,ARROYAVE.G. Am.J.Clin.Nutr.37:147-151 (1983).
- 147.-BOLTON S."Pharmaceutical Stastics". M.DEKKER New York cap 9
(1986).
- 148.-WINER B J."Statistical Principles in Experimental Design".
McGRAW HILL .New York cap 3.(1971).
- 149.-Cox. d. r. "Statistical Significance tests Br.14:325-331
(1982).
- 150.-AGUIRRE C.,MATEOS J.,PERAL J.,ALVAREZ T.,GARCIA M.,OVELAR Y.,
Anal.Acad.Med.y Cir.Vall 27.enero (1989).
- 151.-J.DOMERGUE.,J.M.FABRE.,F.GUILLON.,C.H.DESEGUIN.,B.LEPAGE.,C.
ZARAGOZA.,H.BAUMEL.Research in Surgery.3.nº2 julio (1991).
- 152.-A.M.ISMAIL.,S.M.SHALASH.,E.A.KOTBY.,P.R.CHEEKE.,N.M.PATTON.
J.Appl.Rabbit Res 15:985-994.(1992).
153. -A.M.ISMAIL.,S.M.SHALASH.,E.A.KOTBY.,P.R.CHEEKE.,N.M.PATTON.
J.Appl.Rabbit Res 15:1196-1205 (1992).
- 154.-A.M.ISMAIL.,S.M.SHALASH.,E.A.KOTBY.,P.R.CHEEKE.,N.M.PATTON.
J.Appl.Rabbit Res 15:1206-1218 (1992).
- 155.-N.S.SANTOS MAGALHAES.,S.BENITA.,M.SEILLER.J.Pharm Belg.48
3.:211-226 (1993).
- 156.-FONTANI.F.,PRELINI R.,RONCHI M.C.,ZANOTTI GEROSA A. Bolletino
Chimico Farmaceutico 126.(2):66-74 (1987).

- 157.-LECOMPTE D. S.T.P.Pharma 2:843-9 (1982).
- 158.-GARCES J.,MARINE A.,CODOMY R. Ciencia e Industria Farmacéutica 7:182-9 (1988).
- 159.-GARCES J.,MARINE A.,CODOMY R. Ciencia e Industria Farmacéutica 7:373-9 (1988).
- 160.-SEGEL S.CASTELLANN.J."Non Parametric Statistics for the Behavioural Sciences" 2nd Ed Mc GRAW-HILL .New York (1988).
- 161.-P.MORATA.,J.D.COLMENERO.,A.ALONSO.,M.GARCIA CABALLERO.Revista Española De Fisiologia 46(3):273-278 (1990).

Presidente:

Dr. Manuel Guzmán Amel

Vocales:

Dr. Agustín SERRA MARTÍN

Dr. Ramón ZARBOZA GARCÍA

Dr. Alejandro GUZMÁN Barco

Secretario:

Dr. José Luis López Gacón

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al
marzo se expresa, para juzgar este teale doctoral,
acordó por Unan. m. i. d. d. calificarla

de APTO. con LAUDE

Madrid, 22 de Febrero de 1934

El Secretario del Tribunal: