



# Estudi de la formació de nanopartícules polimèriques obtingudes a partir de nanoemulsions de fase externa aquosa i associació d'antiinflamatoris no esteroïdals

Genoveva Morral Ruíz

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FISICOQUÍMICA

**ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE NANOPARTÍCULES  
POLIMÈRIQUES OBTINGUDES A PARTIR DE NANO-  
EMULSIONS DE FASE EXTERNA AQUOSA I  
ASSOCIACIÓ D'ANTIINFLAMATORIS NO  
ESTEROÏDALS**

Genoveva Morral Ruíz, 2011

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE FARMÀCIA  
DEPARTAMENT DE FISICOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORAT INTERDEPARTAMENTAL  
“MEDICAMENTS, ALIMENTACIÓ I SALUT”

BIENNI 2002-2004

ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES  
OBTINGUDES A PARTIR DE NANO-EMULSIONS DE FASE EXTERNA AQUOSA  
I ASSOCIACIÓ D’ANTIINFLAMATORIS NO ESTEROÏDALS

Memòria presentada per Genoveva Morral Ruíz per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Maria José García Celma

María Luisa García López

Conxita Solans Marsà

Genoveva Morral Ruíz

Genoveva Morral Ruíz, 2011

# ÍNDIX

<b>1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Nano-emulsions .....</b>	<b>3</b>
1.1.1. Definició i propietats .....	3
1.1.2. Formació de nano-emulsions.....	4
1.1.2.1. Mètodes d'alta energia o de dispersió.....	5
1.1.2.2. Mètodes de baixa energia o de condensació.....	6
1.1.3. Mecanismes de desestabilització de les nano-emulsions.....	10
1.1.3.1. Coalescència .....	12
1.1.3.2. Maduració d'Ostwald .....	13
1.1.4. Aplicacions de les nano-emulsions .....	15
1.1.4.1. Aplicacions farmacèutiques de les nano-emulsions .....	15
1.1.4.2. Aplicacions químiques de les nano-emulsions .....	26
<b>1.2 Nanopartícules .....</b>	<b>27</b>
1.2.1. Definició i propietats .....	27
1.2.2. Preparació de nanopartícules .....	28
1.2.2.1. Nanopartícules preparades a partir de polímers preformats .....	28
1.2.2.2. Nanopartícules preparades per polimerització "in situ" .....	34
1.2.3. Nanopartícules de polialquilcianoacrilat .....	44
1.2.4. Nanopartícules de poliuretà i poliurea .....	47
1.2.5. Nanopartícules d'administració controlada de fàrmacs amb marcadors de superfície.....	52
<b>2. OBJECTIUS .....</b>	<b>57</b>

<b>3. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>63</b>
<b>3.1. Materials .....</b>	<b>63</b>
3.1.1. Principi actiu.....	63
3.1.2. Excipients .....	64
3.1.2.1. Tensioactius.....	64
3.1.2.2. Co-tensioactius .....	70
3.1.2.3. Components oliosos .....	71
3.1.2.4. Components aquosos .....	73
3.1.2.5. Biomaterials .....	73
3.1.2.6. Monòmers .....	76
3.1.3. Solucions per anàlisis .....	78
3.1.3.1. Solució reguladora de pH .....	78
3.1.3.2. Fase mòbil per l'anàlisi cromatogràfic del ketoprofèn.....	78
<b>3.2. Instrumental.....</b>	<b>79</b>
<b>3.3. Mètodes.....</b>	<b>82</b>
3.3.1. Elaboració de diagrames de fases ternaris i pseudoternaris a 25°C.....	82
3.3.2. Preparació de nano-emulsions.....	83
3.3.3. Elaboració de nanopartícules a partir de nano-emulsions O/W.....	85
3.3.3.1. Nanopartícules de polialquilcianoacrilats (PACA).....	85
3.3.3.2. Preparació de nanopartícules de poliuretà i poliurea.....	86
3.3.4. Disseny experimental.....	88
3.3.5. Mètodes de caracterització.....	89
3.3.5.1. Espectroscòpia de correlació fotònica (Dynamic Light Scattering, DLS).....	90
3.3.5.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	92
3.3.5.3. Microscòpia confocal.....	94
3.3.5.4. Microscòpia de força atòmica (AFM).....	95
3.3.5.5. Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier(FT-IR) .....	97

3.3.6. Estudis d'estabilitat de les nano-emulsions i les nanopartícules .....	99
3.3.6.1. Ultracentrifugació.....	100
3.3.6.2. Liofilització.....	100
3.3.7. Solubilització de ketoprofèn en nano-emulsions i nanopartícules seleccionades....	101
3.3.8. Eficiència d'encapsulació.....	103
3.3.9. Estudis de cessió <i>in vitro</i> .....	105
3.3.10. Efecte de les nano-emulsions O/W seleccionades sobre la pell <i>in vivo</i> .....	106
3.3.11. Permeació cutània <i>ex vivo</i> .....	109
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ.....</b>	<b>115</b>
<b>4.1. Nano-emulsions.....</b>	<b>115</b>
4.1.1. Selecció de components i de sistemes aigua/tensioactiu/component oliós per a la formació de nano-emulsions.....	115
4.1.2. Comportament fàsic.....	116
4.1.2.1. Sistemes amb Tween 80 com a tensioactiu.....	117
4.1.2.2. Sistemes amb Cremophor EL com a tensioactiu.....	127
4.1.3. Preparació de nano-emulsions per diferents mètodes d'emulsificació i caracterització per espectroscòpia de correlació fotònica .....	134
4.1.3.1. Influència de variables de composició en la mida de gota de les nano-emulsions.....	147
4.1.4. Estudis d'estabilitat.....	169
4.1.5. Incorporació de ketoprofèn en nano-emulsions.....	176
4.1.5.1. Estudis d'estabilitat en composicions amb el principi actiu incorporat.....	183
4.1.6. Estudi de l'aplicació de nano-emulsions O/W com a sistemes d'administració de fàrmacs per via cutània i transdèrmica.....	184
4.1.6.1. Efecte de les nano-emulsions sobre la pell <i>in vivo</i> .....	185
4.1.6.2. Permeació cutània <i>ex vivo</i> .....	188
4.1.6.3. Estudis de cessió del ketoprofèn.....	195

4.1.7. Resum de la formació i caracterització de nano-emulsions.....	197
<b>4.2. Nanopartícules a partir de nano-emulsions.....</b>	<b>204</b>
4.2.1. Estudis preliminars: Nanopartícules de poli-alquilcianoacrilat (PACA) .....	205
4.2.2. Nanopartícules de poliuretà (PU) i poliurea (PUR).....	223
4.2.2.1. Mecanisme de polimerització proposat i partícules obtingudes.....	224
4.2.2.2. Preparació de nanopartícules de poliuretà (PU).....	229
4.2.2.3. Preparació de nanopartícules de poliuretà amb polietilenglicol (PU PEG)..	234
4.2.2.3.1. Influència de la concentració d'IPDI/ PEG 400 (1:1).....	237
4.2.2.3.2. Influència del pes molecular del PEG .....	244
4.2.2.3.3. Influència de la temperatura.....	245
4.2.2.3.4. Influència de la concentració O/T.....	249
4.2.2.4. Preparació de nanopartícules de poliurea amb lisina (PUR lys).....	251
4.2.2.4.1. Influència de la concentració d'IPDI/lys (2:1).....	255
4.2.2.4.2. Influència de la temperatura .....	257
4.2.2.4.3. Influència de la concentració O/T .....	258
4.2.2.5. Preparació de nanopartícules de PUR amb biotina i estreptavidina (PUR biot i PUR strep).....	260
4.2.2.6. Estabilitat de les nanopartícules .....	263
4.2.2.7. Caracterització estructural de les nanopartícules.....	269
4.2.2.7.1. Caracterització de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep mitjançant FT- IR.....	269
4.2.2.7.2. Caracterització de les nanopartícules obtingudes per TEM.....	271
4.2.2.7.3. Caracterització de les nanopartícules obtingudes per microscopia de forces atòmiques (AFM).....	277
4.2.2.7.4. Caracterització de les nanopartícules de biotina amb Microscòpia Confocal.....	288

## **ABREVIATURES**

AFM: Microscòpia de Força Atòmica

BCA: Butilacianoacrilat

biot: Biotina

CEL: Cremophor EL

DLS: Dynamic Light Scattering

FT-IR: Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier

iBCA: Isobutilcianoacrilat

IPDI: Diisocianat d'isoforona

lys: L-Lisina

NE: Nano-emulsió

NP: Nanopartícules

O: Oli

O/T: Oli/tensioactiu

PACA: Polialquilcianoacrilat

PBCA: Polibutilcianoacrilat

PEG: Polietilenglicol

PiBCA: Poli-isobutilcianoacrilat

PCL: Poliepsilon-caprolactona

PLA: Polilàctic

PLGA: Polilàctic- glicòlic

PU: Poliuretà

PU PEG: Nanopartícules de poliuretà amb polietilenglicol

PUR: Poliurea

PUR biot: Nanopartícules de poliurea amb biotina

PUR lys: Nanopartícules de poliurea amb lisina



PUR strep: Nanopartícules de poliurea amb estreptavidina

strep: Estreptavidina

T: Tensioactiu

TEWL: Pèrdua d'aigua transepidermica

TEM: Microscòpia Electrònica de Transmissió

W: Aigua

## **1. INTRODUCCIÓ**

---

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. NANO-EMULSIONS

### 1.1.1. Definició i propietats

Les nano-emulsions (Figura 1.1) són sistemes heterogenis constituïts per dos líquids immiscibles entre si, un dels quals (fase interna, dispersa o discontinua) es troba dispers en l'altre (fase externa, dispersant o contínua) en forma de gotes molt petites de mida compresa entre 20 i 200 nm estabilitzades per la presència d'un o més components tensioactius (Solans, 2003, 2005). Quan la fase externa està constituïda per aigua s'anomenen nano-emulsions d'oli en aigua (O/W) mentre que si aquesta està formada per oli s'anomenen nano-emulsions del tipus aigua en oli (W/O). La formació d'aquests sistemes implica un increment extraordinari de l'àrea interfacial i això fa que sigui un procés energèticament desfavorable. Per tant, són sistemes termodinàmicament inestables i requereixen l'aplicació d'energia per a la seva formació. Aparentment, són transparents o translúcids, presenten homogeneïtat macroscòpica i isotropia òptica i poden tenir una elevada estabilitat cinètica. En ser sistemes en no equilibri, les seves propietats són dependents del mètode de preparació (Solans, 2003, 2005).

D'acord amb aquestes característiques, les nano-emulsions posseeixen una mida de gota suficientment petita com per no presentar el fenomen de sedimentació o cremat.



**Figura 1.1:** Aspecte visual de les nano-emulsions

La denominació nano-emulsió no ha estat introduïda fins els darrers anys per a designar aquest tipus de composicions i a la literatura científica han rebut diferents noms, com miniemulsions (Ugelstad, 1973; El-Aasser i Miller, 1984; Miñana-Pérez 1999; Lansfester, 2001), emulsions submicromètriques (Benita i Levi, 1993; Snitzowska, 2001) i emulsions ultrafines (Nakajima, 1993, 1997)

Tot i que el nom de nano-emulsió indueix a associar-les amb les microemulsions, existeixen diferències importants entre ambdues dispersions.

- Les microemulsions tenen formació espontània en posar en contacte els seus components mentre que les nano-emulsions requereixen l'aplicació d'energia ja sigui tèrmica o mecànica, ja que són sistemes termodinàmicament inestables.
- Les nano-emulsions presenten sempre discontinuïtat microscòpica mentre que les fases que constitueixen la microemulsió poden ser contínues.
- Quan es sotmeten a un seguit de cicles de congelació i escalfament les microemulsions es diferencien de les nano-emulsions en la capacitat de recuperar el seu estat inicial quan es retorna a les condicions inicials mentre que les nano-emulsions experimenten un procés irreversible de separació de fases.
- Les microemulsions requereixen normalment concentracions més elevades de tensioactiu que les nano-emulsions per a la seva formació.

Malgrat aquestes diferències les microemulsions i les nano-emulsions, presenten isotropia òptica, són transparents o translúcides i el rang de mida de gota és semblant per ambdues dispersions col·loïdals.

### **1.1.2. Formació de nano-emulsions**

La formació de nano-emulsions és un procés complex que implica la generació i estabilització de noves interfícies oli-aigua. En aquest sentit, la presència de components tensioactius juga un paper clau ja que al ser molècules amfifíliques disminueixen la tensió interfacial promovent la formació de noves gotes i estabilitzant-les enfront els fenòmens de coalescència (Walstra, 1996; Malmsten, 2002). Durant el procés d'emulsificació, les molècules tensioactives generen un gradient de tensió interfacial que ve determinat per l'elasticitat "dilacional" o elasticitat de Gibbs ( $\epsilon$ ) i que depèn de la

tensió interfacial ( $\gamma$ ) i de l'àrea interfacial (A) tal com s'expressa a la següent equació (Walstra i Smulders, 1998; Tadros, 2009):

$$\varepsilon = \frac{d\gamma}{d(\ln A)}$$

D'acord amb el gradient de tensió interfacial, les molècules de tensioactiu tendiran a difondre cap a aquelles regions on la tensió interfacial és més elevada generant-se un flux que comporta un desplaçament de part del líquid contingut en la fase dispersa. Aquest fenomen es coneix amb el nom d'efecte Marangoni i és especialment important ja que explicaria la formació de noves gotes de la fase interna. Per altra banda, l'efecte Marangoni també estaria implicat en els processos d'estabilització que eviten que s'esdevinguin fenòmens de coalescència durant l'emulsificació (Walstra i Smulders, 1998; Tadros, 2009).

Com ja s'ha esmentat anteriorment, les emulsions són sistemes termodinàmicament inestables i per tant, la seva formació requereix l'aplicació d'energia. Aquesta energia pot provenir de fonts externes o bé de l'energia química emmagatzemada en el sistema. Considerant la font d'energia, els mètodes de preparació d'emulsions es poden classificar en mètodes de dispersió o alta energia (l'energia prové de fonts externes) i mètodes de condensació o de baixa energia (s'aprofita l'energia interna del sistema per a la formació de les gotes de l'emulsió) (Anton, 2008).

Altres aspectes importants a considerar en la formació de nano-emulsions són l'ordre i velocitat d'incorporació dels components així com també la velocitat d'homogeneïtzació i la temperatura de formació.

#### **1.1.2.1. Mètodes d'alta energia o de dispersió**

Es caracteritzen per requerir l'aplicació d'una energia mecànica de cisalla. Per a preparar nano-emulsions pels mètodes d'emulsificació d'alta energia s'utilitzen agitadors d'elevada velocitat, ultrasons i homogeneïtzadors d'alta pressió (Walstra, 1996; Anton, 2008).

El mecanisme de formació de nano-emulsions mitjançant ultrasons es basa en l'aplicació de diferents cicles de depressió-compressió que generen bombolles de cavitació, les quals tendeixen a implosionar alliberant la suficient energia com per a que pugui incrementar-se l'àrea interfacial (Anton, 2008). Per mitjà de l'aplicació d'ultrasons s'han descrit nano-emulsions amb una mida de gota compresa entre 40 i 300 nm (Abismaïl,

1999; Antonietti i Landfester, 2002; Kentish, 2007; Gaudin i Sintès-Zydowicz, 2008; Leong, 2009).

Els homogeneïtzadors d'alta pressió són els equips més utilitzats per a la preparació de nano-emulsions a escala industrial. En aquests equips, la formació de les gotes de nano-emulsió s'esdevé com a conseqüència del pas d'una emulsió prèviament formada a través d'uns microcanals quan s'aplica una elevada pressió. En els microcanals, els fluids s'acceleren dramàticament creant-se zones de turbulència que trenquen la fase dispersa en gotes de mida petita i uniforme (Anton, 2008).

En aquests processos, durant l'emulsificació es pot produir deformació i trencament de les gotes inicials de l'emulsió, adsorció de les molècules de tensioactiu a les interfícies i fenòmens de col·lisió entre les gotes que afavoreixen la formació de gotes dins del rang nanomètric (Anton, 2008). Per a que es produeixi un trencament de les gotes d'una emulsió es requereix l'aplicació d'una força de deformació superior a la pressió de Laplace que actua impedit la deformació de les gotes.

$$P_L = \gamma \left[ (1/r^1) + (1/r^2) \right]$$

on  $P_L$  és la pressió de Laplace (diferència de pressió entre l'interior i l'exterior de la gota),  $\gamma$  és la tensió interfacial i  $r^1$  i  $r^2$  el radi de curvatura més petit i més gran respectivament per a una gota d'emulsió deformada (Walstra i Smulders, 1998; Tadros, 2009).

D'acord amb aquest equació com més petita sigui la mida de gota del sistema, s'haurà d'aplicar més energia per a la seva formació o incrementar la concentració de tensioactiu per tal de disminuir la tensió interfacial. Per tant, les nano-emulsions, per les seves característiques, requeriran l'aplicació de molta energia per a la seva formació encarint molt tot el procés d'obtenció. Per aquest motiu els mètodes de condensació que es basen en la utilització de les propietats fisicoquímiques dels sistemes són una alternativa útil ja que es poden preparar nano-emulsions quasi espontàniament (Lee i Tadros, 1982; Rang i Miller, 1999; Forgiarini, 2001; Izquierdo 2002; Morales, 2003; Uson 2004; Sadurní, 2005).

### **1.1.2.2. Mètodes de baixa energia o de condensació**

Els mètodes de baixa energia consisteixen en l'aprofitament de les transicions de fases que es produeixen durant el procés d'emulsificació utilitzant l'energia química procedent

dels diferents components (Shinoda i Saito, 1968; Nakajima, 1997). Aquesta energia química pot provenir dels canvis de curvatura espontània de la pel·lícula de tensioactiu i de canvis en les forces d'enllaç entre ions i molècules entre d'altres. Per tant, mitjançant modificacions de la temperatura i/o de la composició del sistema s'esdevindria aquesta transició de fases i en conseqüència podrien formar-se nano-emulsions. De fet, existeixen dos mètodes d'emulsificació de baixa energia: canvi de composició a temperatura constant i canvi de temperatura a composició constant. Ambdós mètodes requereixen el coneixement del comportament fàsic del sistema.

### ***Emulsificació per canvi de composició a temperatura constant***

Aquest mètode implica l'estudi previ del comportament fàsic del sistema a temperatura constant. Tal com s'observa al diagrama de fases de la Fig 1.2, per a sistemes model del tipus aigua/ tensioactiu/ component oliós (veure Fig.1.2) les composicions amb elevats continguts d'aigua o d'oli, per a concentracions baixes de tensioactiu, correspondrien a solucions micel·lars o microemulsions directes i inverses respectivament, capaces de solubilitzar petites quantitats del component de naturalesa oposada (aigua o oli). Aquestes estructures es formen com a conseqüència de la capacitat d'autoagregació de les molècules de tensioactiu. A mesura que s'incrementa la concentració de tensioactiu, les micel·les, en principi esfèriques, poden adoptar una estructura de tipus cilíndric ja sigui directa (el solvent polar constitueix la fase externa i les molècules de tensioactiu presenten una curvatura positiva) o inversa (el solvent apolar forma la fase contínua i la curvatura és negativa)(Rosevear, 1968; Holmerg, 2003).

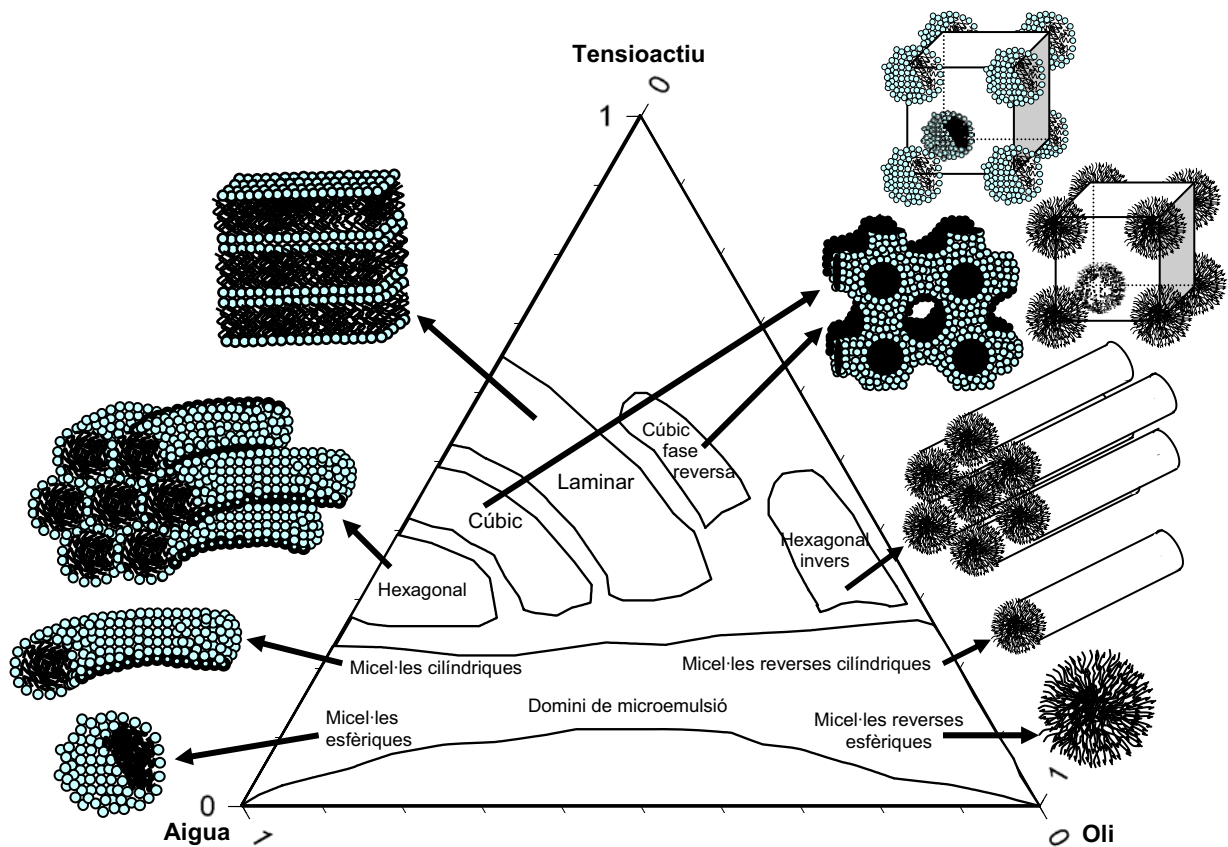
Quan les concentracions d'aigua i oli s'equiparen, poden aparèixer estructures bicontínues constituïdes per bicapes planes de molècules de tensioactiu de curvatura zero que separen els dominis aquosos dels oliosos (microemulsió bicontínua, cristall líquid laminar). En aquesta zona del diagrama ternari l'addició d' aigua o oli provoca la curvatura positiva o negativa de les molècules de tensioactiu donant lloc respectivament a la formació d'estructura directes o inverses.

A concentracions elevades de tensioactiu, les estructures micel·lars interaccionen entre elles, formant-se en aquestes regions cristalls líquids. Per a concentracions elevades de tensioactiu i quantitats equivalents d'aigua i oli es poden formar estructures de cristall líquid laminar. Els cristalls líquids laminars estan constituïts per bicapes de tensioactiu alternades amb capes d'aigua disposant-se la fase oliosa en el domini apolar format per les molècules de tensioactiu. Presenten una consistència semi-líquida i són lleugerament

translúcids i òpticament anisòtrops. Es poden identificar fàcilment mitjançant microscòpia òptica amb llum polaritzada observant-se una estructura en forma de mosaic o xarxa plana i per espectrofotometria de dispersió de raigs X (Rosevear, 1968; Holmerg, 2003).

En addicionar aigua o oli a aquestes composicions es pot formar una estructura tridimensional que limita notablement el moviment produint un augment considerable de la viscositat que rep el nom de cristall líquid cúbic. Els cristalls líquids cúbics són transparents i isòtrops i únicament es poden identificar per raigs X (Holmerg, 2003).

Si es continua incorporant aigua o oli es poden formar estructures directes o inverses conegudes com cristalls líquids hexagonals on les molècules de tensioactiu es disposen en agregats cilíndrics orientats hexagonalment en el medi continu. Confereixen viscositat i són transparents i anisòtrops. En ser observats per microscòpia òptica amb llum polaritzada s'identifiquen per l'estructura en forma angular que presenten (Rosevear, 1968; Holmerg, 2003).



**Fig 1.2:** Comportament fàsic a temperatura constant d'un sistema model de tipus aigua/tensioactiu no iònic/ component oliós.



El procés de formació de nano-emulsions a partir de les transicions de fases que tenen lloc durant el procés d'emulsificació mantenint la temperatura constant ha estat àmpliament estudiat (Sagitani, 1981, 1991; Rang i Miller, 1999; Forgiarini, 2001; Uson, 2003; Sadurní, 2005; Liu, 2006; Pey, 2006; Solè, 2006; Porras, 2008; Yang, 2009). Mitjançant aquest mètode s'ha descrit tant la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa (Forgiarini, 2001; Sadurní, 2005; Liu, 2006) com de fase externa oliosa (Uson, 2003; Porras, 2008) amb un diàmetre de gota inferior als 200 nm en sistemes aigua/tensioactiu no iònic/component oliós. Solè et al. (2006) van estudiar la formació de nano-emulsions O/W en sistemes amb tensioactius iònics i van obtenir composicions amb un diàmetre de gota de l'ordre dels 20 nm, valor molt més petit que el de la corresponent mida de gota quan les mescles es preparaven per mètodes d'alta energia. En tots aquests estudis, les composicions es van formar a partir de l'addició successiva del component aquós o oliós a les mescles binàries oli/tensioactiu o aigua/tensioactiu respectivament. En els estudis més recents (Forgiarini, 2001; Uson, 2003; Sadurní, 2005; Solè, 2006) es va trobar que durant el procés d'emulsificació és d'especial importància que s'esdevinguin canvis en la curvatura natural del tensioactiu per a obtenir emulsions amb una mida de gota molt petita i uniforme. En aquests treballs la formació d'estructures de cristall líquid laminar, estructures bicontínues de microemulsió o estructures de cristall líquid cúbic durant el procés d'emulsificació ha estat rellevant per a aconseguir la formació de nano-emulsions amb una petit diàmetre de gota.

### ***Emulsificació per canvi de temperatura a composició constant***

Aquest mètode es coneix com a mètode PIT (Phase Inversion Temperature) i va ser introduït per Shinoda i Saito (1968). Es basa en els canvis de solubilitat que presenten els tensioactius no iònics polioxietilenats en modificar la temperatura.

En sistemes aigua/tensioactiu no iònic etoxilat/component oliós, a temperatures baixes, les molècules de tensioactiu són solubles en medi aquós i presenten curvatura positiva donant lloc a solucions micel·lars directes o microemulsions O/W que poden coexistir amb un excés d'oli. A mesura que s'incrementa la temperatura, les cadenes de polioxietilè es comencen a deshidratar i per a un determinat valor s'assoleix el balanç hidròfil-lipòfil i el tensioactiu és tan soluble en aigua com en la fase apolar, formant-se estructures bicontínues (curvatura de la molècula de tensioactiu molt propera a zero) que poden coexistir amb un excés de fase aquosa o oliosa. Aquest valor de temperatura rep el

nom de temperatura d'inversió de fases o temperatura HLB o PIT (Phase Inversion Temperature) (Shinoda i Saito, 1968, Shinoda i Kunieda, 1973; Kunieda i Shinoda, 1985) i es caracteritza perquè les propietats hidrofíliques i lipofíliques del tensioactiu estan equilibrades. La temperatura HLB és una propietat que depèn de la composició del sistema. Si es sobrepassa aquesta temperatura HLB, el tensioactiu és més soluble en la fase oliosa, la curvatura espontània esdevé negativa i es formen solucions micel·lars inverses o microemulsions W/O que coexisteixen amb un excés d'aigua.

El mètode PIT es beneficia dels valors pròxims a zero de la tensió interfacial entre l'aigua i l'oli que s'assoleixen a la temperatura HLB (Shinoda, 1981; Kunieda i Shinoda, 1985; Bourrel i Schechter, 1988) i afavoreix l'emulsificació aplicant baixa energia (es refreden o s'escalfen a 25-30°C emulsions preparades a la temperatura HLB) per a obtenir estructures O/W o W/O amb una mida de gota molt petita i índex de polidispersió baixos (Marszall, 1987; Förster, 1995).

En els últims anys, diversos autors han descrit la formació de nano-emulsions O/W amb una mida de gota molt petita ( $\leq 80$  nm) mitjançant el mètode PIT (Morales, 2003; Izquierdo, 2004, Anton, 2007; Lin Ee, 2008).

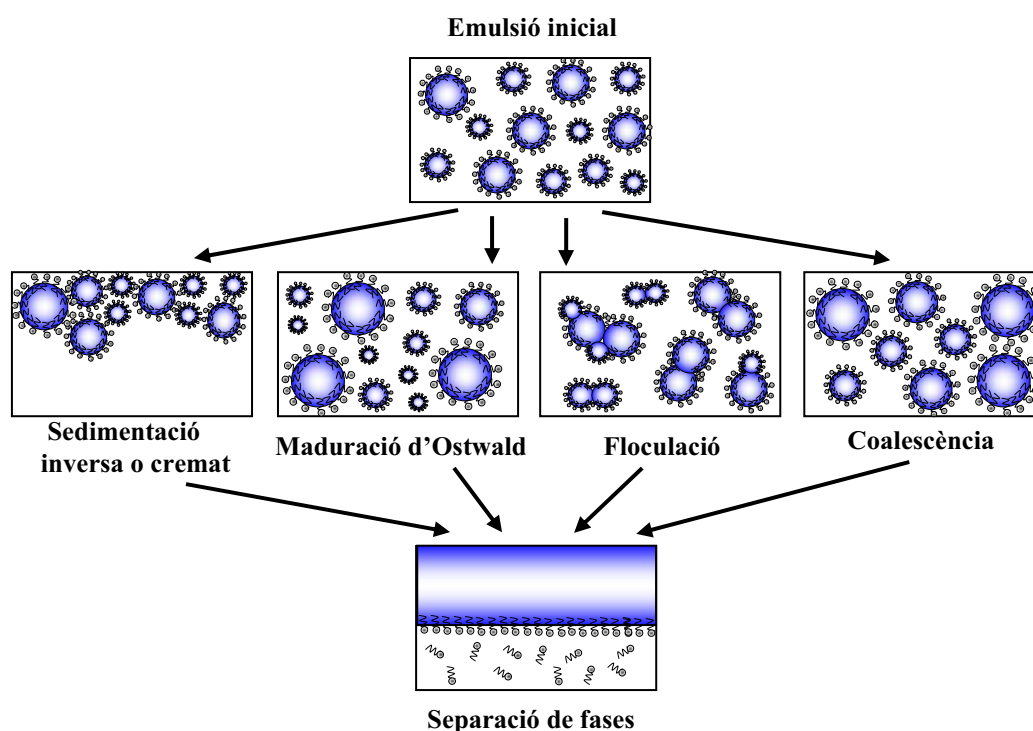
En els estudis de Morales et al. (2003) es va aconseguir la formació de nano-emulsions O/W amb un diàmetre de gota de 40 nm en el sistema aigua/C16E6/oli mineral. En aquest treball es va observar que, per tal d'obtenir un mínim diàmetre de gota, el component oliós i el tensioactiu havien d'estar solubilitzats en una fase de microemulsió abans de refredar el sistema a 40°C per sota de la temperatura HLB.

Izquierdo et al. (2004) van obtenir nano-emulsions amb una mida compresa entre 29 i 80 nm per a composicions amb un 20% en pes de component oliós i concentracions de tensioactiu entre el 3% i el 7% del sistema aigua/ C12E4/ isohexadecà. L'obtenció de nano-emulsions amb el menor diàmetre possible requeria la formació prèvia d'una fase de microemulsió bicontínua o bé de fases de microemulsió i cristall líquid laminar.

### **1.1.3. Mecanismes de desestabilització de les nano-emulsions**

Les nano-emulsions malgrat que poden presentar una elevada estabilitat cinètica són sistemes termodinàmicament inestables que tendeixen a separar-se en fases. A la Fig. 1.3 es troben representats els mecanismes de desestabilització de les emulsions (sedimentació o cremat, maduració d'Ostwald, floculació i coalescència). En les nano-emulsions, el principal mecanisme pel qual les gotes de la fase dispersa es

desestabilitzen és la maduració d'Ostwald (Taylor i Ottewill, 1994; Katsumoto, 2000; Izquierdo, 2002; Tadros, 2004). El procés de coalescència també tindria una certa rellevància entre els mecanismes que indueixen a la inestabilitat de les nano-emulsions tot i que pot prevenir-se mitjançant la incorporació d'elevades concentracions de tensioactiu (veure capítol 1.1.3.1). Aquests dos processos no són excloents i podrien esdevenir-se conjuntament (Urbina-Villalba, 2009). Pel que fa a la sedimentació i a la floculació pràcticament no influïrien en l'estabilitat d'aquestes composicions.



**Fig. 1.3:** Mecanismes d'inestabilitat de les emulsions. La sedimentació o cremat i la floculació són processos reversibles, mentre que la maduració d'Ostwald i la coalescència corresponen a mecanismes irreversibles.

El procés de sedimentació o cremat es produeix com a conseqüència de les diferències entre la densitat de la fase dispersa i de la fase contínua i es manifesta amb una migració de les gotes induïda per l'acció de la gravetat (Binks, 1998; Tadros, 2009). En les nano-emulsions, el moviment brownià manté les gotes en continu moviment de tal manera que la velocitat de difusió és superior a la velocitat de cremat i per tant, no es produiria sedimentació de les gotes.

La floculació consisteix en l'agregació de les gotes sense que tingui lloc el trencament de la pel·lícula interfacial (Verwey i Overweek, 1948; Binks, 1998). Si les forces d'interacció entre les gotes (forces de tipus Van der Waals) són suficientment elevades aquest procés pot arribar a ser pràcticament irreversible. A diferència del que podria

succeir en les emulsions convencionals (McClements, 1994), en les nano-emulsions estabilitzades amb tensioactius no iònics, quan el diàmetre de gota es suficientment petit com per a minimitzar les forces d'atracció de Van der Waals i s'incorpora una concentració prou elevada de tensioactiu capaç de formar una pel·lícula interfacial amb un cert grau d'espessor al voltant de les gotes (Gennes, 1987), difícilment podrà desencadenar-se un procés de flocculació (Solans, 2003).

### **1.1.3.1. Coalescència**

La coalescència consisteix en la fusió de dues o més gotes de la fase dispersa per a formar una única gota d'una mida superior en trencar-se la pel·lícula interfacial de tensioactiu. És un procés irreversible que es produeix en col·lisionar les interfícies entre si quan la distància entre les gotes esdevé més petita que el seu radi, iniciant-se així la seva deformació (Walstra, 1996; Deminiere, 1998). D'acord amb la teoria de Kabalnov-Wennerström (Kabalnov, 1998) la coalescència podria explicar-se per la presència de fluctuacions tèrmiques que podrien generar un petit trencament en la pel·lícula interfacial que separa les gotes. Si aquest trencament progressa al llarg de la interfície, es produirà la fusió de les gotes i per tant la coalescència. Aquest model assumeix que prèviament a la coalescència ha de produir-se flocculació en les gotes deformables.

Diversos autors (Taylor i Ottewill, 1994; Rang i Miller, 1999) han posat de manifest que les nano-emulsions poden ser estables enfront la coalescència quan s'incorpora en el sistema la concentració de tensioactiu necessària per a formar estructures de cristall líquid que podrien adsorbir-se a la interfície de les gotes recobrint-les amb una pel·lícula multilaminar. En els estudis de Sing et al. (1999) es va observar que la velocitat de coalescència disminuïa considerablement quan s'empraven tensioactius amb un elevat pes molecular. Katsumoto et al. (2000) van postular que les gotes de nano-emulsió podien considerar-se com a esferes rígides i per tant serien difícilment deformables. Una densa capa de tensioactiu adsorbit a la interfície actuaria impedit la deformació evitant que es produïssin alteracions en la pel·lícula interfacial i així es podria prevenir la coalescència.

En emulsions concentrades, la coalescència es pot explicar per l'equació descrita per Deminiere (1998):

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - 8\pi/3 \cdot \omega t$$

on  $r$  és el radi de les gotes,  $r_0$  el radi a  $t=0$ ,  $t$  és el temps i  $\omega$  és la freqüència de trencament de la pel·lícula interfacial per unitat d'àrea. D'acord amb aquesta equació es pot predir una relació lineal entre  $1/r^2$  i el temps.

### 1.1.3.2. Maduració d'Ostwald

La maduració d'Ostwald és un procés irreversible que es produeix com a conseqüència de la diferència de solubilitat induïda per la diversificació de la mida de les gotes presents en l'emulsió. En partícules esfèriques, d'acord amb l'equació de Kelvin, la solubilitat és inversament proporcional a la mida degut a la variació en la pressió de Laplace (pressió dins de les gotes de l'emulsió) (Tadros, 2004).

$$C(r) = C(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right)$$

on  $C(r)$  és la solubilitat de la fase dispersa en una gota de radi  $r$ ,  $C(\infty)$  la solubilitat de la fase dispersa en la fase externa,  $V_m$  és el volum molar de la fase dispersa,  $\gamma$  la tensió interfacial,  $R$  la constant dels gasos i  $T$  la temperatura absoluta.

En existir gotes de diferent mida es produeix una diferència de pressió a nivell de la fase dispersa, que comporta la dissolució de les gotes més petites i la difusió del seu contingut cap a aquelles més grans. Aquest fet es manifesta en un increment de la mida de les gotes (Tadros, 2004). La velocitat d'Ostwald serà més elevada com més gran sigui la diferència entre els diàmetres de les gotes tal com s'expressa a la següent equació (Tadros, 2004):

$$\frac{RT}{V_m} \ln \frac{C(r_1)}{C(r_2)} = 2\gamma \left( \frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right)$$

on,  $r_1$  i  $r_2$  corresponen al radi de dues gotes essent  $r_1$  inferior a  $r_2$ .

El procés de maduració d'Ostwald es pot ser explicat pel model proposat per Lifshitz, Slyozov (Lifshitz i Slyozov, 1961) i Wagner (Wagner, 1962) en el qual s'assumeix que les gotes són esfèriques, la distància de separació de les gotes és superior al seu radi i la

cinètica ve determinada per la difusió constant de la fase dispersa en la fase externa. En aquesta última premissa, en les nano-emulsions, s'ha de tenir en consideració el moviment Brownià ja que comportaria una difusió convectiva i en conseqüència la velocitat de difusió s'acceleraria (Solans, 2003). Aquest paràmetre també podria modificar-se per la coexistència de gotes de nano-emulsió amb gotes de microemulsió (Taisne i Cabane, 1998) o d'agregats tensioactius (Kabalnov, 1994; Taylor, 1995) que afavoririen la difusió des de les gotes més petites cap a les gotes més grans. Malgrat aquestes consideracions, en diversos estudis s'ha posat de manifest que la desestabilització de les nano-emulsions es produeix principalment per un mecanisme de maduració d'Ostwald (Katsumoto, 2000; Izquierdo, 2002; Liu, 2006; Yang, 2009).

D'acord amb el model proposat per Lifshitz, Slyozov (1961) i Wagner (Wagner, 1962), la velocitat de maduració d'Ostwald es pot determinar a partir de la següent expressió:

$$\omega = dr^3/dt = 8 C (\infty) \gamma \cdot V_m \cdot D / 9 \rho \cdot R \cdot T$$

essent  $\rho$  la densitat de la fase dispersa,  $t$  el temps i  $D$  el coeficient de difusió. D'acord amb aquesta equació es considera que existeix una relació lineal entre el  $r^3$  i el temps.

Una de les estratègies més utilitzades per a minimitzar el procés de maduració d'Ostwald consisteix en la incorporació en el sistema d'un component amb una solubilitat en la fase contínua considerablement inferior a la del component oliós. La disminució de la velocitat d'Ostwald es podria explicar de la següent manera: Inicialment, únicament el component oliós difon des de les gotes més petites cap a les gotes de mida superior degut a que el potencial químic és més gran en les gotes de menor diàmetre. Gradualment, el potencial químic en les gotes més grans va augmentant degut a la presència conjunta del component menys soluble (monòmer, polímer...) i de l'oli, per tant, arriba un moment en que aquest últim ja no difon. Quan s'assoleix l'equilibri, el factor limitant és la difusió del component amb baixa solubilitat que s'ha incorporat a les mescles (Higuchi i Misra, 1962; Antonietti i Landfester, 2002; Anton, 2008).

Un altre aspecte a considerar és l'estructura i la densitat de la pel·lícula interfacial, ja que els tensioactius (principalment de tipus polimèric) poden generar un fort impediment estèric en la interfície de les gotes que podria alentir el procés de difusió (Yotsuyanagi, 1973).

#### 1.1.4. Aplicacions de les nano-emulsions

Les nano-emulsions per la seva transparència òptica, el seu petit diàmetre de gota, la possibilitat de formar-se a baixes concentracions de tensioactiu (en relació a les microemulsions), l'elevada estabilitat cinètica i la possibilitat de controlar la mida de gota, presenten importants aplicacions en la indústria química, cosmètica i farmacèutica.

##### 1.1.4.1. Aplicacions farmacèutiques de les nano-emulsions

Des del punt de vista farmacèutic, les nano-emulsions es poden utilitzar com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs per diferents vies d'administració: parenteral, oral, nasal, oftàlmica, cutània i transdèrmica. La solubilització de principis actius en les gotes de nano-emulsió presenta els següents avantatges: estabilització de principis actius susceptibles de ser hidrolitzats i disminució de la toxicitat i dels efectes adversos ja que les nano-emulsions permeten una alliberació controlada del fàrmac i vectorització selectiva cap al lloc d'acció (Buszello i Müller, 2000). En els darrers anys, s'estan desenvolupat nombrosos estudis amb resultats prometedors en els quals s'empren les nano-emulsions com a vectors no virals per a l'alliberació de fàrmacs antiretrovirals (Vyas, 2008), vacunes (Bielinska, 2007; Huang, 2009) i plàsmids (Trimaille, 2003; Kwon, 2008; Liu i Yu, 2010). Altres avenços rellevants en aquest camp consisteixen en la formulació de nano-emulsions magnètiques (Primo, 2007a, 2007b, 2008) per al tractament del càncer de pell.

##### ▪ *Administració per via parenteral*

L'administració per via parenteral pot ser intravenosa, intramuscular i subcutània. Les composicions que s'administren per aquesta via han de complir els següents requeriments: han de ser estèrils, isotòniques, apirògenes, no tòxiques, biodegradables, estables i amb un diàmetre de gota inferior a 1µm (Benita i Levy, 1993). En aquest sentit, les nano-emulsions són sistemes especialment importants ja que es pot aconseguir la formació de gotes de petit diàmetre amb una estreta distribució de mides (la presència de gotes amb una mida superior a 5 µm podria ocasionar embòlia (Wretlind, 1964)).

Les nano-emulsions que s'administren per via parenteral s'empren com a nutricions parenterals i com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs i de vectorització de

principis actius cap a un determinat òrgan o teixit diana (Klang i Benita, 1998, Tamilvanan, 2004).

Entre els excipients que s'utilitzen habitualment per a la preparació de nano-emulsions destinades a l'administració parenteral aprovats per la FDA cal destacar les lecitines, els poloxàmers, el Tween 80 i el Cremophor EL com a components tensioactius i els olis vegetals (oli de soja, oli d'oliva i oli de ricí entre d'altres) i triglicèrids de cadena mitja com a components oliosos (Strickley, 2006).

La influència del component oliós i dels tensioactius en el diàmetre de gota de les nano-emulsions ha estat àmpliament estudiada. En aquest sentit, les formulacions amb fosfolípids com a component tensioactiu són d'especial interès degut a la seva bona biocompatibilitat. Jumaa i Müller (1998) van aconseguir la formació de nano-emulsions amb un diàmetre de gota comprès entre 130 i 140 nm i una estabilitat superior a 9 mesos emprant una concentració de component oliós (mescla d'oli de ricí i oli de soja o triglicèrids de cadena mitja) del 20% en pes. Per a majors concentracions d'oli (30% en pes), corresponent a la mescla oli de ricí i triglicèrids de cadena mitja en proporció 1:1 en pes, la mida de gota era dependent de la pressió d'homogeneïtzació.

En els estudis de Kan et al. (1999) s'ha descrit la formació de nano-emulsions amb un petit diàmetre de gota entre 80 i 120 nm en sistemes amb Tween 80 i fosfatidilcolina d'ou com a components tensioactius amb una estabilitat superior als 3 mesos.

Shi et al. (2009) van obtenir nano-emulsions estables durant un període de 12 mesos amb una mida de gota al voltant dels 150 nm utilitzant lecitina d'ou, Tween 80 i poloxàmer com a tensioactius i una mescla de triglicèrids de cadena mitja i llarga com a component oliós.

En els darrers anys, els sistemes amb tocoferols i tocotriols (principalment el D- $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)) s'han revelat com a una important alternativa a la utilització d'olis vegetals per la seva bona compatibilitat i elevada capacitat de solubilització de principis actius amb una elevada lipofília (Constantinides, 2004; 2006; 2008).

En les nano-emulsions destinades a l'administració parenteral es poden incorporar una gran varietat de fàrmacs. Els avenços més rellevants s'han aconseguit amb el praclitaxel, un agent antineoplàsic amb una baixa solubilitat en aigua que requereix ser administrat per via intravenosa. SONUS Pharmaceuticals ha desenvolupat una formulació per a l'alliberació de praclitaxel corresponent a una nano-emulsió que ha arribat fins a estudis clínics de fase III i que suposaria una alternativa al Taxol<sup>®</sup> Bristol-Myers



(Constantinides, 2008). Altres fàrmacs que s'han solubilitzat en nano-emulsions són antibiòtics com la claritromicina, incorporada en composicions amb tocoferols (Lu, 2008; Li, 2008), antimalàrics com la primaquina (Dierling i Cui, 2005), sedants com el clometiazol (Nordén, 2001) i vasodilatadors com la cinaricina (Shi, 2009).

▪ ***Administració per via oral***

Entre les diferents vies d'administració, la via oral és una de les més utilitzades. El principal inconvenient de l'administració de principis actius per via oral és la baixa biodisponibilitat que presenten els fàrmacs amb un elevat grau de lipofília (Ashford, 2004). La incorporació de principis actius insolubles o poc solubles en aigua en emulsions O/W incrementa la seva biodisponibilitat degut a que augmenta la seva solubilitat i, per tant, s'afavoreix la seva absorció a nivell intestinal. En els estudis de Kimura et al. (1989) i Ilan et al. (1996) es va posar de manifest que l'absorció dels principis actius incorporats en emulsions es trobava incrementada en relació als resultats obtinguts en solució aquosa. Per altra banda, el procés d'absorció quan un determinat fàrmac es troba solubilitzat en emulsions és més ràpid com més petit sigui el diàmetre de les gotes de la fase dispersa (Toguchi, 1990; Nicolaos, 2003; Koga, 2010). Per tant, la utilització de nano-emulsions per a incorporar principis actius milloraria considerablement la biodisponibilitat oral d'aquests.

Nicolaos et al. (2003) van observar que l'administració oral d'un antibiòtic, la cefpodoxima, incorporat en una nano-emulsió potenciava la biodisponibilitat del fàrmac en relació a una solució hidroalcohòlica, una suspensió i una emulsió convencional. Aquests resultats els van atribuir a la petita mida de gota de la nano-emulsió que actuaria afavorint l'absorció intestinal de la cefpodoxima.

Bali et al. (2010) van estudiar la biodisponibilitat oral en rates Wistar d'un agent hipolipemiant, l'ezetimiba, incorporat en nano-emulsions prèviament optimitzades del sistema aigua/Tween 80/ PEG 400/Capryol (mida de gota de 50 nm i polidispersitat inferior a 0,200) i van observar que s'obtenien concentracions més elevades en plasma sanguini que per a una suspensió del principi actiu i una fórmula comercialitzada.

Vyas et al. (2008) van desenvolupar una formulació corresponent a una nano-emulsió O/W amb una mida de gota entre 100 i 200 nm en la qual es va solubilitzar un fàrmac antiretroviral, saquinavir, i es va administrar per via oral i via intravenosa en ratolins BALB. Després de determinar les concentracions del fàrmac en diferents òrgans van

observar que millorava considerablement la biodisponibilitat en comparació amb una suspensió aquosa, aconseguint-se detectar concentracions importants a nivell cerebral.

Altres fàrmacs amb els quals s'ha observat que s'incrementava la biodisponibilitat oral quan s'administraven solubilitzats en nano-emulsions són els antiinflamatoris (Kim i Yu, 2000), els antimalàrics (Singh i Vingkar, 2007; Santos-Magalhães i Furtado-Mosqueira, 2010) i els immunosupressors (Gursoy i Benita, 2004).

### ▪ *Administració per via nasal*

L'administració intranasal presenta avantatges importants en relació a la via oral i parenteral. Per una banda, la mucosa nasal posseeix una major permeabilitat i una menor activitat enzimàtica en relació a la mucosa intestinal i en segon terme es tracta d'una via menys invasiva que la via parenteral.

L'administració per via nasal és especialment important per a aquells principis actius amb un acció a nivell del sistema nerviós central ja que hi ha una connexió directa amb el cervell. Kumar et al. (2008) van estudiar l'alliberació a nivell cerebral d'un fàrmac antipsicòtic, la risperidona, vehiculat en nano-emulsions després de ser administrades per via nasal. Els millors resultats es van aconseguir amb una formulació mucoadhesiva en la qual les gotes de la nano-emulsió estaven recobertes amb chitosan, detectant-se quantitats de fàrmac considerables en el cervell en relació a una solució de risperidona i a l'administració intravenosa de la nano-emulsió. La vehiculització en nano-emulsions afavoriria un transport ràpid a través de la mucosa nasal i incrementaria el temps de residència a la cavitat nasal evitant una eliminació precoç per l'acció mucociliar.

La via nasal també suposa una alternativa a la via parenteral per a l'administració de vacunes. En els estudis de Makidon et al. (2008) es van emprar nano-emulsions per a l'administració intranasal de la vacuna de l'hepatitis B (antigen de superfície del virus de l'hepatitis B(HBsAg)) i es va observar que s'aconseguia una bona eficàcia, estabilitat i facilitat de distribució suggerint una aplicació potencial de les nano-emulsions en aquest camp.

### ▪ *Administració per via ocular*

Pel que fa a la via ocular, la vehiculització de principis actius en nano-emulsions permet que aquests puguin superar les barreres oculars, interactuar amb estructures oculars

específiques, i perllongar la seva permanència en els teixits diana. En aquest sentit, el recobriment de les gotes de la nano-emulsió amb chitosan i/o àcid hialurònic és d'especial interès ja que ambdós components confereixen propietats mucoadhesives a la formulació i potencien els processos de permeació (de la Fuente, 2010). Badawi et al. (2008) van desenvolupar formulacions corresponents a nano-emulsions i nanocàpsules amb chitosan i van observar que ambdues composicions afavorien la permanència d'un antiinflamatori, la indometacina, a nivell corneal permetent una alliberació gradual i sostinguda del fàrmac tant cap a estructures oculars externes com internes. Amb aquestes formulacions es van aconseguir concentracions d'indometacina en humor aquós molt més elevades que per a una solució del fàrmac.

Recentment, també s'estan realitzant estudis de vehiculització d'oligonucleòtids en nano-emulsions per a ser administrats per via ocular (Hagigit, 2010).

#### ▪ *Administració per via cutània i transdèrmica*

La utilització de nano-emulsions per a l'administració de principis actius per via cutània afavoreix els processos de permeació a través de la pell sense que sigui necessària la incorporació d'excipients promotors que podrien exercir una acció irritant (Amselem i Friedman, 1998).

Friedman et al. (1995) van observar que quan s'administraven antiinflamatoris no esteroïdals solubilitzats en nano-emulsions, l'eficàcia antiinflamatòria tòpica i sistèmica dels fàrmacs era superior a l'obtinguda emprant com a vehicle emulsions convencionals. Tot i això, s'ha de tenir en consideració que en aquests estudis les formulacions a comparar presentaven composicions diferents.

Youenang Piemi et al. (1999) van dur a terme estudis de permeació cutània en pell de rata amb dos antifúngics, econazol i miconazol, incorporats en nano-emulsions carregades positivament i negativament i van observar que la presència de càrrega elèctrica en la superfície de les gotes influïa significativament en els processos de difusió.

En els estudis de Kotyla et al. (2008) es va comparar la permeació cutània de l' $\alpha$ -tocoferol incorporat en una nano-emulsió i en una emulsió convencional, amb una mida de gota de 65 nm i 2788 nm respectivament, del sistema aigua/polisorbat 80/oli de colza.

Malgrat que la composició i les concentracions van ser les mateixes es van detectar nivells superiors d' $\alpha$ -tocoferol en plasma per a la nano-emulsió suggerint que la vehiculització en nano-emulsions incrementaria la biodisponibilitat de fàrmacs lipòfils.

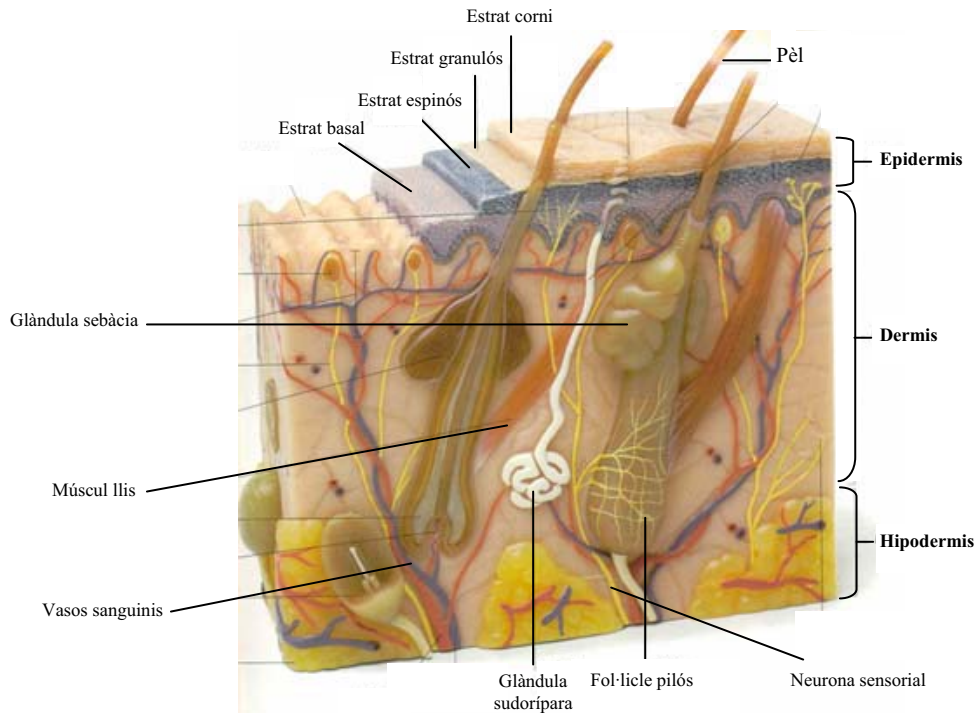
Subramanian et al. (2008) van estudiar les propietats antiinflamatòries de l'àcid acetil salicílic vehiculat en una nano-emulsió del sistema aigua/Tween 80/ oli de soja en relació a una suspensió aquosa del principi actiu. Després d'administrar les formulacions en la orella dels ratolins de tipus CD-1, als quals se'ls havia induït un procés inflamatori, es va observar una major eficàcia del fàrmac quan es trobava incorporat en la nano-emulsió. Per altra banda, es van obtenir nivells auriculars més baixos de IL-1 $\alpha$  (interleucina 1) i TNF $\alpha$  (factor de necrosi tumoral) per a la nano-emulsió, suggerint que l'administració en aquest tipus de formulació reduiria els efectes adversos del fàrmac.

Puglia et al. (2009) van solubilitzar àcid glicirrètic en un sistema de nano-emulsió amb un diàmetre de gota comprès entre 180 i 240 nm i van determinar l'absorció percutània *ex vivo* en pell humana i l'eficàcia antiinflamatòria *in vivo* en voluntaris sans als quals se'ls va induir eritema. Aquest estudi va posar de manifest que la vehiculització en nano-emulsió incrementava la permeabilitat transdèrmica en comparació a una emulsió O/W control que contenia la mateixa concentració de principi actiu.

### *Estudis de permeació cutània*

En els últims anys, la via transdèrmica s'ha revelat com una via d'administració important ja que es pot aconseguir evitar l'efecte de primer pas hepàtic, l'administració és fàcil i el risc per al pacient en cas de desencadenar-se una reacció al·lèrgica és relativament baix. El principal inconvenient de l'administració de principis actius per aquesta via és la funció barrera de la pell, considerant-se l'epiteli més impermeable de l'organisme per a la difusió de substàncies exògenes (Kogan i Garti, 2006).

La pell constitueix un 10% de la massa corporal de l'organisme i exerceix principalment una funció protectora enfront les agressions externes provocades per agents físics, químics i biològics. Està formada per tres capes: l'**epidermis**, la **dermis** i la **hipodermis** (veure Fig 1.4).



**Fig 1.4.:** Estructura de la pell

Entre les diferents capes de la pell, cal destacar l'epidermis ja que és la principal barrera per a la permeació tant de substàncies liposolubles com hidrosolubles.

L'**epidermis**, és la capa més fina i superficial de la pell i està constituïda per un epitel·li estratificat pla i queratinitzat. És una capa avascular que conté com a cèl·lules principals els queratinòcits que es disposen en diversos nivells formant cinc capes en funció del grau de diferenciació cel·lular. La capa més interna, en contacte amb la membrana basal que separa l'epidermis de la dermis, és l'estrat basal, on es troben les cèl·lules menys diferenciades que posseeixen una elevada capacitat de divisió cel·lular. A partir d'aquesta capa, les cèl·lules es van diferenciant progressivament fins a formar-se cèl·lules queratinitzades afuncionals que reben el nom de corneòcits. Aquestes cèl·lules conjuntament amb l'embolcall lipídic que les recobreix constitueixen l'estrat corni (Bannister, 2001). L'**estrat corni**, amb un gruix de 15-20  $\mu\text{m}$ , és la capa més superficial de l'epidermis i és la responsable de la funció barrera de la pell envers l'absorció percutània de substàncies externes i la pèrdua endògena d'aigua i ions (Scheuplein i Blank, 1971) gràcies a la organització estructural molt abundant en lípids que presenta (Wertz i Downing, 1989; Elias, 1991). Estructuralment, els corneòcits estan constituïts majoritàriament per queratines insolubles i per lípids intercel·lulars específics com ceramides, derivats del colesterol i àcids grassos (Wertz i Downing, 1989; Elias, 1991).

Les modificacions en la composició d'aquests lípids per acció dels tensioactius o de solvents orgànics que comportin canvis en l'organització estructural de l'estrat corni contribuirien a un increment de la permeabilitat.

El principal impediment per a la difusió de substàncies hidrosolubles a través de la pell el constitueix la capa còrnia mentre que per a substàncies liposolubles la barrera més important que dificulta l'accés a capes més profundes és l'epidermis viable (formada per totes les capes de l'epidermis excepte l'estrat corni) i la dermis. Per tal d'estudiar la penetració dels fàrmacs a través de la pell es realitzen estudis *ex vivo* o *in vitro*.

Un dels objectius principals de la realització d'estudis *ex vivo* o *in vitro* és simular les condicions reals d'aplicació d'una formulació sobre la pell. Per a desenvolupar aquests estudis s'utilitzen cel·les de difusió formades per un compartiment donador que conté la formulació que es pretén estudiar i un compartiment receptor on es troba la solució receptora en agitació contínua. Ambdós compartiments es troben separats per la pell o una membrana artificial (Friend, 1992).

Per a la realització d'aquests estudis es pot emprar pell de diferents orígens. Malgrat això, l'ideal seria la utilització de pell humana ja que els estudis estan enfocats a predir la permeació cutània de principis actius en humans. Les dificultats per a obtenir aquest tipus de pell ha fet que sovint s'utilitzin pells d'altres animals com per exemple la pell de porc de característiques histològiques i bioquímiques molt semblants a la humana (Gray i Yardley, 1975; Priborsky i Muhlbachova, 1990; Simon i Maibach, 2000; Godin i Touitou, 2007). Particularment, s'empra pell d'orella de porc que dona resultats comparables als de la pell humana (Chambin, 1993; Jacobi, 2005, 2007).

Existeixen dos models per a dur a terme els estudis de permeació cutània *in vitro*. El primer d'ells és el model de **dosi finita** i consisteix en l'aplicació d'una capa fina de formulació sobre la pell de forma que a mesura que el principi actiu s'absorbeix es produeix una disminució de la concentració del fàrmac a la superfície de la pell evitant d'aquesta manera assolir l'estat d'equilibri estacionari. Aquest model és el que més s'aproxima a les condicions reals d'aplicació d'una formulació. D'acord amb aquest model, el procés de difusió es pot expressar per la segona llei de Fick (Albery i Guy, 1983; Watkinson, 1994):

$$Q(t) = P_1 C_0 \left[ P_2 - \frac{1}{6} - \frac{2}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^n}{n^2} \exp(-P_2 n^2 \pi^2 t) \right]$$

on  $Q(t)$  és la quantitat de fàrmac que ha permeat al temps  $t$ ,  $P_1 = Kh$  i  $P_2 = D/h^2$ , essent  $K$  el coeficient de repartiment de la molècula entre l'estrat corni i la formulació,  $h$  el recorregut de la molècula a través de la capa còrnia i  $D$  el coeficient de difusió de la molècula a l'estrat corni.

El segon model, de **dosi infinita** (Hadgraft i Guy, 2003), consisteix en la presència de concentracions elevades de principi actiu en la formulació, per tant la petita disminució de la concentració que es produeix a la superfície de la pell es pot considerar negligible i s'aconsegueix arribar a l'estat estacionari. Per tal de poder aplicar el model de dosi infinita s'han de complir les condicions *sink* en la solució receptora. S'assumeix que en una solució es compleixen les condicions *sink*, quan la concentració del fàrmac és inferior al 10-20% de la concentració a saturació (Hanson, 1982). El model de dosi infinita es pot explicar a partir de la primera llei de Fick (Higuchi, 1960) que descriu la difusió d'una molècula a través d'una membrana:

$$J = \frac{KD}{h} (C_0 - C_i)$$

on  $J$  és el flux per unitat d'àrea,  $K$ ,  $D$  i  $h$  s'han explicat anteriorment per al model de dosi finita,  $C_0$  és la concentració de principi actiu sobre la pell i  $C_i$  la concentració dins la pell. Degut a que  $C_0$  és molt superior a  $C_i$ , es pot simplificar l'equació a :

$$J = K_p C_0$$

on  $K_p (=DK/h)$  és el coeficient de permeabilitat, té unitats de velocitat i dóna informació sobre les característiques de repartiment i difusió. D'acord amb aquest model, en representar gràficament la quantitat acumulada de principi actiu que ha difós en funció del temps, el pendent de la part lineal de la corba correspon a la velocitat de permeació (flux) a l'estat estacionari. Per a assolir l'equilibri és necessari que transcorri un cert temps que es coneix com temps de latència i s'obté de l'extrapolació de la recta a l'estat estacionari amb la intersecció de l'eix d'abscisses.

$$t_{lat} = h^2 / 6D$$

En concordança amb la primera llei de Fick descrita anteriorment, la velocitat de permeació d'un principi actiu s'incrementaria en augmentar el coeficient de repartiment del fàrmac entre l'estrat corni i el vehicle ( $K$ ), el coeficient de difusió del principi actiu a l'estrat corni ( $D$ ), o bé la concentració de fàrmac en el vehicle ( $C_0$ ).

Tant l'augment de  $K$  com de  $D$  comporten un efecte dels excipients de la formulació en la capa còrnia. Els excipients que promouen els processos de permeació poden actuar a diferents nivells: a nivell intracel·lular en els dominis de queratina, desnaturalitzant o alterant la seva conformació provocant un increment de la hidratació; a nivell intercel·lular modificant l'empaquetament dels lípids que constitueixen la bicapa lipídica comportant una fluïdificació d'aquesta i, finalment, alterant les propietats de solubilització de l'estrat corni (Williams i Barry, 2004). Entre els principals promotors de la permeació cal destacar els alcohols, els alcohols grassos, els glicols, els sulfòxids, l'azona, les pirrolidones, els àcids grassos, els tensioactius, els derivats de la urea, els terpens i els fosfolípids entre d'altres (Williams i Barry, 2004). Malgrat la seva activitat com a potenciadors de la permeació, els principals inconvenients que presenten són la seva toxicitat i que poden provocar irritació o hipersensibilització de la pell.

L'increment de  $C_0$  està relacionat amb la interacció entre el principi actiu i la formulació (Moser, 2001). El factor que promou la difusió d'un fàrmac a través d'una membrana és l'activitat termodinàmica del principi actiu en la formulació, que depèn de la concentració del principi actiu i del coeficient d'activitat. En solucions saturades, on existeix un equilibri entre la concentració de principi actiu en solució i la concentració no solubilitzada, l'activitat termodinàmica del fàrmac correspon a la de la substància pura i se li atribueix un valor igual a la unitat (Moser, 2001).

D'acord amb aquestes consideracions, l'absorció cutània de principis actius ve modulada principalment pel tipus d'excipient utilitzat per a vehicular fàrmacs (Loth, 1991). Existeixen nombrosos estudis que demostren la influència que tenen determinades propietats dels excipients com per exemple les propietats físico-químiques (Wall i Abel, 1996; Moser, 2001), la micronització del principi actiu en el vehicle (Wilhelmsen, 1979) o la mida de partícula (Rolland, 1993) en la permeació de fàrmacs a través de la pell. Els vehicles que afavoreixen més l'absorció transdèrmica de principis actius són les solucions alcohòliques ja que actuen afavorint la dissolució de fàrmacs i augmenten la permeabilitat de la barrera dèrmica i les formulacions de fase externa oliosa pel seu efecte oclusiu (Smith, 1999).



Les nano-emulsions són formulacions importants per a l'aplicació de principis actius sobre la pell perquè requereixen poca concentració de tensioactiu per a la seva formació a diferència de les microemulsions, fent que siguin millor tolerades. Així mateix, la petita mida de les gotes, indueix a pensar que actuen afavorint la permeació de principis actius sobre la pell (Schwarz, 1995; Friedman, 1995). Kotyla et al. (2008) i Puglia et al. (2008) van comparar la permeació cutània de diferents principis actius vehiculats en emulsions i en nano-emulsions O/W i van atribuir l'increment de la permeació quan s'emprava la nano-emulsió a la seva petita mida de gota. Per contra, en els estudis d'Izquierdo et al. (2007) no es van observar diferències estadísticament significatives en la permeació cutània de la tetracaïna solubilitzada en emulsions i nano-emulsions. No obstant, es van aconseguir incorporar concentracions superiors de fàrmac en les formulacions corresponents a nano-emulsions. Cal destacar que tant en els treballs de Kotyla et al. (2008) com en els d'Izquierdo et al. (2007) les nano-emulsions i les emulsions emprades per a realitzar els respectius estudis de penetració cutània presentaven la mateixa composició.

Tot i que les nano-emulsions, a diferència de les microemulsions, es poden formar amb un menor concentració de tensioactiu, aquest últim pot tenir un efecte irritant sobre la pell i donar lloc a una reacció inflamatòria local que es manifesta amb l'aparició d'eritema i edema. Un dels paràmetres més utilitzats per a estudiar la idoneïtat de les formulacions per a ser aplicades sobre la pell és la pèrdua transepidermica d'aigua (Pinnagoda, 1990; Delgado-Charro, 1997; Curdi, 2004).

La mesura transepidermica d'aigua (Transepidermal Water Loss; TEWL), és un paràmetre útil per a caracteritzar la funció barrera de la pell tant en condicions fisiològiques com patològiques. El concepte de TEWL fa referència a la quantitat total de vapor d'aigua que es perd a través de la pell mitjançant dos processos: la difusió constant de vapor d'aigua a través de l'epidermis i la pèrdua d'aigua que es produeix a través de la suor. Tot i això, únicament el procés de difusió passiva constitueix una mesura real de la funció barrera de la pell. La quantitat d'aigua que es perd a través de la pell està condicionada per diferents factors com la integritat de la capa còrnia, la temperatura, la humitat i la pressió atmosfèrica. En condicions fisiològiques normals, l'estrat corni és una barrera efectiva i la velocitat de pèrdua d'aigua expressada en quantitat d'aigua evaporada per unitat d'àrea de pell i per hora ( $\text{g/m}^2\text{h}$ ), és molt baixa. Així, valors elevats de TEWL són indicatius de que s'ha produït una alteració o defecte

de la funció barrera de la pell que pot haver estat causada per un procés patològic o per l'acció d'un agent físic o químic. L'increment del valor de TEWL es proporcional al grau de destrucció de la capa còrnia (Kompaore, 1991; Delgado-Charro, 1997). Les determinacions de TEWL es realitzen normalment mitjançant un evaporímetre (Pinnagoda, 1989).

### **1.1.4.2. Aplicacions químiques de les nano-emulsions**

Des del punt de vista químic, les nano-emulsions s'empren principalment per a la preparació de nanopartícules de naturalesa polimèrica (Antonietti i Landfester, 2002; Asua, 2002; Landfester, 2006; Anton, 2008) i lipídica (Anton, 2008; Huynh, 2009).

Les nanopartícules polimèriques obtingudes a partir d'una nano-emulsió com a medi de polimerització van ser descrites per primera vegada per Ugelstad et al. (1973). Ugelstad et al. van observar que la polimerització en nano-emulsions presentava diferències importants envers la polimerització en emulsions. Aquestes diferències es van atribuir a que el procés de nucleació tenia lloc majoritàriament a les gotes de monòmer i no a les micel·les com succeïa en el cas de l'emulsió.

En la majoria d'aquests estudis (Antonietti i Landfester, 2002; Asua, 2002; Landfester, 2006), la fase dispersa de la nano-emulsió està constituïda per un monòmer que polimeritza en presència d'un catalitzador. El fet que la polimerització s'esdevingui a l'interior de les gotes de la nano-emulsió afavoreix el manteniment del diàmetre d'aquestes durant la formació de les partícules de làtex de tal manera, que cada gota es comportarà com un nano-reactor.

La polimerització a partir de nano-emulsions ha permès l'obtenció de partícules de làtex emprant com a monòmers acrilats o estirè (Antonietti i Landfester, 2002; Asua, 2002) però també de nanopartícules polimèriques elaborades amb components biocompatibles adequades per a ser utilitzades com a sistemes d'alliberació de fàrmacs (Anton, 2008). A continuació es descriuen les característiques i els principals mètodes de preparació d'aquestes últimes.

## 1.2. NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES

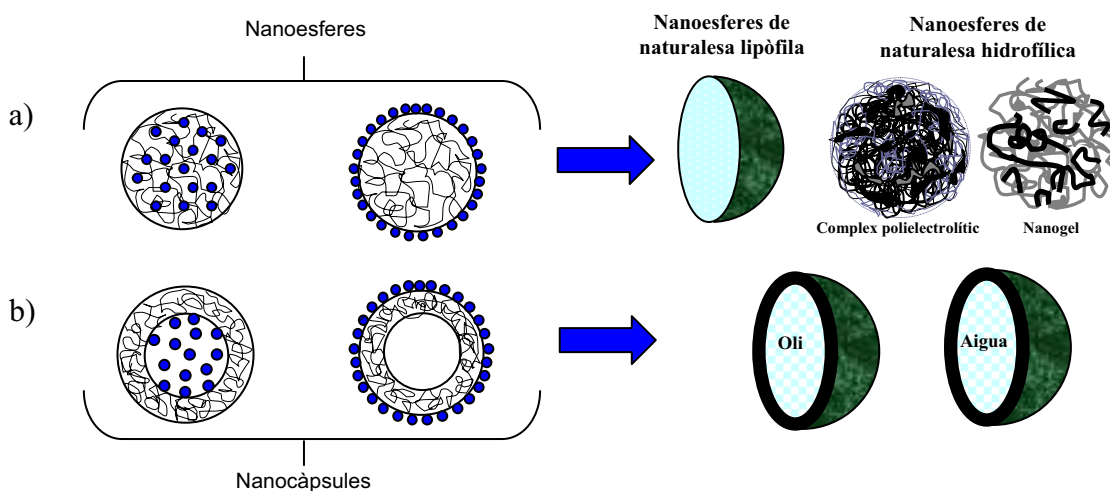
### 1.2.1. Definició i propietats

Les nanopartícules es poden definir com a sistemes col·loïdals sòlids amb un diàmetre comprès entre 1 i 1000 nm en les quals el principi actiu es pot trobar solubilitzat, atrapat, encapsulat, adsorbit o fins i tot unit a la superfície d'una matriu polimèrica que actua com a vehicle permetent l'alliberació selectiva del fàrmac en el lloc d'acció (Kreuter, 2004). Un dels principals avantatges de les nanopartícules en relació a altres sistemes col·loïdals d'alliberació controlada de fàrmacs és la seva elevada estabilitat cinètica i rigidesa morfològica.

Depenent de la seva estructura, les nanopartícules es poden classificar en nanoesferes i en nanocàpsules.

Les nanoesferes són partícules col·loïdals d'estructura matricial, constituïdes per un entramat de cadenes polimèriques entrelaçades entre si on el principi actiu pot trobar-se adsorbit a la superfície o incorporat al seu interior. Solen presentar morfologia esfèrica tot i que també s'ha descrit la formació de nanoesferes d'estructura amorfa (Vauthier i Bouchemal, 2009) (veure Fig 1.5a).

Les nanocàpsules són partícules col·loïdals d'estructura vesicular, constituïdes per un embolcall polimèric sòlid i un nucli intern de naturalesa hidròfoba o hidròfila, on el principi actiu es troba preferentment solubilitzat o dispersat tot i que també pot trobar-se adsorbit a la paret polimèrica (Fig 1.5 b).



**Fig.1.5.** Estructura dels diferents tipus de nanopartícules polimèriques a) nanoesferes, b) nanocàpsules.

## 1.2.2. Preparació de nanopartícules

Les nanopartícules polimèriques es poden obtenir a partir de polímers preformats o per mitjà de l'addició de monòmers que polimeritzen “in situ” en presència de catalitzadors (Bodmeier i Maincent, 1998; De Jaeghere, 1999; Anton, 2008).

La incorporació del principi actiu pot realitzar-se prèviament abans d'iniciar-se la polimerització o bé una vegada formades les nanopartícules de tal manera que el fàrmac pot trobar-se a l'interior de l'entramat polimèric o adsorbit a la superfície. L'elecció del mètode d'elaboració i del polímer depèn principalment de les característiques fisicoquímiques del principi actiu, de la diana terapèutica, de la via d'administració i de la biocompatibilitat i biodegradació del material emprat com a vector (Bodmeier i Maincent, 1998; Anton, 2008). Des del punt de vista tecnològic la selecció del mètode es troba fortament condicionada per la capacitat màxima de solubilització del sistema, per l'eficiència d'encapsulació i per la facilitat en l'escalat.

A continuació es descriuen els mètodes més utilitzats en la preparació de nanopartícules de naturalesa polimèrica.

### 1.2.2.1. Nanopartícules preparades a partir de polímers preformats

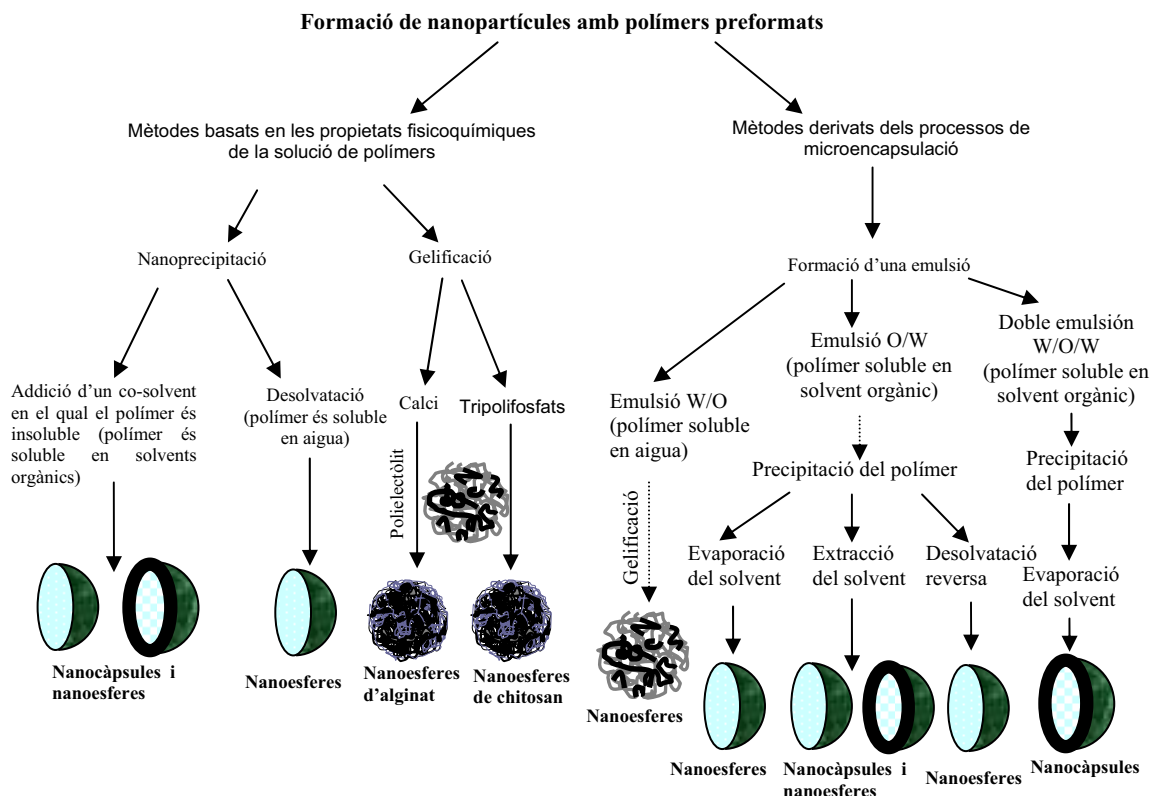
Per a la preparació de nanopartícules per a l'administració de fàrmacs s'han emprat una àmplia varietat de polímers tant hidròfils com hidròfobs que poden ser d'origen natural, sintètic o semisintètic (Kreuter, 2004; Vauthier i Bouchemal, 2009). A la taula 1.1 es mostren els més utilitzats.

**Taula 1.1:** Polímers preformats utilitzats habitualment per a la preparació de nanopartícules dissenyades com a sistemes d'administració de fàrmacs

Material	Composició química del polímer
Homopolímers sintètics	Polilàctic
	Polilàctic-glicòlic
	Poliepsilon-caprolactona
	Poliacrilat i polimetacrilat (Eudragit®)
Polímers naturals	Chitosan
	Alginats
	Gelatina
	Albúmina
Copolímers sintètics	Polilàctic-poliètilenglicol
	Polilàctic-glicòlic-poliètilenglicol
	Poliepsilon-caprolactona-poliètilenglicol
	Polihexadecilcianoacrilat-poliètilenglicol

En la formació de nanopartícules, la utilització de polímers preformats amb unes propietats fisicoquímiques ben definides i conegudes, comporta una sèrie d'avantatges en relació a l'ús de monòmers, entre els quals cal destacar l'absència de productes residuals provinents del procés de polimerització i de reaccions creuades entre monòmer i principi actiu. Tot i això, la gran majoria d'aquests mètodes requereixen la utilització de solvents orgànics i la mida de les nanopartícules obtingudes és més difícil de controlar.

Els mètodes de preparació de nanopartícules a partir de polímers preformats es basen en la precipitació de les macromolècules que es produeix en modificar-se les característiques fisicoquímiques del medi on es troben solubilitzades o dispersades (canvis en el pH, la temperatura, la tensió interfacial o els solvents) o bé en la capacitat de gelificació dels polímers quan es donen les condicions necessàries. Quan s'empren polímers, les nanopartícules col·loïdals es poden formar espontàniament o a partir d'una fase prèvia d'emulsificació. A la Fig.1.6 es mostren els diferents mètodes per a obtenir nanopartícules a partir de polímers preformats.



**Fig 1.6:** Mètodes de preparació de nanoesferes i nanocàpsules a partir de polímers preformats (Fig. adaptada de Fattal i Vauthier, 2007)

Els mètodes basats en la **formació espontània de les nanopartícules** es beneficien de les propietats fisicoquímiques (solubilitat i gelificació) del polímer en solució. Una vegada formades les nanopartícules es requereix una segona fase d'estabilització.

### *Mètodes basats en la solubilitat del polímer*

El procés de formació de les partícules consisteix en la preparació d'una solució inicial del polímer per a, posteriorment, induir la precipitació a partir de la incorporació en el sistema d'un co-solvent en el qual el polímer és insoluble (nanoprecipitació o desplaçament del solvent) (Fessi, 1989), o bé promoure la precipitació d'aquest per addició de sals (desolvatació) (Marty, 1978). L'estabilització de la suspensió de nanopartícules s'aconsegueix a partir de l'eliminació del solvent orgànic per evaporació o per reticulació química del polímer (nanopartícules amb proteïnes (Weber, 2000)).

Quan el polímer és soluble en un solvent orgànic, el mètode emprat és la nanoprecipitació. Aquest mètode va ser desenvolupat per Fessi et al. (1986) i permet la formació tant de nanoesferes (desplaçament del solvent) com de nanocàpsules (deposició interfacial). Com a solvents orgànics per a preparar la solució inicial de polímer s'ha emprat habitualment acetona ja que és miscible en aigua i es pot eliminar fàcilment (Fessi, 1989; Legrand, 2007) tot i que també s'han utilitzat mescles binàries d'acetona amb petites quantitats d'aigua o etanol (Murakami, 1999). La miscibilitat entre els solvents i les interaccions solvent/polímer juguen un paper clau en la formació de partícules per nanoprecipitació. Així, una vegada preparada la solució de polímer, aquesta és addicionada lentament sobre l'aigua que conté components tensioactius per a estabilitzar les partícules. Les nanopartícules es formen espontàniament durant la ràpida difusió del solvent orgànic en aigua. Posteriorment, el solvent orgànic (acetona) és eliminat per evaporació. Aquest procés d'evaporació es pot afavorir incrementant la temperatura o bé aplicant buit. Com a resultat, s'obtenen suspensions col·loïdals de nanopartícules amb una mida al voltant de 200 nm i una baixa polidispersitat (Vauthier i Bouchemal, 2009).

Per a la preparació de nanocàpsules s'empra el mateix mètode però incorporant un component oliós en la solució inicial del polímer (fase orgànica). Quan la solució és incorporada en la fase aquosa, l'oli és dispersat en forma de petites gotes en la mescla de solvents i el polímer precipita sobre la superfície d'aquestes (Fattal i Vauthier, 2007).

Les nanopartícules obtingudes per nanoprecipitació permeten la vehiculització de principis actius principalment lipòfils. El fàrmac, normalment és incorporat en la solució del polímer abans de formar les partícules. Mitjançant aquesta tècnica s'han aconseguit encapsular agents antiinflamatoris, immunosupressors i antineoplàsics entre d'altres en nanopartícules de polilàctic, polilàctic-glicòlic i poliepsilon-caprolactona (Barichello, 1999).

Si el polímer és hidròfil, les partícules es formen per desolvatació. Aquest procés consisteix en la precipitació del polímer per addició de sals minerals i la posterior reticulació química per a estabilitzar les partícules. Com a polímers s'empren freqüentment proteïnes i és una tècnica especialment apropiada per a la vehiculització de fàrmacs hidrosolubles (Fattal i Vauthier, 2007). Truong-Le et al. (1999) van utilitzar aquest mètode de preparació per a l'obtenció de nanoesferes de gelatina per a la vehiculització de DNA.

### ***Mètodes basats en la gelificació del polímer***

Les nanopartícules obtingudes per gelificació iònica es formen únicament en medi aquós. El procés de preparació consisteix en la formació de nanogels iònics en gelificar determinats polisacàrids carregats elèctricament (alginats i chitosan) en presència d'ions amb una càrrega elèctrica oposada (calci i tripolifosfats per als alginats i chitosan, respectivament). La formació de nanopartícules s'esdevé únicament per a determinades concentracions de polisacàrid i d'agent gelificant, que corresponen a la fase de pre-gel, formant-se petits corpuscles de mida nanomètrica ("clusters"). Una vegada formats els pre-gels, les partícules són estabilitzades a partir de la formació d'un complex en incorporar a la suspensió un polielectròlit de càrrega oposada.

Quan s'empra alginat (càrrega elèctrica negativa) es pot utilitzar polilisina o chitosan com a polications per a estabilitzar les partícules. El diàmetre de les partícules obtingudes és dependent de la concentració d'alginat i del pes molecular de l'electròlit. S'han descrit nanopartícules preparades per aquest mètode adequades per a vehicular pèptids (Sarmiento, 2007) i oligonucleòtids (González-Ferreiro, 2002).

En el cas del chitosan, les partícules s'estabilitzen amb copolímers com el polietilenglicol i el polipropilenglicol-pluronic. Les nanopartícules de chitosan també poden complexar-se amb àcids nucleics, ja que presenten càrregues complementàries, per a formar nanoplexes. En aquest cas, el principi actiu formaria part del propi sistema d'administració de fàrmacs (Vauthier i Bouchemal, 2009).

Els **mètodes derivats dels processos de microencapsulació** es basen en la formació prèvia d'una emulsió en la qual el polímer es troba solubilitzat a l'interior de les gotes de la fase dispersa. Si el polímer és soluble en aigua, es formarà una emulsió W/O mentre que si el polímer és insoluble en aigua, l'emulsió serà de tipus O/W on el component oliós correspondrà a un solvent orgànic. Per a l'obtenció de partícules dins del rang nanomètric, és necessari que la mida de les gotes de l'emulsió inicial sigui suficientment petita, ja que el diàmetre de les gotes de la fase dispersa condicionarà la mida de les nanopartícules obtingudes (Vauthier i Bouchemal, 2009). Per tant, el diàmetre de partícula dependrà del mètode d'emulsificació. Com ja s'ha esmentat al capítol 1.1.2, les nano-emulsions es poden obtenir tant per mètodes de baixa energia com per mètodes d'alta energia. Per a la preparació de nanopartícules polimèriques per mètodes derivats dels processos de microencapsulació, les nano-emulsions prèvies s'obtenen principalment a partir de mètodes d'alta energia (homogeneïtzadors d'alta pressió i equips d'ultrasons) tot i que també s'ha descrit la formació de nanopartícules a partir de nano-emulsions preparades per mètodes de baixa energia (Moinard-Chécot, 2006). Una vegada preparada la nano-emulsió, la formació de les nanopartícules s'esdevé per un procés de gelificació o per precipitació del polímer mitjançant evaporació del solvent o desplaçament del solvent.

La gelificació de les gotes de la nano-emulsió pot ser induïda per un increment del pH, per l'addició de calci o bé per disminució de la temperatura en emulsions W/O que contenen chitosan, alginats o agarosa respectivament (Vauthier i Couvreur, 2000). Per aquest mètode es formen nanoesferes de tipus nanogel o complex polielectrolític. Les nanopartícules així obtingudes, han estat utilitzades per a la vehiculització tant d'àcids nucleics com de pèptids (Pinto-Reis, 2008).

Mitjançant el mètode del desplaçament del solvent s'ha aconseguit la formació de nanopartícules biodegradables de polilàctic (PLA), poliglicòlic (PLGA), policaprolactona (PCL) i Eudragit<sup>®</sup> (Moinard-Chécot, 2006). Aquest mètode requereix la utilització d'un solvent que sigui parcialment soluble en aigua com pot ser l'acetat d'etil. El procés de preparació consisteix en la formació d'una emulsió O/W a partir de la dispersió d'una fase orgànica, que conté el polímer solubilitzat, en una mescla aquosa saturada de solvent. La formació de les nanopartícules té lloc quan s'addiciona posteriorment una elevada quantitat d'aigua a l'emulsió ja que es produeix una difusió



del solvent contingut a l'interior de les gotes cap a la fase externa i, en conseqüència, el polímer precipita (Quintanar-Guerrero, 1999). Per aquest mètode es poden formar tant nanoesferes com nanocàpsules. L'obtenció de nanocàpsules requereix la incorporació d'oli en la fase orgànica que donarà lloc a les gotes de l'emulsió (Quintanar-Guerrero, 1998).

D'acord amb el fonament del mètode del desplaçament del solvent, també es poden preparar nanopartícules polimèriques emprant solvents miscibles en aigua com l'acetona a partir d'un procés de desolvatació (Alléman, 1992). En aquest procediment, una solució del polímer en acetona és dispersada en una mescla aquosa que conté una elevada concentració de sal. La presència d'aquesta sal actua evitant que l'aigua i l'acetona es mesclin. Quan s'incorporen concentracions elevades d'aigua, l'acetona difon des de les gotes cap a la fase externa i el polímer precipita formant nanoesferes. Finalment, el solvent orgànic és eliminat per evaporació (Fattal i Vauthier, 2007).

El mètode d'evaporació del solvent consisteix en la formació d'una emulsió O/W a partir de la incorporació d'un solvent orgànic (per exemple acetat d'etil), on es troba solubilitzat o dispersat el polímer, en una mescla aquosa que conté el component tensioactiu. Les nanopartícules s'obtenen després de la difusió i evaporació del solvent com a conseqüència de la precipitació del polímer. L'evaporació del solvent pot produir-se mantenint l'emulsió en agitació contínua o bé mitjançant l'aplicació de buit. S'ha descrit la formació de nanopartícules de PLA, PLGA i PCL per emulsificació-evaporació del solvent emprant Lutrol F68 com a tensioactiu (Anton, 2008; Mundargi, 2008). En els últims anys aquests homopolímers s'estan substituint per copolímers que contenen polietilenglicol a la seva estructura i no requereixen l'addició d'un component tensioactiu per a estabilitzar les nanopartícules (Avgoustakis, 2004).

Finalment, destacar els estudis de Zambaux et al. (1998) que van aconseguir preparar nanocàpsules de PLA adequades per a vehicular principis actius hidrosolubles per evaporació del solvent després de formar una doble emulsió W/O/W. L'eliminació del solvent orgànic comporta la precipitació del polímer en la interfície de les gotes d'aigua que es trobaven dispersades en aquest solvent.

Perez et al. (2001) van incorporar plàsmids en nanopartícules de polilàctic-polietilenglicol obtingudes a partir de l'evaporació del solvent (acetat d'etil/clorur de metilè) contingut en una emulsió múltiple W/O/W elaborada mitjançant l'aplicació d'ultrasons.

### 1.2.2.2. Nanopartícules preparades per polimerització “in situ”

A diferència dels processos descrits anteriorment en els quals s'incorporava directament un polímer ja format, la polimerització “in situ” es basa en que la reacció de polimerització que donarà lloc a les nanopartícules s'esdevé directament en un determinat medi de reacció, on s'hi ha incorporat un monòmer, per acció d'un catalitzador. El polímer resultant de la reacció ha de ser insoluble en aquest medi.

Per polimerització “in situ” es poden preparar tant nanoesferes com nanocàpsules. A continuació es detallen els principals processos d'elaboració.

#### *Preparació de nanosesferes per polimerització “in situ”*

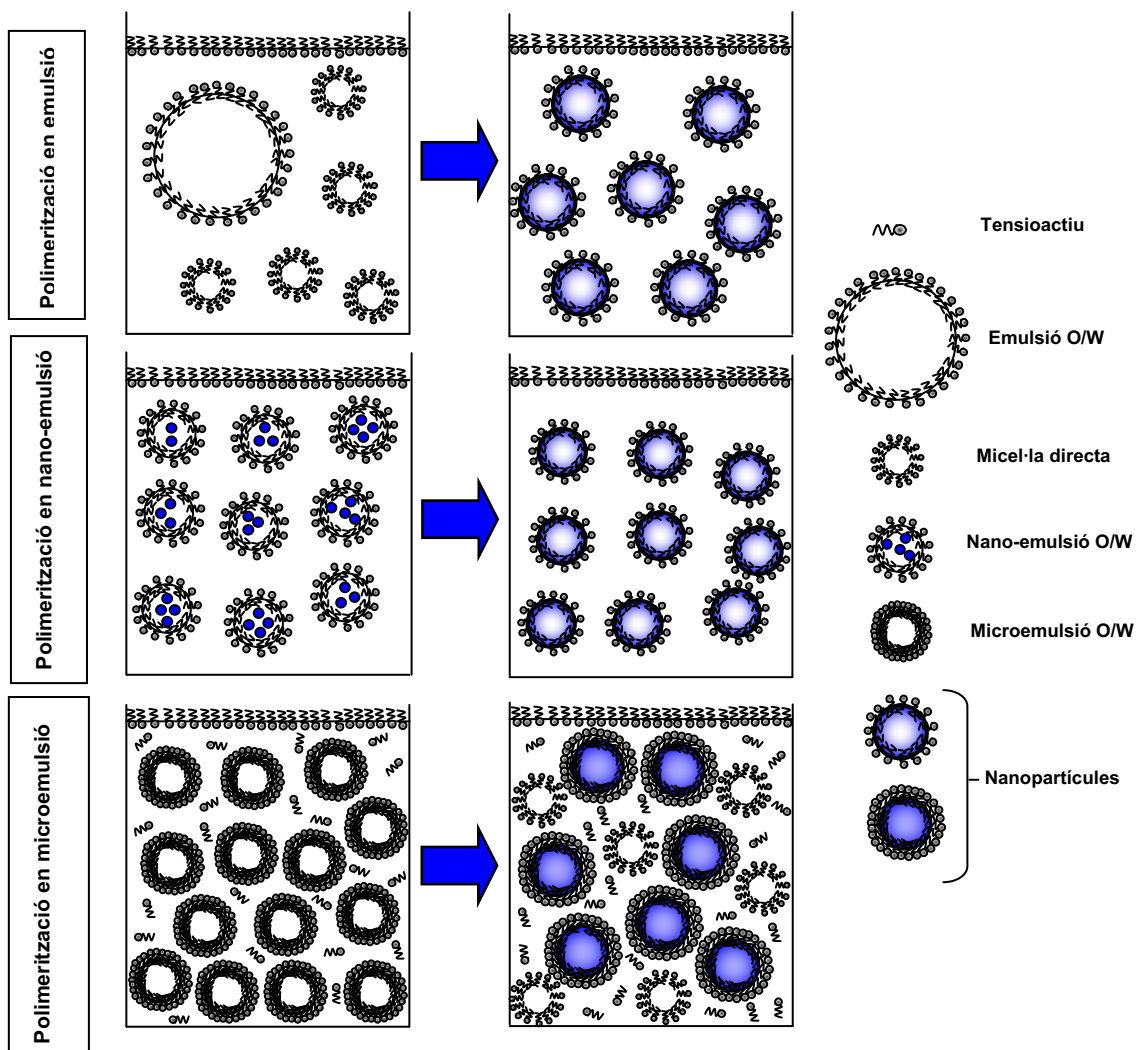
Depenent de la naturalesa del medi de polimerització, els mecanismes a partir dels quals es formen nanopartícules polimèriques corresponents a nanoesferes es classifiquen en:

- Polimerització en emulsió
- Polimerització en nano-emulsió.
- Polimerització en microemulsió.

En la **polimerització en emulsions**, el procés s'inicia a partir d'un sistema on coexisteixen gotes de monòmer estabilitzades per molècules de tensioactiu i micel·les directes que també poden contenir monòmer solubilitzat al seu interior. Degut a la diferència de diàmetre entre les gotes i les micel·les, el procés de polimerització es produeix a l'interior d'aquestes últimes, ja que posseeixen una major àrea superficial, a partir de la captura de radicals lliures o d'oligoradicals presents a la fase externa. A mesura que transcorre el procés, es produeix una difusió del monòmer des de les gotes cap a les micel·les a través de la fase externa que permet el creixement del polímer format, fins a la desaparició total de les gotes d'emulsió. Com a resultat, es formen partícules amb un diàmetre superior als 100 nm (Antonietti i Landfester, 2002). La polimerització en emulsió implica un increment considerable de la tensió interfacial del sistema ja que en formar-se les partícules es produeix un augment de l'àrea interfacial en relació a l'emulsió primària. Per tant, la mida de les partícules obtingudes no es correspon amb la de les gotes de l'emulsió. El diàmetre de partícula dependrà de paràmetres cinètics com la temperatura, la concentració de catalitzador i la velocitat del procés de nucleació (Antonietti i Landfester, 2002) (veure Fig.1.7).

En la **polimerització en nano-emulsió**, el monòmer es troba constituint les gotes de la fase dispersa conjuntament amb un component amb una elevada hidrofobicitat que actua disminuint la velocitat de maduració d'Ostwald i per tant, contribueix favorablement a incrementar l'estabilitat cinètica del sistema. Cal destacar que la tensió interfacial en el sistema de nano-emulsió es molt superior a zero (Antonietti i Landfester, 2002). El procés de polimerització es desencadena simultàniament a l'interior de cadascuna de les gotes de la nano-emulsió, comportant-se com a petits nanoreactors, per acció de radicals lliures que penetren a l'interior d'aquestes. A diferència de la polimerització en emulsió, la difusió del monòmer cap a les regions de polimerització no influeix en la cinètica de reacció perquè a cadascun dels nuclis de polimerització ja es troba la màxima concentració de monòmer. Quan el procés finalitza s'obtenen nanopartícules amb el mateix diàmetre de partícula que les gotes de nano-emulsió i en el mateix nombre (veure Fig1.7). Per tant, es podria considerar les nanopartícules com a còpies polimeritzades de les gotes de nano-emulsió (Antonietti i Landfester, 2002)

Pel que fa al procés **de polimerització en microemulsió**, el sistema inicial és termodinàmicament estable, a diferència de les nano-emulsions, es forma espontàniament i requereix concentracions elevades de components tensioactius i co-tensioactius per a la seva formació que garanteixin un tensió interfacial propera a zero en les interfícies oli/aigua de les gotes (Antonietti i Landfester, 2002). En aquest cas, totes les gotes de la microemulsió constituïdes pel monòmer presenten un diàmetre similar, en contrast amb el procés de polimerització en emulsions, on s'observaven dues poblacions de mides completament diferents. L'increment en el diàmetre de les nanopartícules que s'observa en relació a les gotes inicials de microemulsió s'explica perquè la polimerització no pot desencadenar-se simultàniament en totes les gotes, de tal manera que les cadenes polimèriques primàries únicament es formen en algunes de les gotes de la microemulsió (Candau,1999). La influència osmòtica i elàstica d'aquestes cadenes desestabilitza les gotes de microemulsió comportant l'augment de la mida de partícula, la formació de micel·les i una nucleació secundària. El resultat d'aquest procés és la formació de partícules entre 5 i 50 nm totalment recobertes de tensioactiu, amb un nombre molt petit de cadenes polimèriques per partícula, que coexisteixen amb una població micel·lar (Antonietti i Landfester, 2002).



**Fig 1.7:** Mecanismes de polimerització “in situ” per a la formació de nanopartícules polimèriques; a) polimerització en emulsió, b) polimerització en nano-emulsió i c) polimerització en microemulsió.

A continuació es descriuen amb més detall cadascun d'aquests processos.

### Mecanisme de polimerització en emulsions

El procés de polimerització en emulsions és un mètode molt emprat per a l'obtenció de nanopartícules polimèriques a partir de monòmers (Bodmeier i Maincent, 1998, Chauvierre, 2003). Aquest mètode consisteix en la formació d'una emulsió de gotes de monòmer, estabilitzades gràcies a la presència de components tensioactius, que es troben dispersades en una fase externa en la qual el monòmer és immiscible. Quan s'utilitzen concentracions de tensioactiu superiors a la concentració micel·lar crítica es formen estructures micel·lars directes capaces de solubilitzar molècules de monòmer que coexisteixen amb les gotes d'emulsió.

La reacció de polimerització pot iniciar-se tant a l'interior de les micel·les (polimerització micel·lar) com en la fase contínua (nucleació homogènia) depenent de la solubilitat del monòmer emprat. En ambdós casos el procés de polimerització comporta una primera fase de nucleació i una segona etapa de propagació i es produeix en presència d'un catalitzador que pot ser de tipus físic o químic. L'energia alliberada pel catalitzador genera espècies químiques reactives (radicals lliures) en la fase contínua que poden penetrar a l'interior de les micel·les o romandre a la fase contínua. Aquests radicals col·lisionen amb molècules de monòmer properes activant-les, afavorint la propagació de la reacció de polimerització. En aquesta segona etapa es produeix un creixement de les partícules polimèriques nucleades degut a la difusió de molècules de monòmer provinents dels reservoris. La concentració de monòmer a l'interior de les partícules ha de mantenir-se en equilibri amb el monòmer solubilitzat a la fase externa, per tant el creixement de les partícules es troba limitat per la tensió interfacial existent entre la partícula i el medi que l'envolta. El procés de polimerització finalitza en exhaurir-se el monòmer o el catalitzador (Bodmeier i Maincent, 1998).

En el procés de polimerització micel·lar s'assumeix que les molècules lliures de monòmer activat iniciaran preferentment la reacció de polimerització a l'interior de les micel·les ja que, degut al seu petit diàmetre, presenten una major àrea superficial que les gotetes d'emulsió constituïdes pel monòmer. Així, les molècules de monòmer en ser lleugerament solubles en la fase externa difondran a través d'aquesta des de les gotes de l'emulsió fins a les micel·les. En les micel·les, les molècules de monòmer solubilitzades polimeritzen per acció dels radicals lliures presents en la fase contínua formant-se partícules de polímers de cadena curta. El creixement de les cadenes polimèriques es produeix per la migració de noves molècules de monòmer provinents de les gotes d'emulsió (Bodmeier i Maincent, 1998).

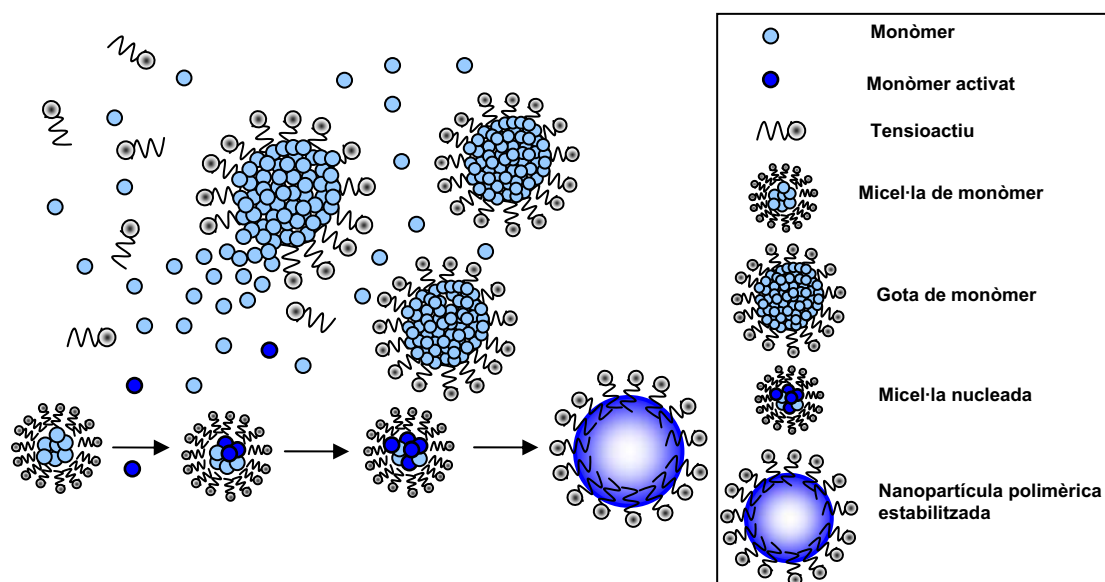


Fig. 1.8: Mecanisme de polimerització micel·lar

Si el monòmer és suficientment soluble en la fase externa, els processos de nucleació i polimerització poden esdevenir-se directament en aquesta fase formant-se cadenes polimèriques primàries que reben el nom d'oligòmers. En aquest cas, les micel·les i les gotes de monòmer actuen únicament com a reservoris. Els oligòmers, en assolir una determinada longitud, precipiten i formen partícules primàries que són estabilitzades per molècules de tensioactiu provinents de les micel·les i de les gotes. Depenent de les condicions de la mescla i de l'estabilitat del sistema, les nanoesferes es poden formar a partir de la incorporació de noves molècules de monòmer en les partícules primàries (Fig.1.9a) o bé a partir de la fusió de diverses partícules primàries (Fig 1.9b).

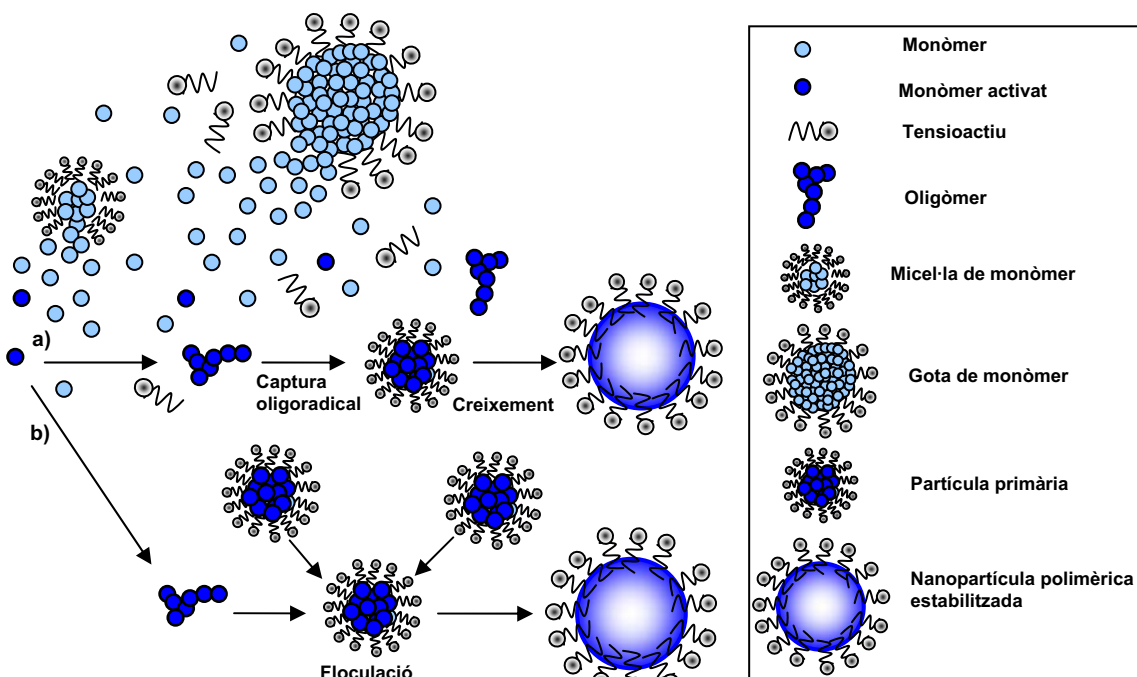


Fig 1.9: Mecanisme de nucleació homogènia

### **Mecanisme de polimerització en nano-emulsions**

En el mecanisme de polimerització en nano-emulsions es parteix d'una composició constituïda per gotes amb un diàmetre de l'ordre de nanòmetres que contenen monòmer i un component hidròfob al seu interior, estabilitzades per components tensioactius i dispersades en un medi aquós. En el cas de les nano-emulsions W/O, la fase dispersa està constituïda per un monòmer hidròfil i la fase contínua per un component oliós (Antonietti i Landfester, 2002).

En aquestes nano-emulsions, degut a la seva estructura, podrien considerar-se tres possibles mecanismes de nucleació, la nucleació micel·lar, la nucleació homogènia i la nucleació a les gotes.

Com ja s'ha explicat anteriorment, en el procés de polimerització micel·lar, els radicals lliures penetren a l'interior de les micel·les, on reaccionen amb altres molècules de monòmer i formen una cadena polimèrica. El creixement de les partícules es produeix per la difusió de molècules de monòmer provinents dels reservoris. Per a que tingui lloc aquest mecanisme, es requereixen concentracions de tensioactiu lliure superiors a la concentració micel·lar crítica (cmc). Degut a que les nano-emulsions es poden formar a baixes concentracions de tensioactiu, aquest mecanisme és poc probable (Antonietti i Landfester, 2002).

La nucleació homogènia podria ser un possible mecanisme en la polimerització en nano-emulsions, ja que no requereix necessàriament la presència de concentracions superiors a la cmc. En aquest procés, les partícules es formen per agregacions d'oligòmers en la fase aquosa gràcies a la difusió de les molècules de monòmer cap el nucli de polimerització. Normalment, aquest mecanisme depèn de la concentració de catalitzador i de la solubilitat del monòmer emprat (Antonietti i Landfester, 2002).

Finalment, el mecanisme de nucleació a les gotes, suggereix que les gotes de nano-emulsió formades durant el procés d'emulsificació són polimeritzades per acció dels radicals lliures que penetren al seu interior. Cada gota correspon a un petit nanoreactor formant-se una única partícula per gota de nano-emulsió. Com que la concentració de monòmer en el nucli de polimerització ja correspon a la màxima, la difusió de monòmer no influeix en el procés de polimerització. Per a una nano-emulsió ideal, s'esperaria que aquest mecanisme fos el dominant. Aquest procés de polimerització pot afavorir-se amb la utilització de catalitzadors amb una elevada solubilitat en la fase dispersa (Antonietti i Landfester, 2002).

La formació de nanopartícules per polimerització en nano-emulsions normalment s'esdevé per un procés de polimerització per radicals, quan s'incorpora un catalitzador a una nano-emulsió constituïda per gotes de monòmer prèviament formada. Aquest catalitzador o iniciador ve determinat per la fase dispersa i es selecciona en funció de la seva solubilitat parcial (Anton, 2008). La iniciació de la polimerització també pot induir-se per radiació UV, mitjançant ultrasons o per via enzimàtica (Anton, 2008). Com ja s'ha explicat anteriorment, el mecanisme de polimerització consistiria en una nucleació a l'interior de les gotes. La polimerització per radicals amb nucleació a l'interior de les gotes també s'ha descrit en nano-emulsions que contenen l'agent catalitzador solubilitzat a les gotes de la fase dispersa. En aquest cas la polimerització s'inicia en incrementar la temperatura (Landfester, 1999).

Malgrat que en nombrosos estudis s'ha aconseguit la formació de nanopartícules per polimerització per radicals en nano-emulsions, aquests processos podrien afectar l'estabilitat dels principis actius i per tant la polimerització lliure de radicals suposa un avenç important en la formació de nanopartícules per a l'administració de fàrmacs. Entre aquests processos, cal destacar la poliaddició o policondensació (la reacció de polimerització es produeix entre dos monòmers), la polimerització aniònica i les reaccions catalitzades per metalls (Anton, 2008).

### **Mecanisme de polimerització en microemulsions**

En el procés de polimerització en microemulsions, el sistema inicial és termodinàmicament estable, formant-se espontàniament quan es posen en contacte líquids no miscibles entre sí gràcies a la presència de components tensioactius amb un balanç hidròfil-lipòfil (HLB) adequat (Solans, 1997). Les concentracions de monòmer emprades per a l'obtenció de nanopartícules oscil·len normalment entre el 5 i el 10 % en pes ja que la utilització de concentracions més elevades podria comportar la desestabilització del sistema i la consegüent pèrdua de transparència durant el procés de polimerització. Per tant, a diferència de la polimerització en emulsió, la concentració de monòmer és relativament baixa mentre que la concentració de tensioactiu és molt superior a l'emprada habitualment en la preparació d'emulsions. La relació en pes monòmer/tensioactiu és de 0,3-1 per a la microemulsió comparada amb 30-60 per a l'emulsió. Per altra banda, en les microemulsions, el monòmer es troba únicament solubilitzat en les gotes de microemulsió que presenten una mida similar. En aquestes solucions col·loïdals la tensió interfacial en la superfície de les gotes és propera a zero.



Quan s'empren microemulsions, s'assumeix que el procés de nucleació es continu al llarg de tota la polimerització, per tant, el procés de polimerització no es desencadena simultàniament en totes les gotes, formant-se cadenes polimèriques primàries únicament en algunes de les gotes de la microemulsió. Les partícules nucleades creixen a expenses del monòmer contingut en altres gotes de microemulsió, on no ha tingut lloc la nucleació, que difon a través de la fase contínua o bé és adquirit per col·lisions entre les gotes. Com a conseqüència d'aquest procés de creixement i degut a la presència d'elevades concentracions de tensioactiu, a més de partícules, es formen petites micel·les. Aquestes micel·les presenten una àrea interfacial superior a la de les partícules nucleades i capturaran preferentment els radicals primaris generats a la fase contínua. Per tant el nombre de cadenes polimèriques per partícula es relativament baix i proper a la unitat (Candau, 1999).

### ***Preparació de nanocàpsules per polimerització “in situ”***

Els mecanismes de polimerització “in situ” que donen lloc a la formació de nanocàpsules adequades per a vehicular principis actius són principalment:

- La **polimerització interfacial**
- La **policondensació o poliaddició interfacial**

En la **polimerització interfacial**, la reacció de polimerització es desencadena en la interfície formada per dos líquids immiscibles entre si quan un determinat monòmer difon des del medi on es troba solubilitzat cap a la interfície, on polimeritza per acció d'un catalitzador (Vauthier i Bouchemal, 2009). El polímer resultant d'aquesta reacció es un homopolímer constituït per unitats de monòmer.

La formació de nanocàpsules s'aconsegueix quan s'empra com a medi de reacció nanoemulsions o micro-emulsions que poden ser del tipus O/W o W/O o fins i tot estructures bicontínues (en el cas de la microemulsió). En les composicions de tipus O/W, el monòmer es troba solubilitzat a l'interior de les gotes d'oli, produint-se una migració d'aquest cap a la interfície oli/aigua, on polimeritza formant un pel·lícula polimèrica rígida que recobreix les gotes d'oli. Per contra, en les dispersions W/O el monòmer es disposa en la fase contínua (generalment s'incorpora una vegada preparada la formulació); la reacció de polimerització es produeix a nivell de la interfície quan el monòmer entra en contacte amb les molècules d'aigua de la fase interna (Vauthier i

Bouchemal, 2009). Finalment, en les microemulsions bicontínues, el procés és similar a les composicions W/O. El monòmer s'incorpora "a posteriori" una vegada preparada la dispersió, difon a través de les capes d'oli i polimeritza en les interfícies oli/aigua.

El procés de polimerització consisteix en una polimerització aniònica del monòmer. Així, per acció dels grups hidroxil de l'aigua, es formen espècies altament reactives que reaccionen amb altres molècules de monòmer activant-les (Vauthier i Bouchemal, 2009). La reacció finalitza quan s'ha exhaurit tot el monòmer present en el medi de polimerització.

Diversos autors (Al Khoury- Fallouh, 1986; Aboubakar, 1999) han descrit la formació de nanocàpsules en emulsions O/W, preparades a partir de la dispersió d'una fase orgànica constituïda per un solvent orgànic miscible en aigua, un component oliós i el monòmer, en una fase aquosa que conté Pluronic F68 com a tensioactiu. Els factors crítics d'aquest procés són la separació de fases que pot tenir lloc durant la difusió del solvent en la fase aquosa i la precipitació simultània del polímer a les interfícies oli/aigua. Per altra banda, es podria produir la formació conjunta de nanoesferes i nanopartícules. Per a evitar aquest fenomen, es pot acidificar la fase orgànica, optimitzar la relació etanol/aigua o emprar solvents apròtics.

L'obtenció de nanocàpsules amb un nucli oliós per polimerització interfacial en nano-emulsions, va permetre la formació de partícules de mida més petita (100 nm enfront 250-300 nm per al procés en emulsió). Les nano-emulsions es formen mitjançant ultrasons en un medi acidificat i amb el monòmer solubilitzat en el component oliós. La polimerització té lloc a la interfície de les gotes en incrementar el pH (Huang, 2007).

En la preparació de nanocàpsules amb un nucli hidròfil, el diàmetre de les partícules depèn principalment del tipus de tensioactiu emprat. S'ha descrit la formació de nanocàpsules estabilitzades amb tensioactius no iònics amb un diàmetre comprès entre 250 i 350 nm (Vauthier i Bouchemal, 2009)

Anton et al. (2009) han aconseguit la formació de nanocàpsules preparades per polimerització interfacial amb un nucli intern hidròfil, adequades per a vehicular fàrmacs tant hidròfils com lipòfils. Aquestes partícules presenten una estructura interna aquosa envoltada per un entramat polimèric que, al seu torn, es troba recobert per una matriu oli/tensioactiu amorfa.

La formació de nanocàpsules per polimerització interfacial permet tant la solubilització de fàrmacs lipòfils com hidròfils, incloent-hi pèptids i oligonucleòtids. (Vauthier i Bouchemal, 2009).

El mecanisme de **policondensació o poliaddició interfacial** consisteix en la formació d'una pel·lícula polimèrica en la interfície entre dos líquids immiscibles entre si a partir de la reacció entre dos monòmers que es poden trobar solubilitzats en una única (Tiarks, 2001) o en cadascuna d'aquestes fases (Bouchemal, 2004) (Vauthier i Bouchemal, 2009).

Per a obtenir nanocàpsules per policondensació interfacial, la reacció de polimerització ha de produir-se en la interfície oli/aigua o a l'interior de les gotes d'una nano-emulsió. Aquesta nano-emulsió pot obtenir-se tant per mètodes d'alta (Tiarks, 2001; Zanetti-Ramos, 2006) com de baixa energia (Bouchemal, 2004).

Quan ambdós monòmers es troben solubilitzats a les gotes de la fase dispersa de la nano-emulsió, la polimerització es produeix a l'interior d'aquestes, el polímer precipita a l'oli i difon gradualment cap a la interfície oli/aigua per a formar les nanocàpsules. En aquest procés el polímer ha d'aconseguir recobrir completament el nucli oliós. La migració del polímer des de l'interior cap a la interfície de les gotes està regida per les tensions interfacials aigua/polímer i polímer/oli (Anton, 2008). Mitjançant aquest procediment es poden obtenir nanopartícules amb un diàmetre de partícula de l'ordre de les gotes de nano-emulsió. Tiarks et al. (2001) van aconseguir sintetitzar nanocàpsules amb un diàmetre de 200 nm en sistemes de nano-emulsió amb una composició aigua/dodecilsulfat sòdic/ hexadecà emprant com a monòmers hidròfobs diisocianat d'isoforona i 1,12-dodecadiol.

Quan els monòmers responsables de la reacció de polimerització es troben solubilitzats en la fase dispersa i en la fase contínua respectivament, la reacció s'esdevé a la interfície oli/aigua de les gotes de nano-emulsió (Vauthier i Bouchemal, 2009). La nano-emulsió, per tant, estarà constituïda per gotes d'oli i d'un monòmer lipòfil, estabilitzades per components tensioactius i dispersades en un medi aquós que conté un monòmer amb una elevada hidrofília. Depenent de les propietats del monòmer hidròfil, aquest també podria localitzar-se a la interfície de les gotes.

Takasu i Kawaguchi (2005) van sintetitzar un embolcall polimèric obtingut per policondensació interfacial en nano-emulsions amb estirè i un monòmer hidròfob com a fase interna. La reacció de polimerització va produir-se en la interfície de les gotes, en afegir-se una solució aquosa d'un monòmer hidrosoluble en la nano-emulsió O/W.

En els estudis de Bouchemal et al. (2004) i Montasser et al. (2007) les nanopartícules es van obtenir combinant un procés de desplaçament del solvent amb una policondensació

interficial. Així, es va emprar una fase orgànica constituïda per un solvent orgànic miscible en aigua, un monòmer hidròfob, un tensioactiu hidròfob i un component oliós i una fase aquosa formada per aigua, un tensioactiu i un monòmer hidròfil. La reacció de policondensació es produeix en la interfície de les gotes d'oli que es formen en mesclar ambdues fases per un procés “d'emulsificació espontània”.

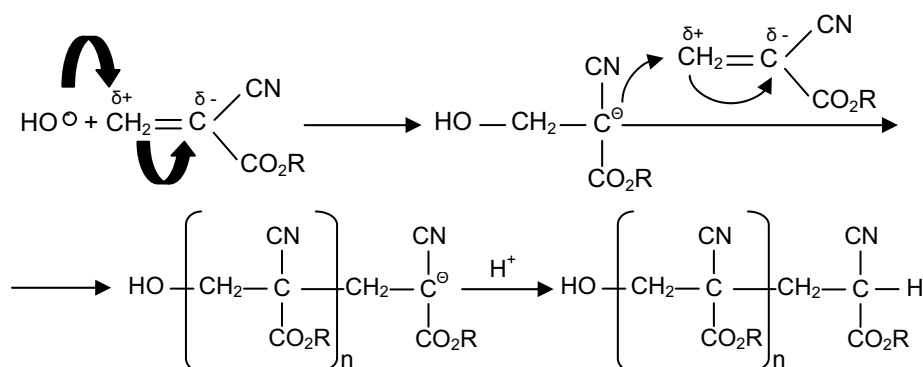
En el procés de policondensació interfacial, la naturalesa de l'embolcall polimèric que constitueix les nanocàpsules ve donada pel tipus de monòmer emprat. El gruix de la coberta polimèrica, la seva flexibilitat i porositat són paràmetres que influeixen en la capacitat de solubilització, l'estabilitat i l'alliberació de principis actius. Aquestes propietats depenen principalment de la concentració de monòmer i del pes molecular del polímer obtingut (Vauthier i Bouchemal, 2009). Bouchemal et al. (2004) han descrit la formació de nanocàpsules preparades per policondensació interfacial capaces d'encapsular  $\alpha$ -tocoferol amb una elevada eficiència d'associació. L'embolcall polimèric format confereix una elevada estabilitat al principi actiu i el protegeix enfront l'efecte de la temperatura i les radiacions ultraviolades.

### **1.2.3. Nanopartícules de polialquilcianoacrilat**

Malgrat que els polialquilcianoacrilats no es van començar a emprar com a polímers fins a la dècada dels anys vuitanta, els corresponents monòmers, els alquilcianoacrilats, han estat utilitzats des d'inicis dels anys seixanta per a diverses aplicacions mèdiques, degut a que les seves excel·lents propietats adhesives els fa capaços d'unir-se fortament a diferents tipus de substrats, inclosos teixits vius i la pell (Vauthier, 2003). En els darrers anys, s'estan duent a terme nombrosos esforços dirigits cap a la síntesi de nanosistemes capaços de travessar les barreres anatòmiques i fisiològiques permetent una alliberació selectiva dels agents terapèutics en els teixits diana, per tal d'aconseguir la resposta terapèutica desitjada minimitzant al màxim l'aparició d'efectes adversos (Vauthier, 2007). En aquest sentit, una de les principals aplicacions dels polímers d'alquilcianoacrilats, ha consistit en la seva utilització per a la formació de nanopartícules per a l'administració de principis actius (Soppimath, 2001; Vauthier, 2007). Entre els principis actius que han estat vehiculats en nanopartícules de polialquilcianoacrilats cal destacar els antitumorals (Arias, 2008), els pèptids (Graf, 2008) i els àcids nucleics (Martimprey, 2009).

Els polímers d'alquilcianoacrilat s'obtenen a partir de la polimerització dels monòmers d'alquilcianoacrilat a partir de tres mecanismes: polimerització lliure de radicals, polimerització aniònica i polimerització zwitteriònica. Tant la polimerització aniònica com la zwitteriònica són els processos dominants ja que es poden desencadenar ràpidament a temperatura ambient. Entre els agents iniciadors cal destacar els anions ( $\text{Br}^-$ ,  $\text{I}^-$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ..), bases febles, alcohols, aigua i aminoàcids que es poden trobar en teixits vius.

El mecanisme de polimerització aniònica consisteix en un procés aniònic iniciat per espècies químiques bàsiques presents en el medi de polimerització. Els radicals alquilcianoacrilat es formen principalment a partir dels ions  $\text{OH}^-$  que provenen de la dissociació de les molècules d'aigua, tot i que determinats principis actius i tensioactius amb grups bàsics també podrien actuar com a catalitzadors de la reacció de polimerització. Així, com a conseqüència de l'atac nucleòfil dels ions  $\text{OH}^-$  sobre el carboni electròfil dels alquilcianoacrilats es formen aquests radicals capaços de reaccionar amb altres molècules de monòmer originant primerament oligòmers i posteriorment polímers (Fig.1.10). La reacció finalitza en exhaurir-se el monòmer.



**Fig.1.10:** Reacció de polimerització aniònica dels alquilcianoacrilats on R correspon a un grup alquil.

Els polímers de polialquilcianoacrilat (PACA) permeten, tant l'obtenció de nanoesferes com de nanocàpsules. La major part dels processos de formació de nanopartícules descrits a la literatura es basen en la polimerització dels corresponents monòmers (Couvreur i Vauthier, 1991; Vauthier, 2003; Krauel, 2005; Arias, 2008).

La formació de nanoesferes de PACA s'esdevé per un procés de polimerització en emulsió. La polimerització d'alquilcianoacrilats en emulsió per a l'obtenció de partícules d'estructura matricial com a sistemes d'administració de fàrmacs va ser descrita per primera vegada per Couvreur et al. (1979). En aquest procés la polimerització és iniciada

per ions  $\text{OH}^-$  i l'elongació de les cadenes de polímer es produeix per polimerització aniónica. Per a aconseguir la formació de nanopartícules, es requereix l'acidificació del medi de polimerització i la utilització d'una concentració òptima de monòmer (Vauthier, 2003). La mida de les nanoesferes obtingudes pot variar entre 50 i 300 nm (Vauthier, 2003). En les nanoesferes de PACA, s'han aconseguit incorporar nombrosos principis actius, principalment de naturalesa hidròfoba (Vauthier, 2007). En els estudis de Boudad et al. (2001) es va observar que la incorporació de ciclodextrines al medi de polimerització podia afavorir l'eficiència d'associació de fàrmacs hidròfils.

Les nanocàpsules de PACA, es poden formar per polimerització interfacial en emulsions, nano-emulsions i microemulsions O/W i W/O per a obtenir nanopartícules d'estructura vesicular amb un nucli oliós i aquós respectivament, adequades per vehicular principis actius de naturalesa tant hidròfoba com hidròfila depenent de la composició interna de les partícules (Vauthier, 2003). En el cas de les nanocàpsules amb un nucli intern hidròfil destinades a l'administració parenteral, es poden transferir a una fase contínua aquosa, mitjançant la ultracentrifugació de la suspensió oliosa incorporada sobre una solució micel·lar aquosa (Lambert, 2000).

Un dels principals inconvenients de l'administració intravenosa dels sistemes col·loïdals com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs, és la seva ràpida eliminació de l'organisme per l'acció del sistema mononuclear fagocític. Per tal de reduir les interaccions de les partícules amb les opsonines, les quals afavoreixen el procés de fagocitosi, es van dissenyar nanopartícules estabilitzades estèricament amb copolímers amfifílics com els (PACA)-polietilenglicol copolímers. La síntesi de les nanopartícules amb aquest tipus de polímers no té lloc per polimerització "in situ", ja que el polímer és incorporat directament en les formulacions, sinó que es produeix per un procés de nanoprecipitació o evaporació del solvent després de la formació d'una emulsió (Vauthier, 2003). Mitjançant aquests mètodes, s'ha descrit la formació de nanoesferes i nanocàpsules de poli (polietilenglicol)cianoacrilat-cohexadecilcianoacrilat apropiades per a vehicular agents antitumorals com el tamoxifèn (Vauthier, 2007).

La superfície de les nanopartícules de PACA obtingudes per polimerització "in situ" també es pot modificar incorporant components amb grups nucleòfils que puguin reaccionar amb els monòmers d'alquilcianoacrilat tals com polisacàrids, polietilenglicol i metoximetil-polietilenglicol (Vauthier, 2007).

#### 1.2.4. Nanopartícules de poliuretà i poliurea

Els poliuretans i les poliurees han sigut àmpliament estudiats per a la seva utilització en aplicacions biomèdiques ja que presenten un elevada versatilitat química, unes excel·lents propietats mecàniques i una bona biocompatibilitat (Vermette, 2001; Nair i Laurencin, 2007). Els poliuretans s'han emprat en l'àmbit mèdic (principalment com a materials bioestables) en la fabricació de catèters, inserts vasculars, marcapassos i bosses de sang entre d'altres (Lamba, 1998; Zdrahala i Zdrahala, 1999; Vermette, 2001). En els últims anys, la síntesi de poliuretans es troba cada cop més dirigida cap a l'obtenció de materials biodegradables per a ser aplicats com a matrius en enginyeria de teixits (Zdrahala i Zdrahala, 1999; Zhang, 2000, 2002; Grad, 2003; Guan, 2005; Guelcher, 2007; Bil, 2009) i en sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs (Bouchemal, 2004; Bachelder, 2008; Sivak, 2008; Da Silva, 2009; Zhang, 2009; Huynh, 2010). Concretament, Zhang et al. (2000, 2003) van desenvolupar polímers d'uretà biodegradables i biocompatibles d'aplicació en enginyeria de teixits basats en pèptids a partir de diisocianat de lisina, glicerol i aigua i a partir de diisocianat de lisina i glucosa. Sivak et al. (2008) van dissenyar un sistema d'alliberació controlada per la 7-tert-butildimetilsilil-10-hidroxi-camptotecina basat en diisocianat de lisina i glicerol per al tractament de gliomes malignes.

De fet, els poliuretans i les poliurees constitueixen un grup de polímers potencials per aconseguir una alliberació controlada i sostinguda de substàncies biològicament actives en cèl·lules, òrgans o teixits diana ja que presenten una elevada reactivitat que permet una àmplia funcionalització de superfícies i per tant una vectorització selectiva del principi actiu (Bachelder, 2008; Da Silva, 2009; Landfester, 2009; Paiphansiri, 2009).

Ambdós tipus de polímers es poden obtenir a partir de la reacció de policondensació o poliaddició de **diisocianats** amb **alcohols i/o amines**. Com a conseqüència d'aquesta reacció s'obté una estructura química amb dominis rígids i flexibles corresponents als grups isocianats polifuncionals (diisocianats) juntament amb els extensors de les cadenes polimèriques i els poliols o poliamines respectivament. A continuació es descriuen les principals reaccions de polimerització associades als diisocianats.

##### *Reaccions de polimerització dels diisocianats*

Els diisocianats són monòmers molt utilitzats a nivell industrial per a l'obtenció de polímers amb diferents estructures ja que poden reaccionar amb una àmplia varietat de

compostos (Vermette, 2001; Ionescu, 2005; Thomson, 2005; Ashida, 2007; Król, 2008). Aquesta elevada reactivitat química es pot explicar per les estructures de ressonància del grup isocianat ( $-N=C=O$ ) representades a la figura 1.11. D'acord amb aquestes estructures, la densitat electrònica tant a l'àtom d'oxigen com al de nitrogen del grup isocianat és superior a la densitat electrònica present a l'àtom de carboni, de manera que aquest últim adquireix càrrega positiva (Ionescu, 2005, Thomson, 2005).

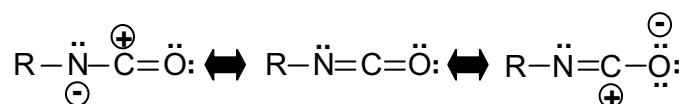


Figura 1.11: Estructures de ressonància dels isocianats

Aquesta distribució de la càrrega electrònica comporta que el carboni electròfil de l'isocianat sigui susceptible de ser atacat per un agent nucleòfil de tipus  $HX-R'$  com s'indica a la figura 1.12 (Ionescu, 2005). La reactivitat d'ambdós grups es pot veure notablement disminuïda per la presència d'impediment estèric sobre el grup isocianat o sobre el grup nucleòfil. Així mateix, els grups segrestants i donadors d'electrons també actuen modificant la reactivitat del grup  $-NCO$  augmentant-la o disminuint-la. Els isocianats aromàtics són més reactius que els isocianats alifàtics (Ionescu, 2005).

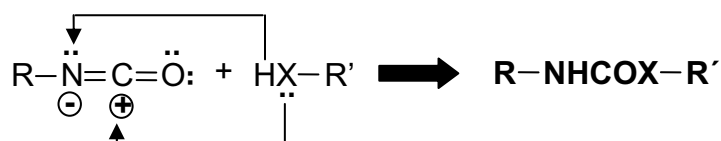


Figura 1.12: Atac nucleòfil sobre el carboni del grup isocianat

Entre els diferents agents nucleòfils que poden reaccionar amb els isocianats es troben principalment els alcohols, les amines, l'aigua i els àcids carboxílics (Vermette, 2001; Ionescu, 2005; Thomson, 2005; Ashida, 2007; Król, 2008).

La reacció que es produeix entre els isocianats i els **alcohols** és una reacció exotèrmica a partir de la qual s'obtenen els **uretans** (figura 1.13.). Per a la síntesi d'uretans, s'ha de tenir en compte que els alcohols primaris són més reactius que els secundaris i aquests al seu torn són molt més reactius que els terciaris. Els de tipus fenòlic són els de menor reactivitat per la presència d'impediment estèric sobre el grup hidroxil.

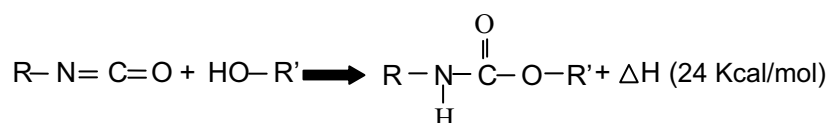
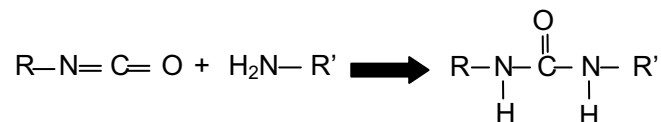


Figura 1.13: Reacció de l' isocianat amb l'alcohol

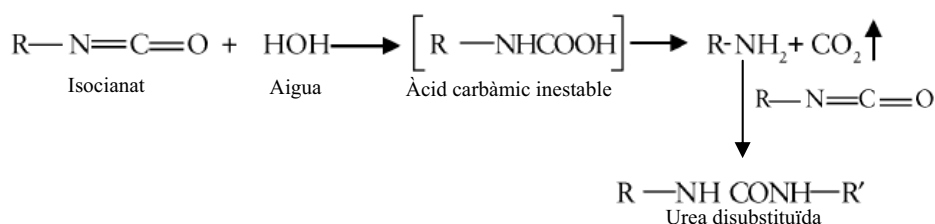


Els isocianats també poden reaccionar amb les **amines** per formar estructures de tipus **urea** (figura 1.14). La reactivitat de les amines decreix de manera semblant a l'observada en els alcohols: amines primàries alifàtiques >> amines secundàries alifàtiques >> amines aromàtiques primàries > amines aromàtiques secundàries.



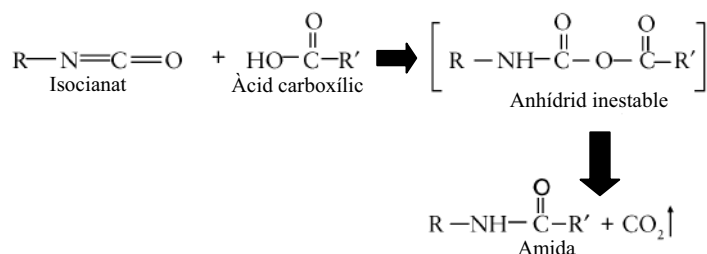
**Figura 1.14:** Reacció de l'isocianat amb l'amina

La reacció entre els isocianats i l'**aigua** dona lloc a un grup **urea** i a l'alliberació de diòxid de carboni com a productes finals (figura 1.15). Aquesta alliberació de gas permet la formació d'estructures poroses i des del punt de vista industrial és molt important en l'obtenció d'escumes de poliuretà. La reacció química que es produeix, és més exotèrmica que la dels alcohols i s'ha de tenir sempre en compte per determinar la concentració necessària d'isocianat quan s'empra un medi aquós com a medi de reacció, ja que cada mol d'aigua consumirà dos mols d'isocianat.



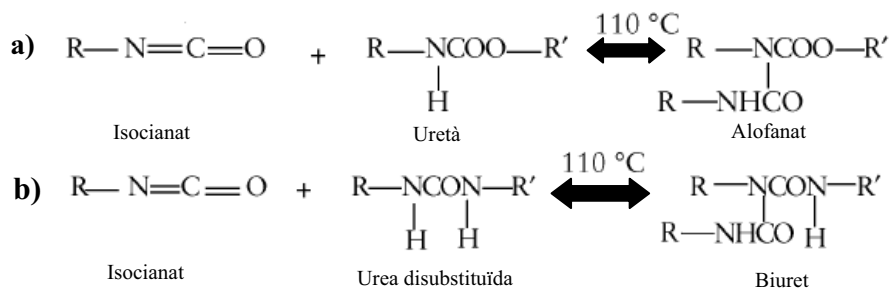
**Figura 1.15:** Reacció de l'isocianat amb aigua

La reacció dels isocianats amb els **àcids carboxílics** és més lenta que amb les amines, els alcohols i l'aigua i com a producte final s'obté una **amida** i s'allibera diòxid de carboni com es mostra a la figura 1.16.



**Figura 1.16:** Reacció de l'isocianat amb l'àcid carboxílic.

Els uretans i les urees formades en aquestes reaccions bàsiques poden actuar com a agents nucleòfils ja que presenten un hidrogen unit a un nitrogen i prosseguir la reacció amb els isocianats formant alofanat i biuret respectivament (figura 1.17). Ambdós processos són reaccions en equilibri i requereixen temperatures elevades (superiors a 110°C) per a que es produeixin degut a l'efecte segrestant del grup carbonil que actua disminuint la reactivitat. Aquestes reaccions intervenen en la ramificació i la reticulació de l'isocianat i són especialment importants quan s'utilitza un excés de monòmer.



**Figura 1.17:** Reacció entre a) l'isocianat i l'uretà i b) l'isocianat i la urea (b).

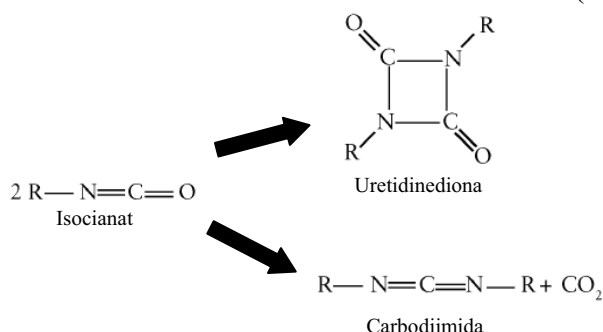
Per a la síntesi de polímers a partir d'isocianats i components nucleòfils s'ha de tenir present que les molècules amb grups amino són molt més reactives que les molècules amb grups hidroxil. A la taula 1.2 es mostren diferents agents nucleòfils ordenats en funció de la seva reactivitat envers els grups isocianats (Ionescu, 2005; Thomson, 2005).

**Taula 1.2:** Reactivitat relativa dels isocianats enfront diferents agents nucleòfils

Agent nucleòfil	Fórmula	Velocitat relativa de la reacció (sense catalitzador, 25°C)
Amina primària alifàtica	R-NH <sub>2</sub>	2500
Amina secundària alifàtica	R <sub>2</sub> -NH	500-1250
Amina primària aromàtica	Ar-NH <sub>2</sub>	5-7,5
Alcohol primari	R-CH <sub>2</sub> -OH	2,5
Aigua	HOH	2,5
Àcid carboxílic	R-COOH	1
Alcohol secundari	R <sub>2</sub> -CH-OH	0,75
Urea	R-NH-CO-NH-R	0,375
Alcohol terciari	R <sub>3</sub> -COH	0,0125
Alcohol fenòlic	Ar-OH	0,0025-0,0125
Uretà	R-NH-COOR	0,0025

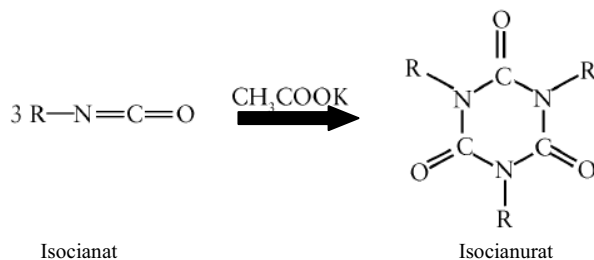
A més de les reaccions amb components amb hidrogen actiu, existeixen altres processos en els que intervenen els isocianats. Els més importants són:

- Dimerització: S'obtenen uretidinediones o carbodiimides (figura 1.18).



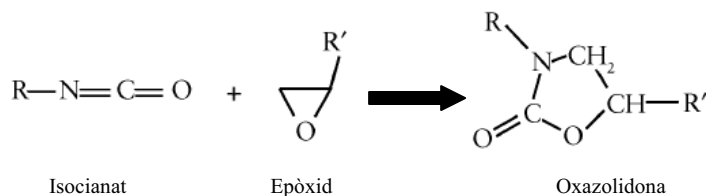
**Figura 1.18:** Reacció de dimerització dels isocianats

- Trimerització: Requereix la presència de determinats catalitzadors com són l'acetat de potassi i el tris(dimetilaminometil) fenol i com a resultat es formen isocianurats heterocíclics. Aquesta reacció s'utilitza per a la síntesi d'escumes d'isocianúric i d'isocianúric-uretà en presència d'un excés d'isocianat. El resultat és un polímer altament reticulat (figura 1.19).



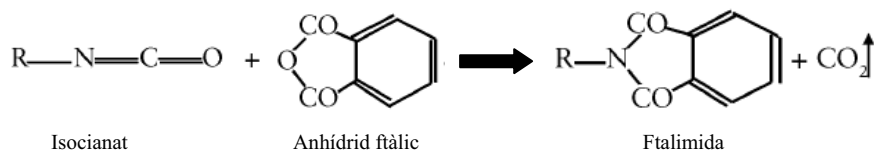
**Figura 1.19:** Reacció de trimerització dels isocianats

- Reacció amb epòxids: Requereix catalitzadors i s'utilitza per a obtenir uretans de tipus cíclic (oxazolidones). A la figura 1.20 es troba representada la reacció corresponent. Diferents autors han descrit la formació de micropartícules i nanopartícules de poliuretà utilitzant emulsions com a medi de polimerització basant-se en aquesta reacció química (Landfester 2000, Yamakazi, 2002).



**Figura 1.20:** Esquema de la formació d'oxazolidones a partir d'isocianats

- Reacció amb anhídrids cíclics: Es formen imides cícliques (figura 1.21).



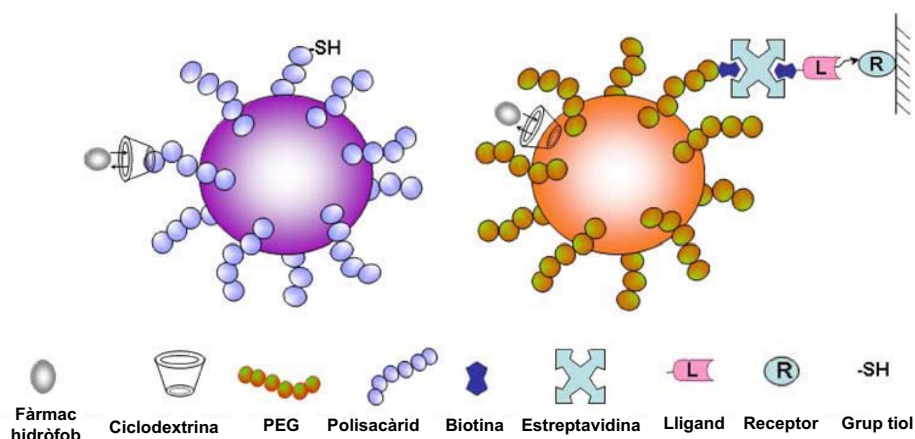
**Figura 1.21:** Esquema de la formació d'imides a partir d'isocianats

La utilització de poliuretà o poliurea com a polímer d'elecció o co-polímer per a la preparació de nanopartícules comporta un ampli ventall de possibilitats en quant a estructura química ja que es poden seleccionar diferents diisocianats, diols i extensors de cadena. Les nanopartícules de poliuretà i poliurea es poden obtenir per diferents processos que comporten una reacció de polimerització entre dos monòmers. En la literatura, s'ha descrit la formació de nanopartícules preparades per combinació d'un procés d'emulsificació espontània amb policondensació interfacial emprant solvents orgànics (Bouchemal, 2004, 2006; Montasser, 2007); per polimerització no-radical en nano-emulsions (Tiarks, 2001; Bàrrere i Landfester, 2001; Zanetti Ramos, 2003); per polimerització interfacial a partir de nano-emulsions W/O (Anton, 2009) i per policondensació interfacial tant a partir d'estructures directes (Torini, 2005; Takasu i Kawaguchi, 2005) com estructures reverses (Crespy, 2007) entre d'altres. Mitjançant aquests procediments s'ha aconseguit la formació de nanopartícules de poliuretà de diàmetre divers, comprès entre 60 i 300 nm depenent del mecanisme de polimerització, i s'ha aconseguit l'encapsulació de principis actius com l' $\alpha$ -tocoferol (Bouchemal, 2004) i l'acetat de dexametasona (Da Silva, 2009).

### 1.2.5. Nanopartícules d'administració controlada de fàrmacs amb marcadors de superfície

Un dels principals objectius del desenvolupament de nanopartícules com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs és aconseguir controlar la biodisponibilitat del principi actiu en l'òrgan o teixit diana. Aquest procés implica que el vehicle on es troba incorporat el principi actiu ha de ser capaç d'arribar als teixits i cèl·lules de l'organisme i fins i tot al compartiment intracel·lular (Vauthier i Bouchemal, 2009). Les barreres químiques i bioquímiques són generalment els principals obstacles responsables de la ràpida degradació dels principis actius, requerint l'associació amb un determinat vehicle

per tal de millorar la seva estabilitat. En general, els sistemes emprats per a la vehiculització de fàrmacs amb una mida suficientment petita podran difondre a través de les diferents barreres biològiques, permetent el transport dels principis actius des del lloc d'administració fins l'òrgan o teixit diana (Vauthier i Bouchemal, 2009). Malgrat aquesta consideració, molts dels sistemes col·loïdals estudiats són susceptibles d'opsonització i per tant són ràpidament eliminats de la circulació sanguínia, per acció del sistema mononuclear fagocític, impeding que el principi actiu arribi al lloc d'acció. Per tant, a més de la mida dels sistemes emprats com a vehicles, s'han de tenir presents les propietats de superfície, ja que jugaran un paper clau en el control del procés d'alliberació i transport del principi actiu. En aquest sentit, s'han dut a terme nombrosos esforços per modificar i funcionalitzar les superfícies dels sistemes d'alliberació de fàrmacs, per tal d'aconseguir una major especificitat d'acció i un major temps en circulació sanguínia que permeti que el fàrmac pugui assolir el lloc d'acció (Vauthier i Bouchemal, 2009). A la Fig. 1.22 es troben representats els sistemes de funcionalització més utilitzats en les nanopartícules polimèriques.



**Fig.1.22:** Representació esquemàtica de les diferents funcionalitzacions que es poden dur a terme en nanopartícules (Fig. adaptada de Vauthier i Bouchemal, 2009)

Els copolímers amfifílics són especialment útils ja que les cadenes hidròfobes s'endinsen cap al nucli de les partícules, mantenint els copolímers ancorats a les partícules, i les cadenes hidròfiles es disposen sobre la superfície conferint a la partícula propietats específiques. Així la presència de grups tiols, per exemple, confereix propietats mucoadhesives que afavoriran la permeació a nivell de l'epiteli intestinal (Vauthier i Bouchemal, 2009). El recobriment amb polietilenglicol permet controlar la biodistribució de les nanopartícules, ja que redueix els processos d'opsonització,

permetent una major permanència de les nanopartícules en circulació sanguínia (Vauthier i Bouchemal, 2009).

Entre les funcionalitzacions de superfície i els lligands que permeten un reconeixement específic de les cèl·lules diana es troben les ciclodextrines, la biotina i l'estreptavidina. Aquestes molècules actuen principalment com a plataforma d'ancoratge per altres lligands que podran unir-se a receptors específics (veure Fig. 1.22) (Vauthier i Bouchemal, 2009).

## **2. OBJECTIUS**

---

## 2. OBJECTIUS

Les nano-emulsions són emulsions amb una mida de gota molt petita, del rang de nanòmetres, que poden formar-se a baixes concentracions de tensioactiu. Degut a les seves propietats específiques (mida de gota, elevada estabilitat cinètica i transparència òptica) tenen importants aplicacions en indústria química, cosmètica i farmacèutica (Solans et al., 2005; Gutiérrez et al., 2008). En aquest sentit, una de les principals aplicacions tecnològiques és la seva utilització com a medi de polimerització per a l'obtenció de nanopartícules, emprant-se les gotes de nano-emulsió com a plantilles (Anton et al., 2008). Per altra banda, les nanopartícules confereixen una rigidesa morfològica al sistema col·loïdal inicial que conjuntament amb la petita mida de partícula fan que aquestes composicions siguin idònies com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs. De fet, tant les nano-emulsions com les nanopartícules es consideren com a vehicles d'innovació tecnològica i ocupen un lloc important entre els nous sistemes terapèutics capaços d'aconseguir una vectorització selectiva del principi actiu.

En els darrers anys l'elaboració de nanopartícules a partir de nano-emulsions ha estat àmpliament estudiada, principalment en nano-emulsions obtingudes mitjançant mètodes d'emulsificació d'alta energia (Landfester, 2006). No obstant, s'han dut a terme relativament poc estudis relacionats amb la formació de nanopartícules a partir de nano-emulsions preparades per mètodes de condensació o de baixa energia (Santos-Magalhães et al., 2000; Anton et al., 2009). A més, la gran majoria d'aquests treballs fan referència a composicions del tipus aigua en oli (W/O).

D'acord amb aquestes premisses, l'objectiu principal del treball d'investigació realitzat en el marc de la present tesi doctoral ha estat estudiar la formació de nanopartícules polimèriques a partir de nano-emulsions de fase externa aquosa (O/W), obtingudes per mètodes d'emulsificació de baixa energia, en sistemes aigua/ tensioactiu no iònic: co-tensioactiu/ component oliós amb excipients biocompatibles i adequats per a l'administració per via parenteral i tòpica. Una de les fites més importants d'aquest treball d'investigació ha consistit en desenvolupar sistemes nanoestructurats recoberts amb polietilenglicol i biomaterials que podrien incrementar la biodisponibilitat d'aquests sistemes col·loïdals.



Aquest objectiu principal inclou els següents objectius específics:

1. Estudiar la formació de nano-emulsions O/W mitjançant mètodes de condensació en sistemes aigua/tensioactiu no iònic/co-tensioactiu/ component oliós.
2. Optimitzar formulacions de nano-emulsions per tal d'obtenir una mida de gota, una polidispersitat i una estabilitat adequades per a la posterior formació de nanopartícules.
3. Estudiar l'estabilitat de les nano-emulsions O/W.
4. Incorporar principis actius pràcticament insolubles en aigua en nano-emulsions O/W amb una elevada concentració d'aigua
5. Estudiar les nano-emulsions O/W com a sistemes d'administració de fàrmacs per via cutània i transdèrmica.
6. Estudiar la formació de nanopartícules polimèriques a partir de les nano-emulsions O/W.
7. Optimitzar les composicions corresponents a nanopartícules amb la finalitat d'obtenir sistemes de baixa polidispersitat amb la menor mida de partícula possible que siguin adequats com a sistemes d'alliberació de fàrmacs.
8. Caracteritzar i estudiar l'estabilitat de les nanopartícules en suspensió aquosa.
9. Incorporar principis actius pràcticament insolubles en aigua en nanopartícules polimèriques amb una elevada eficiència d'encapsulació i estudiar la seva alliberació.

El pla de treball desenvolupat per a assolir els objectius descrits anteriorment s'ha dut a terme en dos grans blocs que es detallen a continuació:

### **Formació, caracterització i propietats de nano-emulsions O/W:**

- Seleccionar tensioactius i components oliosos biocompatibles i adequats per a la formació de nano-emulsions i nanopartícules per a la seva administració per via parenteral i tòpica.
- Estudiar la formació de nano-emulsions mitjançant l'estudi del comportament fàsic de sistemes pseudo-ternaris aigua/ tensioactiu- co-tensioactiu / component oliós a 25°C en condicions de no-equilibri.

- Caracteritzar les nano-emulsions obtingudes determinant el diàmetre de les gotes de la fase interna mitjançant tècniques de dispersió dinàmica de la llum làser (espectroscòpia de correlació fotònica).
- Estudiar la influència de les variables de composició en la formació de les nano-emulsions O/W.
- Estudiar l'estabilitat de les nano-emulsions O/W determinant les variacions del diàmetre de gota en funció del temps, mitjançant espectroscòpia de correlació fotònica (DLS).
- Solubilitzar un principi actiu (ketoprofèn) a les nano-emulsions seleccionades i caracteritzar-les una vegada s'ha incorporat el fàrmac per DLS.
- Estudiar l'estabilitat de les nano-emulsions O/W amb el principi actiu incorporat mitjançant DLS, determinant les modificacions de la mida de les gotes amb el temps.
- Estudiar *in vivo* la tolerància de les nano-emulsions en ser aplicades sobre la superfície de la pell a partir de la determinació de la cromaticitat i del paràmetre TEWL .
- Estudiar la permeació cutània *ex vivo* del ketoprofèn solubilitzat a les nano-emulsions a la concentració de saturació mitjançant cel·les de difusió de Franz.
- Estudiar *in vitro* l'alliberació del principi actiu (ketoprofèn) des de les nano-emulsions cap a una solució receptora.

### **Formació de nanopartícules polimèriques a partir de nano-emulsions O/W**

- Seleccionar nano-emulsions amb un elevat contingut d'aigua, amb la mínima concentració de tensioactiu i la màxima concentració d'oli per a obtenir un petit diàmetre de gota i un baix índex de polidispersitat, estables a 25°C durant un mínim de temps de 24 hores, per a la preparació de nanopartícules.
- Seleccionar monòmers que permetin la formació de nanopartícules biodegradables i biocompatibles adequades per a la seva utilització com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs.
- Incorporar els monòmers a les nano-emulsions O/W i estudiar la influència dels factors crítics que intervenen en el procés de polimerització.

- Caracteritzar les nanopartícules obtingudes determinant el diàmetre de partícula en suspensió aquosa mitjançant DLS.
- Estudiar l'estabilitat de les nanopartícules determinant les variacions del diàmetre de partícula en funció del temps mitjançant DLS.
- Avaluar l'eficàcia de les tècniques d'ultracentrifugació i liofilització per a incrementar l'estabilitat de les nanopartícules.
- Caracteritzar estructuralment les nanopartícules obtingudes mitjançant tècniques microscòpiques (Microscòpia Electrònica de Transmissió (TEM), Microscòpia de Força Atòmica (AFM) i Microscòpia Confocal) i espectroscòpiques (Transformada de Fourier en Espectroscòpia d'Infraroig (FT-IR)).
- Incorporar un principi actiu a la suspensió de nanopartícules i determinar la concentració màxima de fàrmac, l'eficiència d'encapsulació i el diàmetre de partícula amb el principi actiu incorporat.
- Estudiar *in vitro* l'alliberació del principi actiu des de les suspensions de nanopartícules cap a una solució receptora.

### **3. EXPERIMENTAL**

---

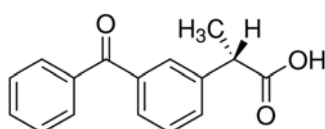
### 3. EXPERIMENTAL

#### 3.1. MATERIALS

##### 3.1.1. Principi actiu

##### Ketoprofèn , *Sigma*

El Ketoprofèn (Figura 3.1) és un derivat de l'àcid fenilpropioníc que correspon a l'àcid 3-benzoil-alfa-metilbenzoacètic. Pertany al grup dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) i posseeix propietats antiinflamatòries, analgèsiques i antipirètiques. El seu mecanisme d'acció consisteix en la inhibició competitiva i reversible de la ciclooxigenasa impedit d'aquesta manera la síntesi de prostaglandines, prostaciclins i tromboxà. El ketoprofèn és una mescla racèmica, essent el dexketoprofèn (enantiòmer -S(+)) el que posseeix una acció analgèsica més gran (Martindale, 2009; Catálogo de Medicamentos, 2009).



**Figura 3.1:** Fòrmula estructural del ketoprofèn

Aquest principi actiu es presenta en forma de pols cristal·lina, de color blanc o quasi blanc i té un punt de fusió comprès entre 94 i 97°C. És pràcticament insoluble en aigua i fàcilment soluble en acetona, alcohol i clorur de metilè (Real Farmacopea Española, 2005).

Respecte a la seva farmacocinètica, el ketoprofèn s'absorbeix al tub digestiu assolint-se la concentració plasmàtica màxima entre 30 i 120 minuts després de ser administrat. Quan s'administra conjuntament amb aliments malgrat que no es modifica la seva biodisponibilitat, es produeix un alentiment de la velocitat d'absorció. Presenta una bona absorció quan s'administra per via intramuscular i rectal però en canvi quan s'aplica per via tòpica únicament s'absorbeix una petita quantitat del principi actiu. El ketoprofèn s'uneix un 99% a les proteïnes plasmàtiques podent-se detectar quantitats importants de fàrmac al líquid sinovial. Té una semivida plasmàtica entre 1,5 i 4 hores, es metabolitza principalment per glucuronoconjugació i s'excreta per l'orina (Martindale, 2009; Catálogo de Medicamentos, 2009).

Des del punt de vista terapèutic s'empra per al tractament de processos patològics de caràcter reumàtic i articular com l'espondilitis anquilosant, l'osteoartritis, l'artritis reumatoide, la bursitis i la tendinitis. També s'utilitza per al tractament de la dismenorrea, del dolor postoperatori, d'afeccions doloroses i inflamatòries com la gota i té utilitat com antitèrmic. Es pot aplicar en forma de gel al 2,5% per a alleugerir dolors lleus focalitzats (Martindale, 2009; Catálogo de Medicamentos, 2009).

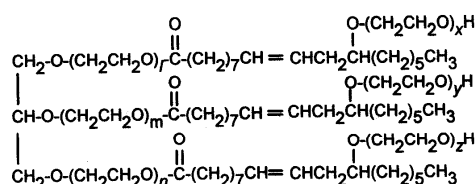
Com a efectes adversos es pot produir dolor en el punt d'injecció i rarament lesió tissular quan s'administra per via intramuscular. Per via rectal pot produir una petita irritació local. Està contraindicat en pacients amb insuficiència cardíaca i s'ha d'utilitzar amb precaució en pacients amb insuficiència renal o hepàtica. S'han descrit reaccions de fotosensibilitat i d'hipersensibilitat i algun cas de pancreatitis associat al ketoprofèn (Martindale, 2009).

### 3.1.2. Excipients

Els excipients utilitzats per a la realització d'aquest treball es detallen a continuació.

#### 3.1.2.1. Tensioactius

**Cremophor<sup>®</sup> EL, BASF** (oli de ricí amb 35 mols d'òxid d'etilè)



**Figura 3.2:** Estructura general dels tensioactius derivats de l'oli de ricí hidrogenat

És un líquid oliós, de color groc clar, transparent a temperatures superiors als 26°C i amb una olor característica (Rowe, 2009).

El Cremophor EL és un tensioactiu no iònic que s'obté a partir de la reacció d'un mol d'oli de ricí amb 35 mols d'òxid d'etilè (BASFa, 2008). Aquest tensioactiu es compon principalment de ricinoleat de glicerina-poliètilenglicol que conjuntament amb els èsters poliglicòlics d'àcids grassos suposa la fracció hidròfoba del producte. Aquesta porció hidròfoba constitueix aproximadament un 83% de la mescla total. La part hidròfila (17%) està formada per poliètilenglicols i etoxilats de glicerina (Rowe, 2009).

El Cremophor EL presenta un HLB comprès entre 12 i 14 i una concentració micel·lar crítica aproximadament del 0,02% (BASFa). És soluble en aigua i etanol donant lloc a solucions transparents, però també en diferents solvents orgànics com alcohol etílic, alcohol n-propílic, alcohol isopropílic, cloroform, acetat d'etil, tetraclorur de carboni, tricloretilè, benzè, toluè i xilè. En escalfar és miscible en àcids, alcohols i olis grassos, com per exemple àcid esteàric, àcid oleic, alcohol dodecíllic i octadecíllic i oli de ricí i en moltes substàncies liposolubles. La seva solubilitat en aigua disminueix amb la temperatura donant lloc a solucions aquoses tèrboles (BASFa).

Pel que fa a l'estabilitat, el Cremophor EL és estable en solució aquosa amb baixes concentracions d'electròlits. Tot i això, és susceptible de formar precipitat en presència de clorur de mercuri i de determinades concentracions de compostos orgànics amb grups hidroxil fenòlics (fenol, resorcina i tanins). Cal destacar que les solucions aquoses amb Cremophor EL es poden esterilitzar amb autoclau durant 20 minuts a 121°C produint-se un enfosquiment que no afecta l'estabilitat de la formulació (BASFa).

El Cremophor EL s'utilitza freqüentment en la indústria farmacèutica en formulacions orals, tòpiques i d'administració parenteral. S'empra principalment com agent emulgent i solubilitzant i per a la preparació de solucions aquoses líquides que continguin olis volàtils, vitamines liposolubles i altres principis actius hidròfobs com anestèsics locals, sedants, antifúngics i agents immunosupressors entre d'altres (Gelderblom, 2001; Strickley, 2004, 2006). També s'ha utilitzat com a solvent per a la preparació d'injectables de diazepam i en la producció de supositoris de glicerina (Rowe, 2009). Per via ocular s'ha emprat com a agent regulador en solucions aquoses (gotes) de tropicamida (Carmignani, 2002). Cal destacar que en els últims anys s'han desenvolupat sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs amb Cremophor EL que augmenten la biodisponibilitat oral de principis actius com la halofantrina (Holm, 2003) i la simvastatina (Kang, 2004).

En cosmètica és important per a la solubilització de perfums i olis essencials en solucions hidroalcohòliques (30-50% v/v d'etanol o isopropanol ) i com a substitutiu de l'oli de ricí en locions de mans (Rowe, 2009).

En veterinària s'empra per a emulsionar l'oli de fetge de bacallà, i altres olis i greixos incorporats en productes d'alimentació animal (Rowe, 2009).

Els tests de toxicitat aguda i crònica consideren el Cremophor EL com una substància no tòxica i no irritant (BASFa). Malgrat els resultats obtinguts en els estudis de toxicitat, el

Cremophor EL pot donar lloc a reaccions d'hipersensibilitat quan s'empra a elevades concentracions com en el cas de les preparacions de Taxol (Tije, 2003, Aronson, 2006).

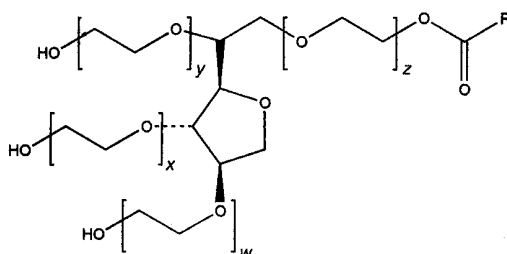
**Cremophor WO7, BASF** (oli de ricí amb 7 mols d'òxid d'etilè)

A 25°C és un líquid viscos, tèrbol, lleugerament groguenc que presenta una olor característica (BASFd, 2010).

S'obté a partir de la reacció d'oli de ricí hidrogenat amb 7 mols d'òxid d'etilè. És un tensioactiu no iònic que presenta un valor d'HLB entre 4 i 6. És insoluble en aigua i dispersable en parafina líquida. En relació a la seva estabilitat, és estable durant com a mínim dos anys si s'emmagatzema en envasos estancs, en lloc secs i a temperatura ambient (BASFd, 2010).

El Cremophor WO7 s'utilitza principalment en cosmètica per a la preparació d'emulsions de fase externa oliosa com poden ser llets i cremes lleugeres (BASFd, 2010).

**Tween® 80, ICI** (monooleat de sorbità amb 20 mols d'òxid d'etilè; PM: 1310 g/mol)



$$w+x+y+z=20 \text{ ( Tween 80)}$$

**Figura 3.3:** Estructura general dels monoèsters de sorbità polioxiètilenat

A 25°C és un líquid oliós, groguenc que presenta una olor característica (Rowe, 2009).

S'obté a partir del sorbitol en un procés químic que consisteix en l'eliminació d'aigua del sorbitol per a formar el sorbità (sorbitol cíclic anhidre) que serà parcialment esterificat amb un àcid gras (àcid oleic), per finalment, en presència d'un catalitzador i d'òxid d'etilè (20 mols d'òxid d'etilè reaccionen amb un mol de sorbitol anhidre (USP29-NF 24, 2006)), donar lloc al polisorbitat (Rowe, 2009).

El Tween 80 és un tensioactiu no iònic amb un valor d'HLB de 15,0; és soluble en etanol i aigua i insoluble en olis minerals i vegetals. És estable en presència d'electròlits,

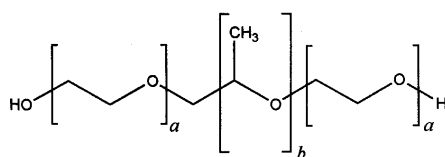


àcids i bases febles, però dóna reacció de saponificació si aquests són forts i és sensible a l'oxidació. Per tant, per a evitar la formació de peròxids s'ha de conservar protegit de la llum. En presència de fenols, tanins i quitrans es poden produir reaccions de decoloració i/o precipitació. Pot disminuir l'activitat antimicrobiana d'agents conservants com els parabens (Rowe, 2009).

S'utilitza àmpliament en la indústria farmacèutica com a agent emulgent en la preparació de microemulsions i emulsions de fase externa aquosa (concentració 1-15 %), com a agent solubilitzant per a una àmplia gamma de principis actius liposolubles (olis essencials, vitamines liposolubles) a una concentració compresa entre l'1 i el 10%, i com agent humectant en la formulació de suspensions orals i parenterals (concentració entre 0,1-3%) (Rowe, 2009; Strickley, 2006). Una altra aplicació important dels polisorbats és que aconseguen millorar la biodisponibilitat oral de fàrmacs que són substrat de la *p*-glicoproteïna (Zhang, 2003)

Els polisorbats (Figura 3.3) són també àmpliament utilitzats en cosmètica i alimentació. Malgrat les seves aplicacions en indústria el Tween 80 és moderadament tòxic per via intravenosa i pot produir irritació ocular quan s'empra a elevades concentracions ( $\geq 10\%$ p/v) (Rowe, 2006).

**Lutrol<sup>®</sup> F 68**, **BASF** (a=80;b=27, PM promig =7680-9510) i **Lutrol<sup>®</sup> F127**, **BASF**(a=101, b= 56, PM promig: 9840-14600)



**Figura 3.4:** Estructura general dels poloxàmers

El Lutrol F68 (Poloxàmer 188) i el Lutrol F127 (Poloxàmer 407) són substàncies sòlides i ceroses a temperatura ambient amb una olor molt feble, de color blanc o lleugerament groguenc que es presenten en forma de petits grànuls (BASFb).

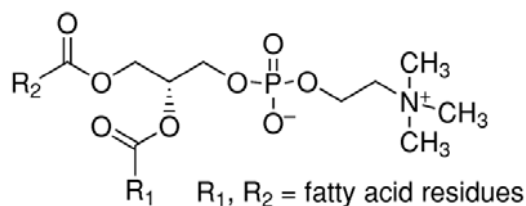
S'obtenen per la reacció de polimerització seqüencial d'òxids de propilè i òxids d'etilè. Així, en condicions d'elevada pressió i temperatura, en atmosfera inert i anhidra i en presència d'un catalitzador alcalí, els òxids de propilè són adicionats al propilenglicol iniciador per a formar polioxipropilenglicol. Posteriorment s'incorporen els òxids d'etilè

que donen lloc als copolímers i finalment es neutralitza el producte resultant amb un àcid a pH 7 (Rowe, 2009). Els Lutrols es caracteritzen perquè la porció hidròfoba la constitueix el segment d'òxid de propilè mentre que el fragment hidròfil el formen els dos segments d'òxid d'etilè (Rowe, 2009). Per tant, els Lutrols són copolímers sintètics d'òxids d'etilè i òxids de propilè (USP29-NF 24, 2006) (Figura 3.4))

Pel que fa a les seves propietats, ambdós Lutrols són tensioactius no iònics amb un número HLB de 29 per al Lutrol F68 i comprès entre 18 i 23 per al Lutrol F127. Tenen un punt de fusió entre 52 i 57°C i són solubles en etanol i aigua formant solucions translúcides (es comporten com a fluids newtonians a concentracions inferiors al 60%) mentre que són insolubles en dietil èter, parafina i olis grassos. La solubilitat en solvents orgànics com el clorur de metilè, el cloroform i l'acetoneitril és del 35, 40 i 20% respectivament i per a l'acetona i l'acetat d'etil inferior al 2% en el cas del Lutrol F 68 (Rowe, 2009).

En solució aquosa són estables enfront l'acció d'àcids, bases i ions metàl·lics però donen lloc a incompatibilitats amb fenols i parabens (Rowe, 2009).

Els Lutrols són agents emulgents i co-emulgents, solubilitzants, dispersants i humectants (Rowe, 2009). Degut a que són tensioactius considerats com no tòxics i no irritants, s'utilitzen en una àmplia varietat de formulacions farmacèutiques d'administració oral, parenteral i tòpica (Rowe, 2009). S'empren principalment en indústria farmacèutica com agents emulgents per a la formulació d'emulsions d'administració intravenosa i com a solubilitzants (la seva capacitat de solubilització no depèn de la formació de micelles). També s'empren com agents dispersants i humectants per a preparar dispersions sòlides i per a millorar la solubilitat, l'absorció i la biodisponibilitat de principis actius poc solubles en formes farmacèutiques d'administració oral (Rowe, 2009). Per altra banda, el Lutrol F68 també pot ser utilitzat com a co-tensioactiu en cremes i emulsions, com a estabilitzant de les suspensions i com a lubricant en la formulació de comprimits (Rowe, 2009). Una altra aplicació és la seva utilitat com a agent emulgent en fluorocarbons (substituts sanguinis artificials (Rowe, 2009)) i més recentment s'ha emprat en sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs (micropartícules, nano-emulsions i nanopartícules (Calvo, 1997; Vega, 2006; Huang, 2007)). Des del punt de vista terapèutic el Lutrol F 68 s'administra oralment com agent humectant i lubricant en el tractament de la constipació en combinació amb un laxant, i es pot utilitzar també com a humectant en formulacions d'administració ocular (Rowe, 2009).

**Epikuron 170 (lecitina de soja purificada), *Degussa Bioactives*****Figura 3.5:** α- Fosfatidilcolina

L'Epikuron 170 és una lecitina purificada que s'obté a partir de l'oli de soja a través d'un procés de refinació que consisteix en l'extracció dels lípids polars amb hexà que és eliminat posteriorment per donar lloc a l'oli vegetal cru. Per extracció d'aigua s'obté la lecitina que és posteriorment assecada i purificada (Rowe, 2009).

Les lecitines es poden presentar com a líquids viscosos o en forma sòlida en funció del seu contingut en àcids grassos lliures. El seu color pot variar des de marronós fins a groc pàl·lid depenent de si s'han blanquejat o no i del seu grau de puresa. S'han de mantenir protegides de l'aire ja que s'oxiden ràpidament donant lloc a un producte amb una coloració característica entre groc fosc i marró. Pràcticament són inodores i aquelles que deriven d'olis vegetals com l'Epikuron tenen un gust insípid semblant al de l'oli de soja (Rowe, 2009).

Les lecitines es componen principalment de fosfatidilcolina (l'Epikuron 170 conté aproximadament un 70% de fosfatidilcolina), fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina i fosfatidilinositol combinats amb diverses quantitats d'altres substàncies com triglicèrids, àcids grassos i carbohidrats (Rowe, 2009).

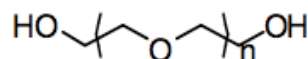
Són solubles en hidrocarburs alifàtics, aromàtics i halogenats, en oli de parafina i en àcids grassos i són pràcticament insolubles en olis freds vegetals i animals, solvents polars i aigua. Quan es mesclen amb l'aigua, les lecitines s'hidraten ja que són substàncies molt higroscòpiques i formen emulsions. Es descomponen a pH extrems, són susceptibles de patir degradació microbiana i en presència d'esterases s'hidrolitzen. A temperatures elevades, les lecitines s'oxiden, s'enfosqueixen i es descomponen donant lloc a la reacció de Maillard (temperatures entre 160 i 180°C provoquen la degradació en 24 hores). Per tant, s'han de conservar en envasos estancs, protegits de la llum i de l'oxidació (Rowe, 2009).

Les lecitines són tensioactius amfòters que s'empren en una àmplia varietat de productes farmacèutics com a dispersants, emulsificants i estabilitzants gràcies a la seva elevada

biocompatibilitat ja que és un component de les membranes cel·lulars que s'ingereix normalment amb la dieta. S'inclouen en injeccions intravenoses i intramusculars i en formulacions de nutrició parenteral (Benita, 1993; Klang, 1998) i productes d'aplicació tòpica com cremes i unguents (Verma, 2004). S'utilitzen com a bases en la preparació de supositoris per a reduir-ne la fragilitat, en la preparació de liposomes com a nous sistemes d'alliberació i en les formulacions d'insulines d'administració intranasal entre d'altres. Són també molt emprades en la indústria alimentària i cosmètica (Rowe, 2009). Pel que fa a la seva toxicitat, quan les lecitines s'administren per via tòpica es consideren com no tòxiques i no sensibilitzants de la pell (Rowe, 2009).

### 3.1.2.2. Co-tensioactius

#### **Polietilenglicol 400 (PEG 400) i polietilenglicol 200 (PEG 200), Sigma**



**Figura 3.6:** Estructura general dels polietilenglicols

El polietilenglicol 200 i el polietilenglicol 400 es presenten com a líquids viscosos, transparents, incoloros o lleugerament groguencs que tenen una olor característica i un gust amarg que dona una lleugera sensació de cremor. Son polímers d'addició que s'obtenen per la reacció de l'òxid d'etilè i l'aigua sota pressió en presència d'un catalitzador (USP 29 NF 24, 2006). Els polietilenglicols líquids són agents molt higroscòpics i tenen una densitat a 25°C entre 1,11 i 1,14 g/cm<sup>3</sup>. Són solubles en aigua, acetona, alcohols, benzè, glicerina i glicols i miscibles en totes les proporcions amb altres polietilenglicols (Rowe, 2009).

Són químicament estables a l'aire i en solució ja que no són susceptibles de contaminació microbiana i no s'enrancien. Poden ser esterilitzats mitjançant autoclau, filtració i radiació gamma (Bhalla, 1983). S'han d'emmagatzemar en envasos ben tancats, preferiblement d'acer, alumini o vidre en un lloc fresc i sec ja que es pot produir l'oxidació si s'exposen durant llargs períodes de temps a temperatures superiors als 50°C. Són incompatibles amb alguns agents colorants i poden disminuir l'activitat antibacteriana d'alguns antibiòtics especialment de la penicil·lina i la bacitracina i l'eficàcia dels parabens com a conservants. La seva reactivitat química està relacionada

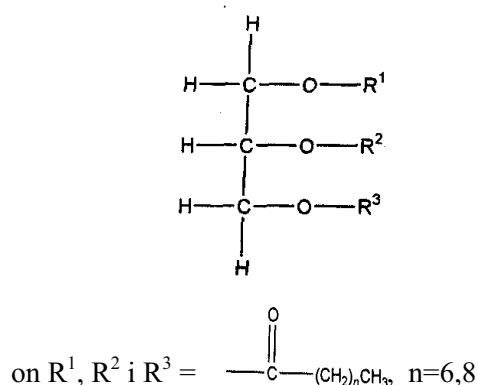
principalment amb els grups hidroxils terminals que poden donar lloc a la formació d'èters i èsters (Rowe, 2009).

Els polietilenglicols s'utilitzen en una àmplia varietat de formulacions farmacèutiques d'administració parenteral, tòpica, oftàlmica, oral i rectal. En solucions aquoses els polietilenglicols actuen principalment com a reguladors de la viscositat mentre que en la formulació d'emulsions, en presència d'altres tensioactius, afavoreixen l'estabilitat. El PEG 400 s'ha emprat també com a vehicle en formes farmacèutiques d'administració parenteral a concentracions fins a un 30% v/v. Els PEGs són també molt utilitzats per a millorar la solubilitat de principis actius poc solubles en aigua (Rowe, 2009). Recentment s'estan utilitzant en sistemes d'alliberació controlada com hidrogels d'uretà, micropartícules i nanopartícules entre d'altres. S'està estudiant també la seva utilització en el recobriment de nanopartícules d'administració parenteral per a evitar el reconeixement de les cèl·lules del sistema reticulo-endotelial i la consegüent eliminació del torrent sanguini (Fontana, 2001, Langer, 1995).

En general es consideren com a substàncies no tòxiques ni irritants tot i que s'han descrit reaccions adverses associades a la utilització de PEGs de baix pes molecular. Quan s'administren per via tòpica poden donar lloc a reaccions d'hipersensibilitat, especialment sobre mucoses. En pacients que presentin cremades o ferides obertes s'han d'extremar les precaucions ja que s'han descrit casos d'hiperosmolaritat, acidosi metabòlica i disfunció renal (Rowe, 2009).

### 3.1.2.3. Components oliosos

**Miglyol® 812, Roig Farma,S.A** (Triglicèrids de cadena mitja d'àcid caprílic i càpric)



**Figura 3.7:** Estructura general dels triglicèrids de cadena mitja

El Miglyol 812 és un líquid oliós, lleugerament groguenc, neutre al gust i a l'olfacte. Solidifica als 0°C i té una densitat a 20°C de 0,94-0,95 g/cm<sup>3</sup> (Rowe, 2009). És un triglicèrid (Figura 3.7) que s'obté de l'oli extret de l'endosperma de *Cocos nucifera*. Es compon d'una mescla de triglicèrids d'àcids grassos saturats, principalment caprílic (C<sub>8</sub>, 50-80%) i capric (C<sub>10</sub>, 20-50%) però també d'àcid caproic (<2%), àcid làuric (<3%) i àcid mirístic (<1%) (Rowe, 2009).

És soluble en acetona, benzè, tetraclorur de carboni, cloroform, diclorometà, 2-butanona, etanol, èter, acetat d'etil, isopropanol, toluè i xilè; és miscible en triglicèrids de cadena llarga i pràcticament insoluble en aigua (Rowe, 2009).

Malgrat que és estable en un ampli marge de temperatures, es recomana mantenir el producte entre 25 i 40°C per a la seva conservació. És susceptible de contaminació microbiana hidrolitzant-se per l'acció de lipases i donant lloc a àcids grassos lliures de cadena mitja que produeixen olors desagradables (Rowe, 2009).

El Miglyol 812 s'utilitza en formulacions farmacèutiques d'administració oral, parenteral i tòpica degut a les seves propietats com a solvent, emol·lient i potenciador de la permeació. En formulacions orals, s'empra per a la preparació d'emulsions, microemulsions, solucions o suspensions de principis actius que són inestables o insolubles en aigua (Rowe, 2009). El Miglyol 812, degut a la seva acció antiadherent i lubricant també es pot utilitzar en la formulació de comprimits, càpsules i dragees (Rowe, 2009). Pel que fa a la via parenteral, s'utilitza principalment en la preparació d'emulsions, solucions i suspensions intravenoses. En règims de nutrició parenteral total sol emprar-se en combinació amb triglicèrids de cadena llarga (Rowe, 2009).

Una altra aplicació important a destacar és la seva acció terapèutica. Així, els triglicèrids de cadena mitja també poden utilitzar-se com agents nutricionals en malalties de malabsorció de greixos com la fibrosi quística, ja que es reabsorbeixen més ràpidament que els de cadena llarga, i arriben a circulació sanguínia directament sense que sigui necessària la seva dissociació i reesterificació (Rowe, 2009).

En cosmètica, els triglicèrids de cadena mitja són emprats com a components d'ungüents, cremes i emulsions fluides (Rowe, 2009).

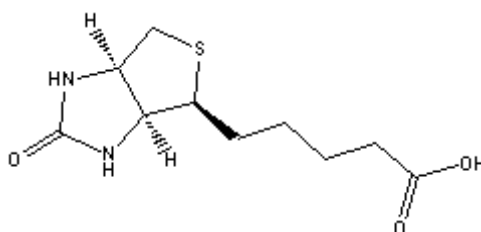
Cal destacar que aquests components presenten avantatges importants respecte els triglicèrids de cadena llarga ja que s'estenen fàcilment sobre la pell sense deixar brillantor, són molt ben tolerats, penetren fàcilment sense produir oclusió, presenten bones propietats emol·lients i solvents i són estables front l'oxidació. No són tòxics ni irritants (Rowe, 2009).

### 3.1.2.4. Components aquosos

Com a component aquós per a l'elaboració de les composicions s'ha emprat aigua desionitzada, obtinguda per resines de bescanvi iònic i filtrada (Sistema Milli-Q<sup>®</sup>, Millipore).

### 3.1.2.5. Biomaterials

#### Biotina, *Sigma*



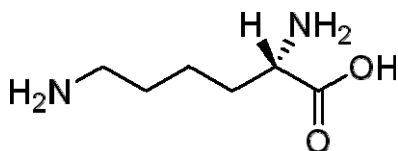
**Figura 3.8:** Fórmula estructural de la biotina

La biotina es presenta en forma de pols blanca o de solució incolora que s'ha de conservar a una temperatura entre 2 i 8 °C. El seu punt isoelèctric és de 3,5 i té un punt de fusió entre 232 i 233°C. És soluble en aigua a una concentració de 0,22 % p/v i etanol (0,8% p/v) a 25°C (Real Farmacopea española, 2005; USP -32 NF 26; Sigma–Aldrich a, 2008). La solubilitat en aigua augmenta amb la temperatura i en medi bàsic. És soluble en hidròxid d'amoni 2M (5% p/v), donant lloc a una solució transparent, incolora i en dimetilformamida (0,17% p/v). Les solucions moderadament àcides i neutres són estables durant mesos mentre que les bàsiques són menys estables (estabilitat acceptable fins a un pH de 9). Les solucions aquoses són molt susceptibles de que es produeixi creixement fúngic, podent-se esterilitzar les solucions àcides per calor (Sigma- Aldrich a, 2008).

La biotina, també anomenada vitamina H i coenzim R, és un factor de creixement present en petites quantitats a les cèl·lules vives. Es pot trobar en aliments com els llevats i la llet (Martindale, 2009). La D-biotina intervé activament en els processos naturals de carboxilació i es troba principalment unida a proteïnes o polipèptids. És molt abundant al fetge, ronyons i pàncrees. Cal destacar que els nivells de biotina es troben incrementats en processos tumorals respecte als teixits normals.

Com a resultat de la unió amb l'avidina i proteïnes relacionades com l'estreptavidina, s'inactiva per les interaccions lligands-proteïna, fet que s'aprofita per a diverses aplicacions immunoquímiques (Sigma-Aldrich a, 2008).

**L-Lisina, Fluka**



**Figura 3.9:** Fórmula estructural de la lisina

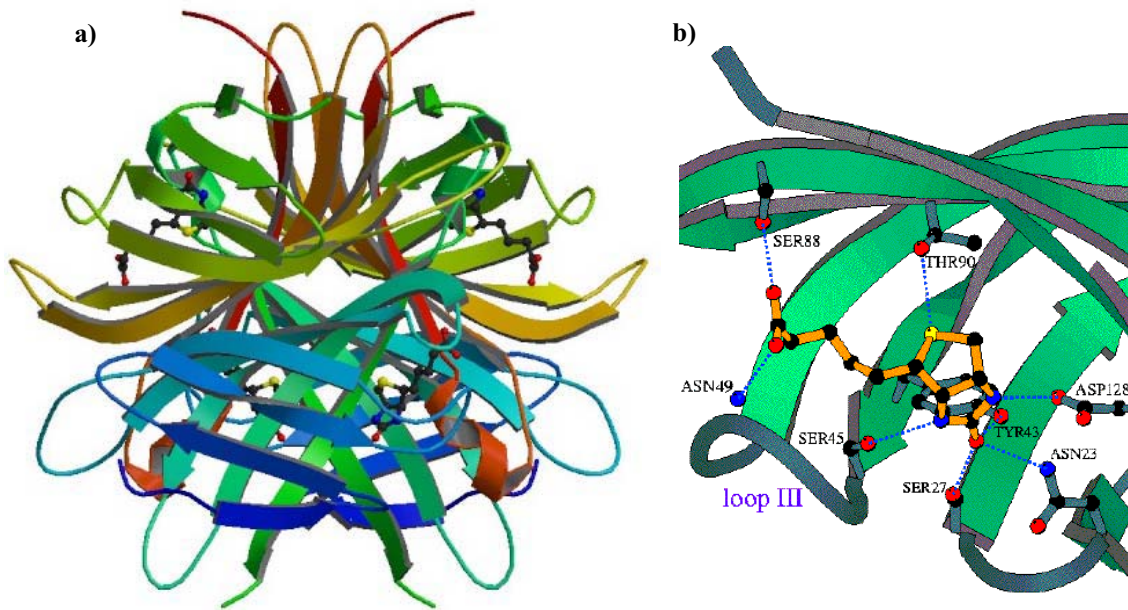
La lisina es presenta en forma de pols blanca cristal·lina i inodora. És fàcilment soluble en aigua (10 % p/v), poc soluble en etanol i pràcticament insoluble en èter. S'ha de conservar en un envàs protegit de la llum (Real Farmacopea Española, 2005; Martindale, 2009).

Es sintetitza per via natural en plantes i microorganismes a partir de l'àcid aspàrtic i per via sintètica a partir de caprolactam (Lehninger, 2005). Presenta tres pka, el primer a 2,16 (grup carboxílic); un segon a 9,06 (grup  $\alpha$ -amino) i el tercer a 10,54 que fa referència al grup N-butil amino; el seu punt isoelèctric està al voltant de 9,46.

La lisina es caracteritza perquè presenta grups bàsics a la cadena lateral que li confereixen caràcter hidrofílic. La L-lisina conté un grup N-butil amino que a pH fisiològic es troba protonat i es degrada donant lloc a cossos cetònics (aminoàcid cetogènic). El procés de degradació *in vivo* consisteix en la formació d'acetoacetyl coenzim A mitjançant una transaminació inicial amb  $\alpha$ -cetoglutarat (Sigma-Aldrich b, 2009; Lehninger, 2005). La lisina és un component bàsic per a totes les proteïnes de l'organisme i participa activament en el procés d'absorció del calci, en la formació de les proteïnes musculars i en la producció d'hormones, enzims i anticossos. Com que és un aminoàcid essencial no pot ésser sintetitzat per l'organisme i s'ha d'incorporar amb la dieta. El requeriment nutricional diari aproximat és de 12 a 45 mg\*Kg<sup>-1</sup>\*dia<sup>-1</sup> (Tomé, 2007). És un aminoàcid que es troba present en molts cereals però en baixes proporcions. Entre els aliments que contenen un alt contingut en lisina cal destacar els llegums i aliments rics en proteïnes incloent-hi el formatge, determinats peixos (bacallà i sardines) i els ous (Martindale, 2009).



### Estreptavidina, *Sigma*



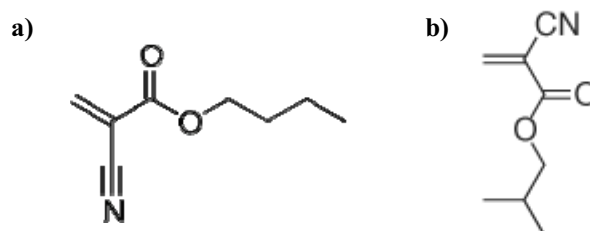
**Fig. 3.10:** Estructura tridimensional de l'estreptavidina unida a la biotina. a) Imatge obtinguda de la base de dades *Protein data bank*. b) Imatge corresponent a la unió estreptavidina-biotina per punts d'hidrogen en la subunitat III de la proteïna (Freitag, 1999).

L'estreptavidina es presenta en forma de pols blanca liofilitzada. Cal conservar-la a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  i és estable durant més de 3 anys en aquestes condicions. És soluble en aigua a 0,1% p/v o en solució reguladora de fosfats (PBS). Les solucions en PBS o en aigua poden mantenir-se durant mesos a  $4^{\circ}\text{C}$  o com a alíquotes congelades durant un període de temps superior a un any (Sigma-Aldrich c, 2008). El seu punt isoelèctric es troba comprès entre 5-6.

L'estreptavidina és una proteïna tetràmera produïda per *Streptomyces avidinii* que presenta 4 llocs d'unió amb una elevada especificitat per la biotina (Fig 3.10a). Cada monòmer de la proteïna s'uneix no covalentment a una molècula de biotina amb una elevada afinitat (Lindqvist, 1996; Freitag, 1997). Cadascuna de les subunitats de la proteïna es troba organitzada en 8 fulls  $\beta$  antiparal·lels, formant un barril  $\beta$  clàssic, trobant-se localitzat el lloc d'unió amb la biotina a un dels extrems d'aquest barril (veure Fig. 3.10b). La unió amb la biotina es produeix per múltiples interaccions en les que intervenen la formació de punts d'hidrogen i forces de Van der Waals (Freitag, 1999). L'estreptavidina s'utilitza habitualment com a sonda en sistemes immunoquímics i en la formació de conjugats amb anticossos, enzims i fluorocroms (Sigma-Aldrich c, 2008).

### 3.1.2.6. Monòmers

#### Alquilcianoacrilats: Butilcianoacrilat, *Henkel*; Isobutilcianoacrilat, *Henkel*



**Fig 3.11:** a) Fórmula estructural del butilcianoacrilat (BCA); b) Fórmula estructural del isobutilcianoacrilat (iBCA)

Els alquilcianoacrilats són líquids clars, incolors, amb una forta olor irritant característica (Henkel, 2003). Posseeixen una baixa viscositat que facilita la seva manipulació. S'han de conservar en envasos estancs i per a temps prolongats d'emmagatzematge es recomana mantenir el producte a una temperatura entre 2 i 5°C. Si es preveu la seva utilització en períodes de temps curts es poden conservar a 20°C (Henkel, 2003). Són molt solubles en acetona i immiscibles en aigua. En presència d'aquesta última reaccionen ràpidament donant lloc a un polímer insoluble (Henkel, 2003). Els alquilcianoacrilats es caracteritzen per la seva elevada reactivitat, fet que dificulta la seva obtenció amb un elevat grau de puresa ja que tendeixen a polimeritzar fent necessària l'addició d'inhibidors per a mantenir la seva estabilitat. En conseqüència, les seves propietats fisicoquímiques podrien modificar-se. Cal destacar que els alquilcianoacrilats polimeritzen extremadament ràpid en presència d'humitat o traces de components bàsics (Vauthier, 2003).

Aquests monòmers s'obtenen per via sintètica a través de diversos procediments. El més important consisteix en la reacció de condensació de Knoevenagel entre un alquilacetat i un formaldehid. Aquesta procés s'esdevé en presència d'un catalitzador bàsic obtenint-se ràpidament oligòmers de polialquilcianoacrilat (polímer de baix pes molecular). Posteriorment per acció d'elevades temperatures en condicions controlades (estabilitzants com àcids de Lewis amb petites quantitats d'inhibidors de radicals lliures per a evitar una repolimerització) s'obté el monòmer d'alquilcianoacrilat per despolimerització (Nicolas i Couvreur, 2009).

Pel que fa a la seva toxicitat, en atmosfera seca (humitat relativa 50%), els alquilcianoacrilats produeixen vapors que podrien afectar les vies respiratòries i provocar irritació ocular i llagimeig. Una exposició prolongada a elevades

concentracions d'aquests vapors comporta una sensibilització i l'aparició de reaccions al·lèrgiques. Es considera poc tòxic per la pell ja que reacciona ràpidament impedit que es produeixi una reacció al·lèrgica sobre aquesta (Henkel, 2003).

En relació a les seves aplicacions, els alquilcianoacrilats han estat molt utilitzats en biomedicina per les excel·lents propietats adhesives dels polímers resultants. Així, s'han utilitzat com a "pegament quirúrgic" per al tancament de ferides sobre la pell i com a material de sutura en cirurgia endovascular. En sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs els alquilcianoacrilats també han sigut àmpliament estudiats ja que donen lloc a polímers biodegradables i biocompatibles. En els darrers anys s'han desenvolupat nanopartícules de butil i isobutilcianoacrilat molt selectives en relació al lloc d'acció i capaces d'evitar els processos d'opsonització amb resultats prometedors en diverses patologies (Vauthier, 2003; Nicolas i Couvreur, 2009).

### Diisocianat d'isoforona, *Sigma*

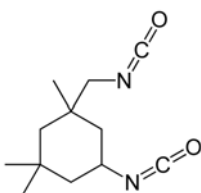


Fig 3.12: Fórmula estructural del diisocianat d'isoforona

El diisocianat d'isoforona (IPDI) és un diisocianat monomèric i cicloalifàtic que correspon al 3-isocianatmetil-3,5,5-trimetilciclohexil isocianat. A 25°C és un líquid lleugerament groguenc, transparent, d'olor acre que presenta una baixa viscositat. El seu punt de fusió es troba al voltant de -60°C i té una densitat de 1,058 g/ml (Alipa, 2005; INRS, 2009). Es descompon al voltant de 260°C comportant l'emissió de productes nocius, principalment vapors nitrosos. S'ha d'emmagatzemar en envasos estancs normalment d'acer inoxidable ja que és sensible a la humitat. És miscible amb èsters, cetones, èters i hidrocarburs alifàtics i aromàtics. És insoluble en aigua i en contacte amb aquesta es descompon formant diòxid de carboni i poliurees sòlides i insolubles (INRS, 2009).

L'IPDI és un component altament reactiu capaç d'interaccionar amb grups hidroxil, amina, amides i àcids carboxílics entre d'altres (capítol 1.2.4). S'utilitza habitualment en la síntesi de poliuretans i poliurees per a pintures, vernissos i elastòmers (INRS, 2009). Aquests poliuretans també s'han emprat en aplicacions biomèdiques en la fabricació de

catèters i inserts vasculars (Zdrahala, 1999) i recentment s'estan desenvolupant estudis per a la seva aplicació com a matrius en enginyeria de teixits (Guelcher, 2008).

En relació a la seva toxicitat, l'IPDI és molt irritant per a la pell i mucoses, especialment ocular i via respiratòria, i provoca sensibilització (Alipa, 2005; INRS, 2009). S'han descrit casos de reaccions al·lèrgiques respiratòries com asma i bronquitis crònica associades a exposicions prolongades (Clarke, 1981; Redlich, 2001). Malgrat la seva toxicitat quan es troba en forma de monòmer, en polimeritzar, dóna lloc a polímers biodegradables i biocompatibles i en els darrers anys s'està emprant per a l'elaboració de sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs en la síntesi de micropartícules i nanopartícules de poliuretà i poliurea (Jabbari, 2000; Bouchemal, 2004; Zanetti-Ramos, 2006; Gaudin, 2008)

### **3.1.3. Solucions per anàlisis**

#### **3.1.3.1 Solució reguladora de pH**

Com a solució receptora per a la realització dels assaigs d'alliberació de fàrmac *in vitro* i de permeació cutània *ex vivo* amb nano-emulsions i nanopartícules, s'ha emprat una solució salina reguladora de fosfats a pH 7,4. Aquesta solució tamponada s'ha preparat per dissolució de 2,38 g de fosfat dissòdic, 0,19 g de fosfat monopotàssic i 8 g de clorur sòdic en quantitat suficient d'aigua Milli-Q<sup>®</sup> per a preparar 1000 ml de solució d'acord amb la British Pharmacopeia, 2010. El pH s'ha ajustat a 7,4 amb àcid ortofosfòric 85% p/v (Real Farmacopea Española, 2005).

#### **3.1.3.2. Fase mòbil per a l'anàlisi cromatogràfica del ketoprofèn**

La fase mòbil que s'ha utilitzat per a dur a terme les anàlisis quantitatives dels estudis d'alliberació *in vitro* i permeació cutània *ex vivo* amb nano-emulsions i nanopartícules, està constituïda per una fase aquosa que conté 3,299 g d'àcid cítric, 1,733 g de clorur sòdic i 0,0414 g d'hidròxid sòdic dissolts en 445 ml d'aigua Milli-Q<sup>®</sup> i una fase orgànica amb 550 ml d'acetonitril per HPLC, ajustant-se el pH de la solució obtinguda a 3,00 amb una solució concentrada d'hidròxid sòdic 40%p/v (Real Farmacopea Española, 2005).

### 3.2. INSTRUMENTAL

Els equips detallats a continuació corresponen a l'instrumental utilitzat per a la preparació i caracterització de microemulsions, nano-emulsions i nanopartícules; per a la quantificació de principi actiu solubilitzat; per als assaigs de cessió de fàrmac a una solució receptora; per a la determinació dels efectes de les formulacions sobre la pell i per a la realització dels estudis de permeació cutània *ex vivo*.

#### *Preparació i caracterització de les composicions*

Per a la preparació de les formulacions s'han utilitzat els següents equips:

- Balança analítica de precisió  $10^{-4}$ g Mettler Toledo AB 104 i Sartorius BP 210D (màx 101 g, error 1 mg).
- Banys d'aigua termostats SBS i Fisher Scientific DMU 12. Permeten escalfar a temperatures fins els 100°C.
- Bany d'aigua de metacrilat de metil de 15 l de capacitat equipats amb un termostat d'immersió (Selecta, Grant GD 120 (temperatures entre 0 i 100°C)) , i un criostat model EK20 (ThermoHaake<sup>®</sup>) per a controlar la temperatura.
- Banys d'ultrasons P-Selecta, Clifton DHU i Elma Transsonic Digital (amb una capacitat de 2,75 l i una freqüència fixa de 40 KHz, pot treballar entre el 20 i el 140 % de la seva potència màxima i està equipat amb un sistema calefactor i termostat regulador de la temperatura fins a 80°C).
- Sistema de purificació d'aigua MilliQ<sup>®</sup> - Millipore.
- Polaritzadors de llum Polaroid<sup>®</sup> .
- Agitador mecànic de tubs Heidolph Reax 2000 de 200 a 2500 rpm de velocitat i Fisher Scientific Top Mix model FB 15024 (velocitats compreses entre 100 i 2000 rpm).
- Multiagitador magnètic A-09, SBS (agitador de 3 posicions, velocitat màxima 1000 rpm) i Variomag<sup>®</sup> telesystem ( agitador de 60 posicions, amb una capacitat de 0,1 a 50 ml per posició i velocitat màxima d'agitació 2000 rpm).

Per a la caracterització de les composicions s'han emprat:

- a) Tècniques de dispersió de la llum:
  - Espectrofotòmetre de correlació fotònica (Light Scattering) Malvern Zetasizer nano ZS (Malvern Instruments Ltd. GB), equipat amb un làser de 4mW de He-

Ne ( $\lambda = 633 \text{ nm}$ ), capaç de cobrir un interval de mides comprés entre 0,6 nm i 6  $\mu\text{m}$ .

b) Tècniques de microscòpia:

- Microscopi electrònic JEOL JEM 1010 amb cambra digitalitzadora d'alta resolució i mecanisme d'inclinació de mostres ( $+60/-60^\circ$ ) per a reconstruccions tridimensionals.
- Microscopi electrònic de Força Atòmica Extended Multimode de Digital Instruments-Veeco amb la sonda connectada al controlador Nanoscope IV (Veeco, Santa Barbara, CA). Les mesures topogràfiques s'han dut a terme mitjançant la modalitat de "tapping" (contacte intermitent) emprant una micropalanca ("cantilever") de diòxid de silici (PPP-NCH series, Nanosensors, Neuchatel, Suïssa). La punta que s'ha utilitzat presenta una constant elàstica de la molla de 42 N/m i una freqüència de ressonància de 330 kHz. Les mostres s'han dipositat sobre un substrat de mica fresca V1 (Ted Pella, Redding, CA).
- Microscopi confocal Olympus amb dos canals de fluorescència i un sistema de contrast interferencial (DIC).

c) Tècniques d'espectroscòpia:

- Espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier Bomem MB-120. Permet treballar a un rang de freqüències corresponents a l'infraroig mig ( $350-5000 \text{ cm}^{-1}$ ) amb una resolució màxima d' $1 \text{ cm}^{-1}$ . Consta d'un detector DGTS (Sulfat de triglicina deuterada), un divisor de feix de bromur potàssic, una font d'infraroig glowbar i un condensador de feix. Aquest equip també disposa d'una cel·la de diamant, de gasos i de líquids ( $\text{CaF}_2$ , KBr, NaCl, ZnSe) i d'un sistema de purga de nitrogen gas.

d) Eficiència d'encapsulació:

- Dispositius de filtració-centrifugació Centricon (Amicon bioseparations, Millipore) amb una membrana hidrofílica de baixa absorció (YM-100) i un diàmetre de porus de 100000 Da.
- Centrífuga Sigma model 301 K. Velocitats de rotació fins un màxim de 5000 rpm.

Per a l'estabilitat de les composicions s'han emprat:

- Liofilitzador Alpha 2-4 LD plus Biobloc Scientific acoblat a una bomba de buit.

- Ultracentrífuga Kontron instruments, model Centrikon T-1170, acoblat a un sistema de buit, capaç de suportar temperatures compreses entre 0 i 45°C i assolir una velocitat màxima de 70000 rpm. Rotor Kontron TFT 70.13, màxim 70000 rpm.

#### ***Quantificació del principi actiu***

- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC). Equipat amb un detector d'absorbància UV/vis Jasco UV- 2075 plus, una bomba Jasco PN-2080 plus, i el connector LC-Net II/ADC Jasco. Columna Kromasil 100 C18 25x 0,46 mm, mida de partícula 5 µm. Software: EZ Start<sup>®</sup>.
- Cromatògraf líquid d'alta resolució (HPLC). Equipat amb un detector d'absorbància UV/vis Waters 2487, una bomba binària Waters 1525 i un autoinjector Waters 717 plus. Columna Kromasil 100 C18 25x 0,46 mm, mida de partícula 5µm. Software: Breeze<sup>®</sup>.

#### ***Assaigs de cessió de fàrmac***

- Vasos encamisats Vidrafoc de vidre incolor amb un volum aproximat de 180 ml.
- pH-metre Crison model 2001 i pH-metre Thermo Orion 420A.

#### ***Efecte de les formulacions sobre la pell***

- Espectrofotòmetre Konika Minolta model CM-2600d. Consta de 40 sensors que determinen la reflectància d'un objecte per a determinades longituds d'ona corresponents al rang de la llum visible.
- Evaporímetre Aquaflux model AF102 ( Biox Systems LTD). L'aparell consta de 2 sensors localitzats a 3 i a 9 mm de la pell que determinen la humitat relativa i la temperatura a cada punt on es troben situats.

#### ***Estudis de permeació cutània ex vivo***

- Dermatomitador Zimmer<sup>®</sup> Electric Dermatomed, Ref. 8821-06.
- Cel·les de Franz Permeagear<sup>®</sup>. S'han emprat cel·les de Franz de vidre incolor amb un diàmetre de 1,5 cm i un volum aproximat de solució receptora al compartiment receptor comprès entre 5 i 6 ml
- Sistemes de permeació cutània model LG-1083.

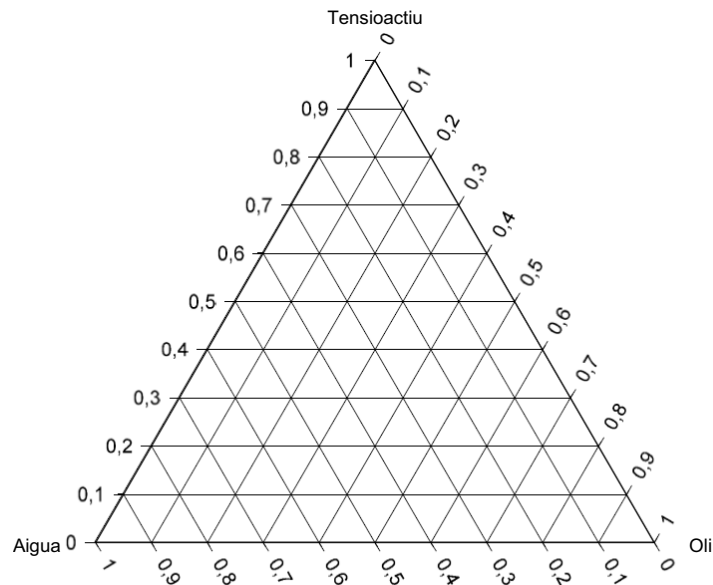
### 3.3. MÈTODES

#### 3.3.1. Elaboració de diagrames de fases ternaris i pseudoternaris a 25°C

El comportament fàsic dels sistemes aigua/ tensioactiu/ oli a 25°C s'ha estudiat mitjançant l'elaboració de diagrames de fases pel mètode de valoració (Friberg, 1978). Aquest mètode consisteix en l'addició de quantitats successives i creixents d'un dels components, generalment l'aigua, a diferents mescles binàries constituïdes pels components restants. Així, es van preparar en tubs de vidre amb taps de rosca composicions amb diferents relacions oli/tensioactiu. Degut a que alguns dels components utilitzats eren sòlids o presentaven una elevada viscositat a temperatura ambient les mescles es van escalfar a 70°C abans de ser homogeneïtzades mitjançant agitació mecànica (vòrtex). Un cop preparades, es van deixar reposar en un bany termostatat a 25°C i es va procedir a l'addició de quantitats successives d'aigua. Després de cada nova addició, les mescles es van homogeneïtzar novament amb vòrtex i es van deixar reposar a 25°C durant 24 hores però no es va esperar a assolir l'estat d'equilibri. Es considera que les composicions es troben en equilibri termodinàmic, i per tant en l'estat de mínima energia, quan s'observen una o més fases transparents separades per interfícies. Totes les composicions preparades van ser observades visualment anotant-se l'existència d'una o més fases macroscòpiques, la transparència, translucidesa, terbolesa o opacitat de les mostres, el seu color, la seva viscositat i la presència de regions amb birefringència que van ser detectades per observació visual directa amb polaritzadors de llum creuats.

Els diagrames de fases ternaris es representen gràficament amb un triangle equilàter on cada vèrtex correspon al 100% del component en qüestió i al 0% dels components dels vèrtex oposats. Tant els components del sistema com les mescles s'expressen en fracció en pes (veure Fig. 3.13).





**Figura 3.13:** Plantilla dels diagrames de fases ternaris

La utilització d'aquest mètode permet delimitar les regions monofàsiques i multifàsiques així com la presència de zones on es forma cristall líquid laminar i/o hexagonal (anisotropia).

### 3.3.2. Preparació de nano-emulsions

Els mètodes per a la preparació de nano-emulsions s'han classificat en funció de la temperatura i de l'agitador emprat per a la homogeneïtzació de les mescles. A la figura 3.14 es pot observar un esquema del procés de preparació per cadascun d'aquets mètodes.

#### - VÒRTEX (Fig 3.16a):

**Pesada directa:** Es pesen acuradament en tubs de vidre amb taps de rosca tots els components per a cada composició que es vol estudiar a temperatura ambient, s'homogeneïtzen i es deixen reposar en un bany termostatat a 25°C.

També es va utilitzar una variant d'aquest mètode que consisteix en pesar els components prèviament escalfats a 50° C.

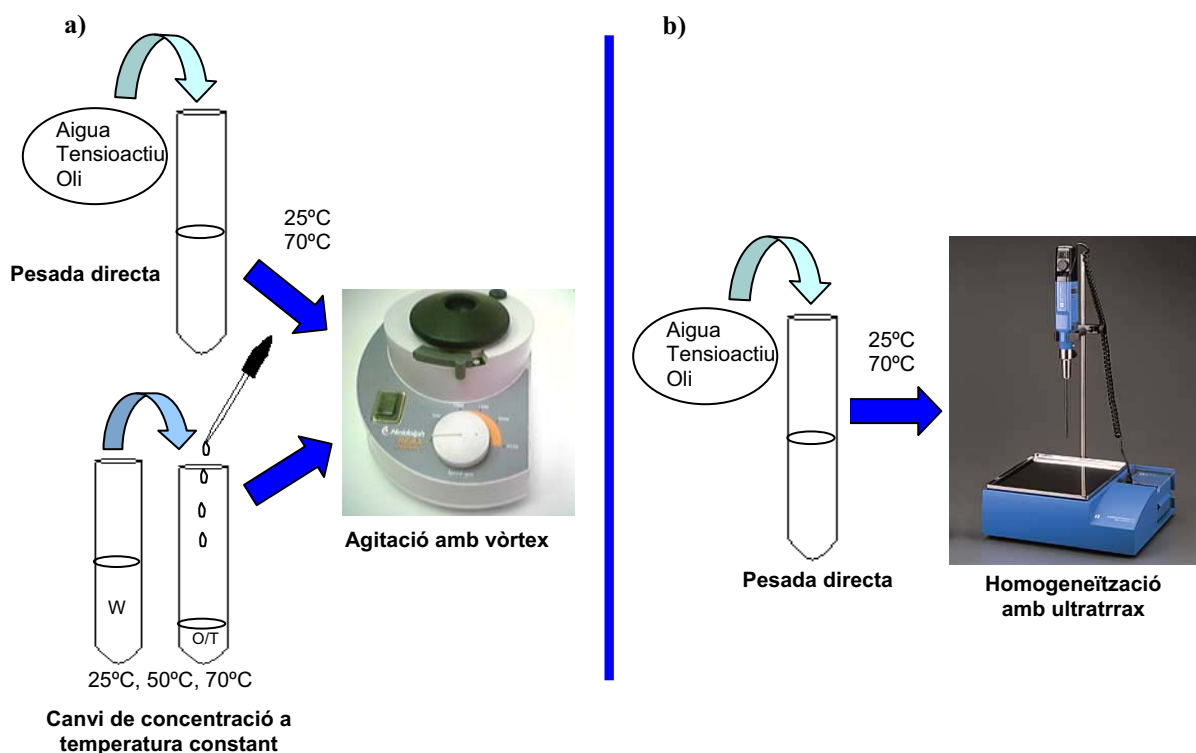
**Mètode de canvi de concentració a temperatura constant:** Es pesen els components tensioactius i oliosos de les diferents formulacions, s'escalfen les

mescles a 70°C, s'agiten fins a total homogeneïtzació i s'addicionen lenta i successivament petites quantitats d'aigua, escalfant el component aquós a la mateixa temperatura i homogeneïtzant després de cada nova addició. Finalment les composicions es deixen reposar a 25° C.

Aquest mètode també s'ha dut a terme a la temperatura de 25 i 50°C.

- **ULTRATURRAX** (Fig. 3.16b):

**Pesada directa:** Les composicions un cop realitzada la pesada directa s'homogeneïtzen emprant diferents velocitats d'agitació (7500, 12000 i 25000 rpm) i aplicant una elevada força de cisalla. Mitjançant l'ultraturrax es van preparar formulacions a 25°C i a 70°C.



**Fig. 3.14:** Esquema corresponent al procés de preparació de nano-emulsions O/W mitjançant a) agitació amb vòrtex i b) homogeneïtzació amb ultraturrax; T correspon al tensioactiu, O al component oliós i W a l'aigua.

Per a l'obtenció d'algunes nano-emulsions es va combinar un mètode d'emulsificació de baixa energia amb un mètode d'alta energia. Les dispersions prèvies es preparen a 70°C pel mètode de canvi de concentració a temperatura constant i posteriorment, per a aconseguir la formació de gotes de mida més petita i homogènia, les mescles es

sotmeten a la presència d'ultrasons durant 1 hora. Finalment, les composicions es deixen reposar a 25°C en un bany termostatat.

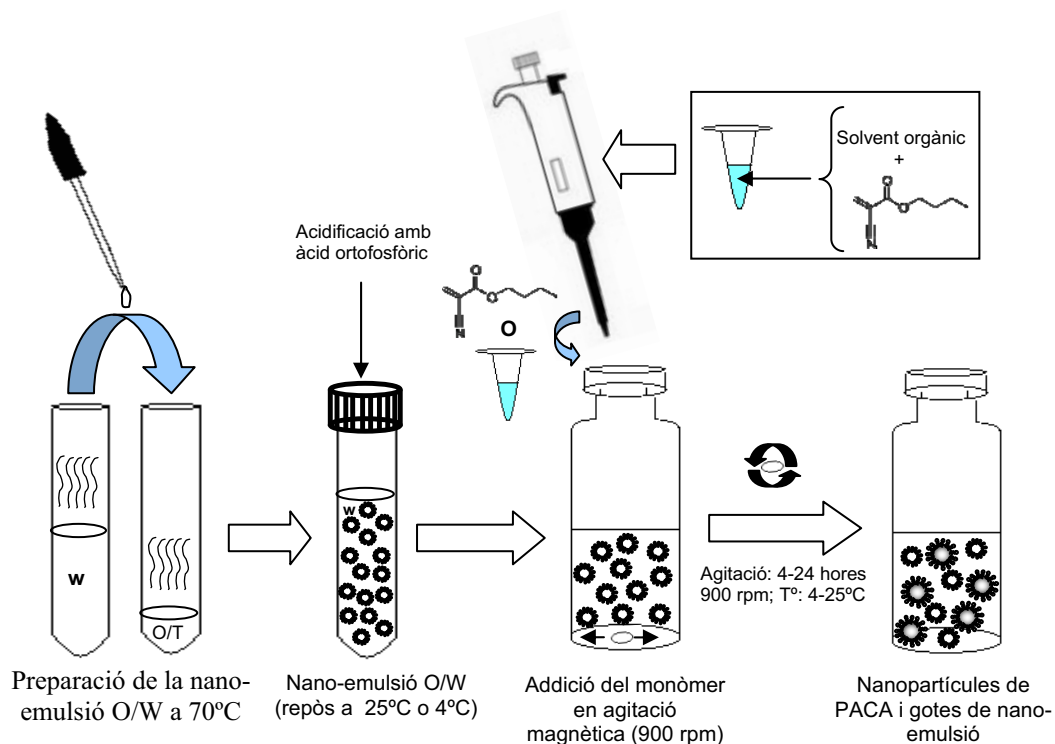
### **3.3.3. Elaboració de nanopartícules a partir de nano-emulsions O/W**

Es va estudiar la formació de diferents tipus de nanopartícules en funció del monòmer emprat en el procés de polimerització. Els monòmers seleccionats en aquest treball d'investigació han estat els alquilcianoacrilats (BCA i *i*BCA), que donen lloc a les nanopartícules de polialquilcianoacrilat, i els diisocianats (IPDI), a partir dels quals s'obtenen nanopartícules de poliuretà o poliurea.

#### **3.3.3.1. Nanopartícules de polialquilcianoacrilats (PACA)**

Les nanopartícules d'alquilcianoacrilats es van preparar principalment pel mètode descrit per Couvreur et al. (1979) però amb una petita modificació ja que en aquest cas s'ha emprat una nano-emulsió O/W com a medi de polimerització.

El mètode d'emulsificació seleccionat per a formar la nano-emulsió consisteix en addicionar l'aigua progressivament i a una temperatura de 70°C en la mescla oli/tensioactiu prèviament homogeneïtzada (veure mètode de canvi de concentració a temperatura constant en el capítol anterior). La nano-emulsió obtinguda es deixa reposar en un bany termostatat a 25° C immediatament després de ser preparada. En aquest moment, si escau, s'acidifica la composició amb àcid ortofosfòric al 85% p/v fins assolir el pH desitjat. En alguns casos les composicions es van refredar a 4°C just abans d'incorporar el monòmer. Per a formar les nanopartícules, el monòmer (alquilcianoacrilat), ja sigui directament o dissolt en un medi orgànic (acetona o cloroform), s'addiciona lentament amb ajut d'una micropipeta en la nano-emulsió en contínua agitació magnètica (900 rpm). Les condicions d'agitació es mantenen durant 4 o 24 hores depenent del pH de la composició inicial i de la presència de solvent orgànic. La figura 3.15 correspon a l'esquema de la preparació de nanopartícules de PACA pel mètode desenvolupat per Couvreur et al. (1979).



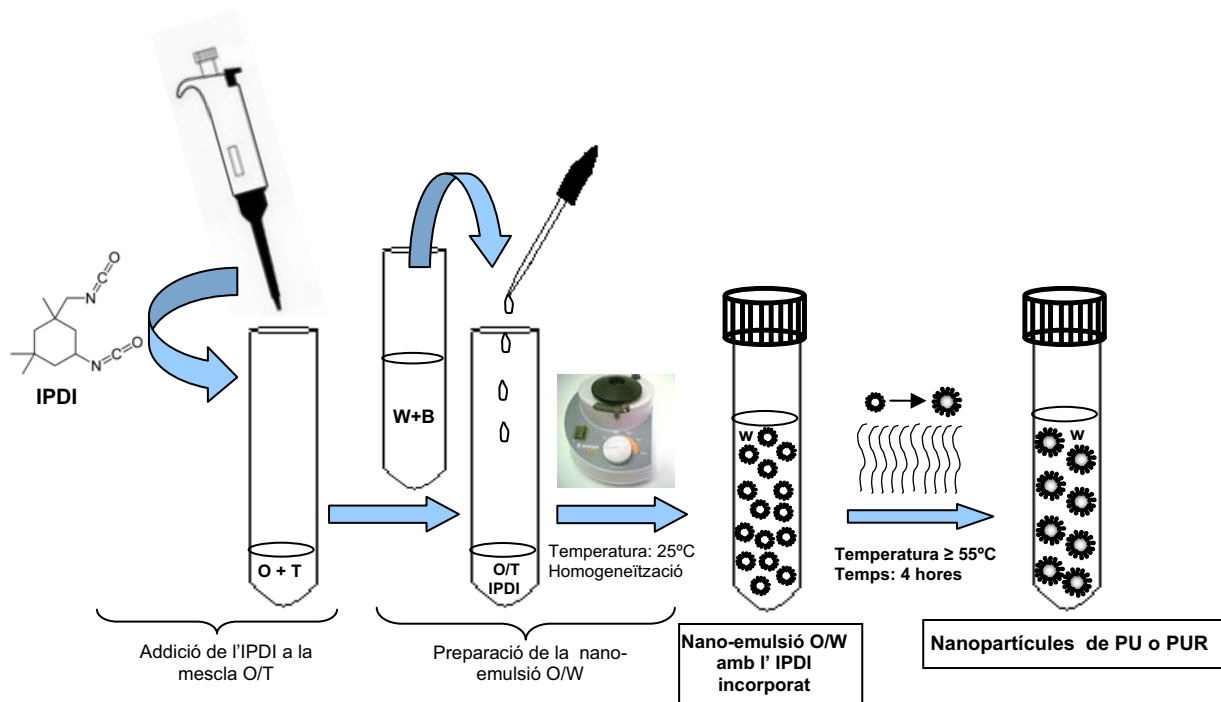
**Fig. 3.15:** Esquema corresponent al procés de preparació de nanopartícules de PACA a partir de nano-emulsions O/W .

Les nanopartícules de PACA també es van preparar a partir d'un mètode alternatiu que consisteix en addicionar amb una micropipeta i en presència d'ultrasons el component oliós que ja conté el monòmer d'alquilcianoacrilat solubilitzat, en la mescla aigua/tensioactiu/co-tensioactiu (solució micel·lar) prèviament escalfada a 50°C. La dispersió obtinguda es manté en el bany d'ultrasons aplicant la màxima potència (140%) i a una temperatura de 50°C durant un període de temps de 5 hores. En aquest procés, l'emulsificació i la polimerització transcorren paral·lelament. Finalment, la composició es deixa reposar a 25°C en un bany termostatat.

### 3.3.3.2. Preparació de nanopartícules de poliuretà i poliurea

La síntesi de nanopartícules de poliuretà (PU) i poliurea (PUR) es basa en la reacció química que es produeix entre els grups hidroxil o els grups amina presents en els tensioactius, el polietilenglicol i els biomaterials i els grups  $N=C=O$  del diisocianat (veure capítol 1.2.4 de la introducció). Per a que tingui lloc aquesta reacció química es procedeix de la següent manera:

Es preparen separatament en tubs de vidre amb taps de rosca les mescles oli/tensioactiu i aigua/ PEG o aigua/biomaterial homogeneïtzades amb vòrtex (2000-2400 rpm). Com a biomaterials es van emprar lisina, biotina i estreptavidina. A continuació s'addiciona amb una micropipeta el diisocianat d'isoforona (IPDI) sobre la mescla oli/tensioactiu prèviament preparada i s'agita en vòrtex fins a la completa solubilització del monòmer. Posteriorment, es procedeix a la formació de la nano-emulsió O/W per addicions successives de la mescla aquosa sobre la mescla oli/ tensioactiu/ IPDI homogeneïtzant amb vòrtex a una velocitat de 2500 rpm després de cada nova incorporació del component aquós. Per tal d'evitar que la reacció de polimerització s'esdevingui abans de la formació de les gotes de nano-emulsió, les formulacions es preparen a 25°C o a una temperatura inferior. Finalment, les nano-emulsions amb l'IPDI incorporat es sotmeten a una temperatura superior o igual a 55°C durant 4 hores per tal de formar les nanopartícules de PU i PUR. Les composicions es deixen reposar a 25°C en un bany termostatat. A la Fig. 3.16 es mostra un esquema del procés d'elaboració de les nanopartícules de PU i PUR.



**Fig. 3.16:** Esquema corresponent al procés de preparació i formació de nanopartícules de poliuretà (PU) i de poliurea (PUR) on O correspon al component oliós, Tal a tensioactiu, W a l'aigua, B al PEG o al biomaterial i IPDI al diisocianat d'isoforona.

Les nanopartícules de poliuretà i poliurea també es van preparar emprant una solució salina de fosfats (solució reguladora de fosfats a pH 7,4) com a component aquós, en el qual es van solubilitzar el PEG 400 o l'aminoàcid lisina.

### 3.3.4. Disseny experimental

El disseny experimental (Box, 2008) es podria definir com una metodologia basada en un conjunt d'eines matemàtiques i estadístiques amb la finalitat d'aconseguir:

1. Seleccionar aquella estratègia experimental òptima amb la qual s'obtingui la màxima informació amb el nombre mínim d'experiments.
2. Avaluar els resultats obtinguts garantint la màxima fiabilitat en les conclusions que se'n derivin.

Per tal d'aplicar un disseny experimental es requereixen una o més variables experimentals dependents o de resposta ( $y$ ) que han de poder ser mesurables i el valor de les quals dependrà d'una sèrie de variables independents ( $x$ ) controlables per l'investigador. Tot i això, s'ha de tenir en consideració que les variables resposta també es podran veure afectades per un conjunt de factors externs que no podran ésser controlats (Montgomery, 2010).

El principal avantatge del disseny experimental enfront el mètode tradicional, en el qual s'estudia cada variable individualment, consisteix en el fet que mitjançant un disseny factorial no només s'aconsegueix reduir notablement el nombre d'experiments sinó que també es tenen en consideració les interaccions entre variables.

D'acord amb Montgomery et al. i Hinkelman et al. (Montgomery, 2010; Hinkelman, 2008) les etapes que comprèn un disseny factorial són:

1. Definir els objectius del disseny factorial.
2. Identificar les variables independents que podrien influir en el factor resposta i seleccionar l'interval de valors que podrien assolir.
3. Seleccionar el tipus de disseny experimental.
4. Desenvolupar els experiments que componen el disseny factorial.
5. Analitzar i interpretar els resultats obtinguts.

Seguint les fases anteriors, l'objectiu dels dissenys factorials en la formació de nano-emulsions O/W ha estat estudiar la influència de les diferents variables de composició i

de les seves interaccions en el diàmetre de gota de les nano-emulsions i la polidispersitat del sistema (variables resposta) determinats per DLS. Com a variables independents s'han seleccionat el tipus i la concentració de tensioactiu, la concentració de co-tensioactiu i la concentració d'aigua. L'estudi d'aquests factors s'ha dut a terme mitjançant dos dissenys diferents:

- Disseny factorial 4\*3\*2. Aquest estudi comprèn un total de 24 experiments ja que s'estudien 3 factors amb 4, 3 i 2 nivells diferents.
- Disseny factorial central compost de tipus rotacional amb 2 valors axials i 1 valor central amb un replicat. Per a aquest estudi s'han realitzat un total de 16 experiments on cada variable s'ha estudiat a 5 nivell diferents.

L'anàlisi estadística dels resultats experimentals s'ha dut a terme amb el programa Statgraphics Centurion (Statistical Graphics Corporation, USA). Mitjançant aquest programa que realitza el tractament estadístic dels resultats a partir d'una anàlisi de la variància es poden obtenir les funcions quadràtiques i les corresponents gràfiques de superfície de resposta. Aquestes funcions relacionen les diferents variables resposta (variable dependent) amb les diferents variables en estudi (variables independents) i posen de manifest la influència individual de cadascuna de les variables així com també de les seves interaccions. Per a 3 variables en estudi aquesta funció quadràtica correspondria a:

$$y = b_0 + b_1(x_1) + b_2(x_2) + b_3(x_3) + b_{12}(x_1x_2) + b_{13}(x_1x_3) + b_{23}(x_2x_3) + b_{11}(x_1)^2 + b_{22}(x_2)^2 + b_{33}(x_3)^2$$

on  $y$  correspon a la variable resposta,  $b_i$  indicaria la influència de la variable  $i$  i  $b_{ij}$  serien les diferents interaccions entre les variables independents.

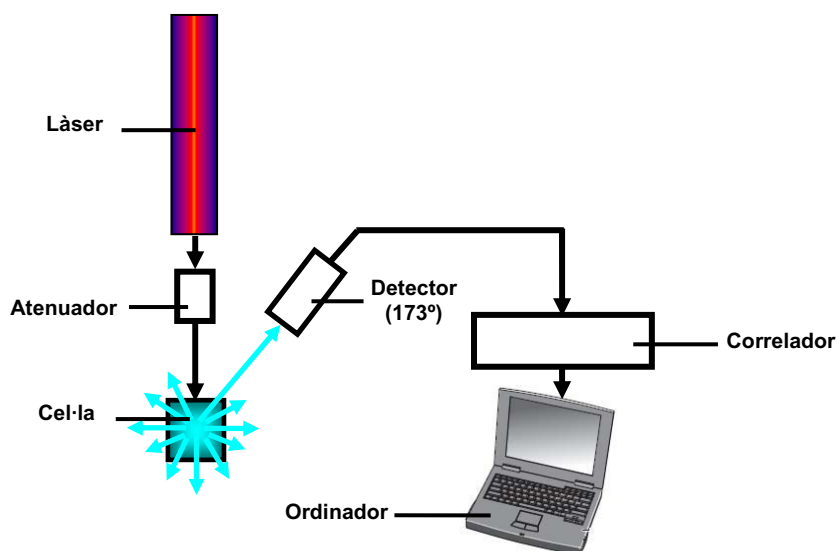
### 3.3.5. Mètodes de caracterització

A continuació es descriuen els mètodes emprats tant per a la caracterització de les nano-emulsions com de les nanopartícules.

### 3.3.5.1. Espectroscòpia de correlació fotònica (Dynamic Light Scattering, DLS)

La determinació del diàmetre de gota i de partícula de les diferents composicions s'ha dut a terme mitjançant espectroscòpia de correlació fotònica.

Les tècniques de dispersió de la llum s'utilitzen per a la caracterització dels sistemes col·loïdals i es basen en la determinació del moviment Brownià dels col·loïdes mitjançant la il·luminació de les partícules amb llum làser i l'anàlisi de les fluctuacions de la intensitat de la llum dispersada a un angle constant en funció del temps. Existeix una relació entre el moviment Brownià i la mida de les partícules ja que les partícules de mida més petita es desplacen més ràpidament que aquelles que presenten una mida més gran. L'instrument emprat (Zetasizer nano ZS) consta d'un correlador digital que determina principalment el grau de similitud entre dos senyals en un determinat interval de temps (veure Fig. 3.17).

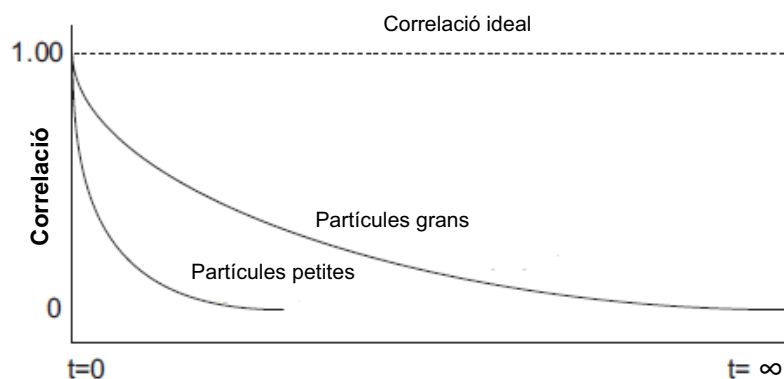


**Fig 3.17:** Esquema general dels components que constitueixen un equip d'espectroscòpia de correlació fotònica. L'equip Zetasizer nanoZS mesura la intensitat de llum dispersada a un angle de 173°.

La funció d'autocorrelació de la intensitat ( $g_t(q, t_d)$ ) mesura aquest grau de similitud entre la intensitat dispersada a qualsevol temps i la intensitat després d'un cert temps,  $t_d$ . Quan es representa gràficament la funció de correlació entre zero (absència de correlació) i 1 (correlació ideal) en funció del temps per a partícules de mida gran i petita (veure Fig 3.18) s'observa que la disminució de la intensitat es més ràpida per a les partícules més petites ja que aquestes es mouen més ràpidament i dispersen menys llum



(la intensitat de llum dispersada d'un col·loide és proporcional a la sisena potència del seu diàmetre d'acord amb l'aproximació de Rayleigh).



**Fig 3.18:** Funció de correlació entre 0 i 1 en funció del temps per a partícules de mida gran i partícules de mida petita (Malvern Inst., 2003).

Per a una dispersió de partícules esfèriques monodispersa la funció de correlació es pot expressar per l'equació:

$$g_i(q, t_d) = A + B \cdot \exp(-2D_0 \cdot q^2 \cdot t_d) \quad (\text{Berne i Pecora, 1976})$$

on A es la línia base, B el factor de les constants òptiques de la mesura i de la composició a estudiar,  $D_0$  el coeficient d'autodifusió i q el mòdul del vector de dispersió. Per a les nano-emulsions i nanopartícules estudiades, el valor del coeficient de difusió  $D_0$  s'ha determinat mitjançant el mètode dels Cumulants (Finsy, 1994). Aquest model matemàtic assumeix que les gotes o partícules presenten una distribució monomodal del diàmetre de gota o partícula. D'acord amb l'equació anterior, el radi hidrodinàmic de les gotes,  $R_H$ , es pot determinar a partir de l'equació d'Stokes-Einstein:

$$R_H = kT / 6\pi\eta D_0$$

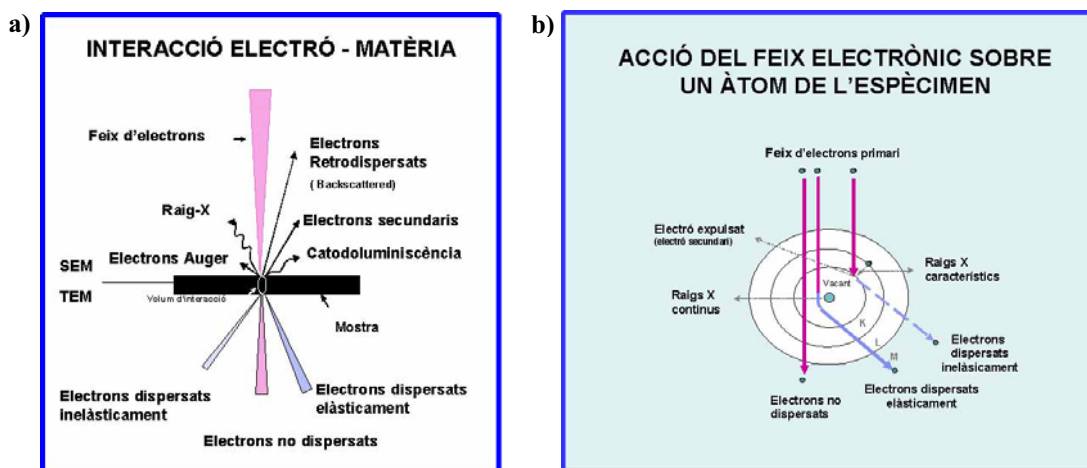
on k correspon a la constant de Boltzman, T a la temperatura absoluta i  $\eta$  a la viscositat de la fase externa. Les determinacions de les mides del diàmetre de gota (nano-emulsions) i del diàmetre de partícula (nanopartícules) s'han realitzat a un angle fix de  $173^\circ$ , un índex de refracció d'1,33, essent la viscositat de la fase externa de 0,8872 cP.

La utilització del Zetasizer nano ZS també permet transformar a partir de la teoria de Lorenz-Mie, que assumeix l'esfericitat de les partícules (Xu, 2002), les fluctuacions de la intensitat de llum dispersada en volum i aquest al seu torn en nombre.

### 3.3.5.2. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM)

La microscòpia electrònica de transmissió ha permès observar la morfologia de les nano-emulsions i les nanopartícules de polialquilsianoacrilat, poliuretà i poliurea.

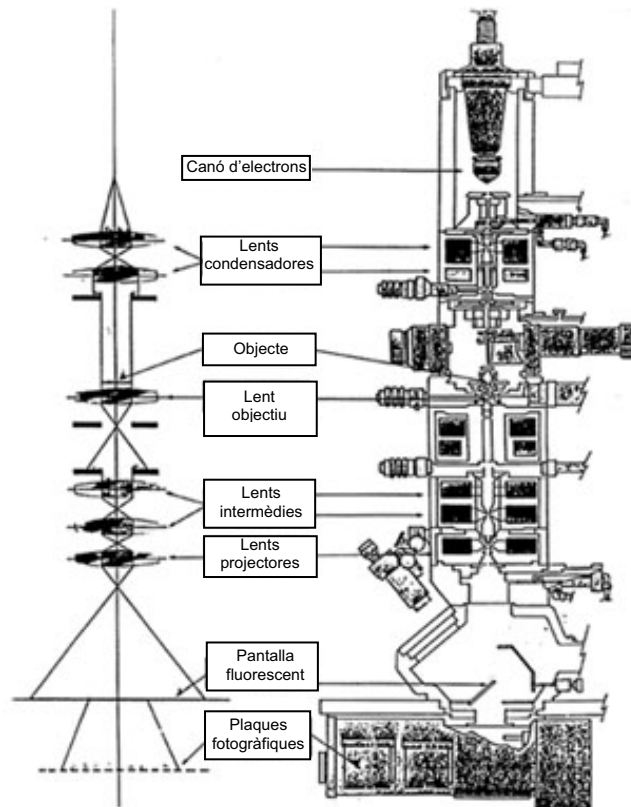
Aquesta tècnica microscòpica es basa en l'aprofitament dels fenòmens físico-atòmics produïts per un feix d'electrons que emet un filament incandescent, generalment de Tungstè, que són accelerats electrostàticament i dirigits per mitjà d'unes lents cap a la mostra a estudiar. Dels fenòmens que es produeixen com a conseqüència d'aquesta col·lisió es pot obtenir una informació tant morfològica com analítica (microanàlisi). El fet de treballar amb un feix d'electrons implica que a l'interior del microscopi s'ha de produir un elevat buit amb la finalitat de garantir que els electrons segueixin trajectòries lliures i no col·lionin amb els àtoms procedents dels gasos. La mostra a estudiar ha de poder suportar aquesta situació d'alt buit sense malmetre's i conseqüentment requerirà uns processos de preparació previs (SCT-UB, 2009).



**Fig 3.19:** a) Conjunt de senyals generats quan un feix accelerat d'electrons interacciona amb una mostra (SCT-UB, 2009); b) Conjunt de senyals generats quan un feix electrònic incideix sobre un àtom d'un espècimen (SCT-UB, 2009)

En el microscopi electrònic de transmissió (TEM), els electrons, en col·lisionar amb la mostra són dispersats selectivament com a conseqüència de l'heterogeneïtat d'aquesta. Aquells que es dispersen en menor proporció són els que s'aprofiten per a produir la imatge que, per tant, correspon fonamentalment a l'absència d'estructura. La imatge, per mitjà de diverses lents electròniques, es va engrandint successivament fins que finalment s'aconsegueix visualitzar-la en ser projectada damunt d'una pantalla fluorescent. Posteriorment, és enregistrada en plaques fotogràfiques especials o bé és captada per una càmera digitalitzadora. En últim terme, la imatge és digitalitzada, processada i

emmagatzemada en un ordinador. La microscòpia electrònica permet obtenir imatges amb informació ultraestructural a augments que oscil·len entre 200 i 500.000 x i fins a un límit de resolució de 0,3nm (SCT- UB, 2009).



**Fig. 3.20:** Esquema representatiu de les diferents unitats que componen un Microscopi Electrònic de Transmissió (SCT-UB, 2009)

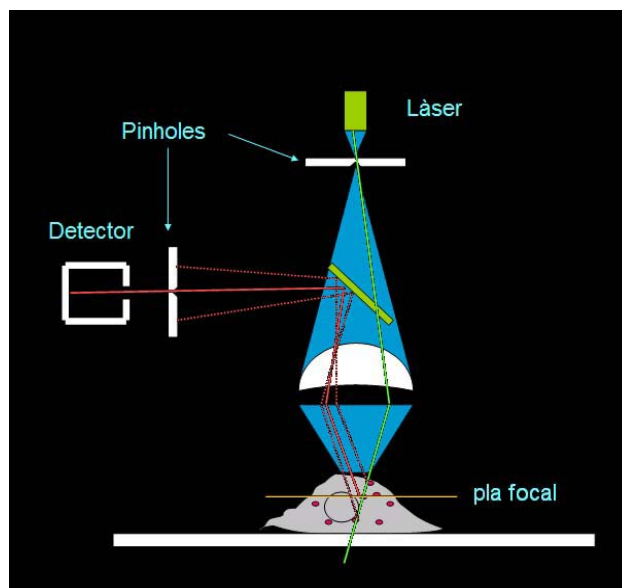
La preparació de les mostres (nano-emulsions i nanopartícules) per a la seva observació en TEM ha consistit en una tinció negativa amb acetat d'uranil a l'1%. S'han utilitzat reixetes de coure recobertes amb una fina pel·lícula de carbó. Sobre un fragment de Parafilm es dipositen separadament 20  $\mu\text{l}$  de la formulació, 50  $\mu\text{l}$  d'aigua (de dues a tres gotes depenent de la concentració de la mostra) i 20  $\mu\text{l}$  del colorant, en aquest ordre. Amb l'ajut d'unes pinces es diposita la reixeta sobre la mostra deixant-la en contacte durant 1 minut; després d'aquest temps, assecant amb paper de filtre, s'elimina l'excés de mostra i es repeteix el mateix procediment amb les gotes d'aigua amb la finalitat de diluir la mostra fins a la concentració òptima per a la seva observació. Finalment la mostra es tenyeix amb el colorant i es deixa assecar en una placa de petri.

### 3.3.5.3. Microscòpia confocal

La tècnica de microscòpia confocal s'ha emprat per a caracteritzar les nanopartícules de poliurea preparades amb biotina després de ser marcades amb un complex fluorescent que es troba unit a l'estreptavidina.

La microscòpia confocal permet obtenir una informació molt acurada i selectiva de l'estructura tridimensional d'un objecte microscòpic. Mitjançant una font de llum làser que es concentra en el pla de l'objecte, la llum reflectida o la llum fluorescent emesa, es dirigeix cap a un fotomultiplicador a través d'un diafragma. L'ordinador de l'equip mostra cada punt com un píxel en la pantalla. La imatge completa s'obté gràcies a que el punt de llum es va movent sobre la totalitat de l'objecte i mitjançant un rastreig la imatge és generada simultàniament en el monitor. La intensitat de la il·luminació i la sensibilitat del diafragma permeten assegurar que únicament la informació del pla focal arriba al detector. El microscopi confocal és capaç de crear imatges de seccions òptiques de la mostra amb un important increment de la resolució. Una platina amb desplaçament d'alta precisió combinada amb el software de l'ordinador, permet focalitzar diferents plans, reproduir tota la sèrie d'imatges i emmagatzemar-les en suport informàtic. Aquesta informació emmagatzemada pot emprar-se per a crear imatges tridimensionals, fer mesures topogràfiques, estudis de col·localització i quantificacions entre d'altres (SCT-UB, 2009)

El fonament del microscopi confocal és molt important en microscopia de fluorescència ja que elimina la llum provinent de plans focals diferents al què s'està treballant de tal manera que el sistema produeix imatges de fluorescència amb una claredat i resolució òptimes (SCT-UB, 2009).



**Fig 3.21:** Il·lustració esquemàtica dels elements que componen un microscopi confocal

L'observació de les mostres s'ha dut a terme en suspensió aquosa després de deixar incubar les nanopartícules amb el complex fluorescent (atto 565 Streptavidin) durant 30 minuts a temperatura ambient. La dilució emprada ha estat d'1:500 en relació a una solució mare amb una concentració d'1mg/ml d'atto 565 streptavidin. El complex fluorescent unit a l'estreptavidina és un derivat de la rodamina i presenta una longitud d'ona de màxima absorció de 563 nm i una  $\lambda$  màxima d'emissió de 592 nm. Les composicions s'han observat en un microscopi confocal Olympus equipat amb dos canals de fluorescència i un sistema de contrast interferencial (DIC). S'ha emprat un làser amb una  $\lambda$  de 543 nm que permet detectar fluorocroms que emeten a la franja del groc taronja.

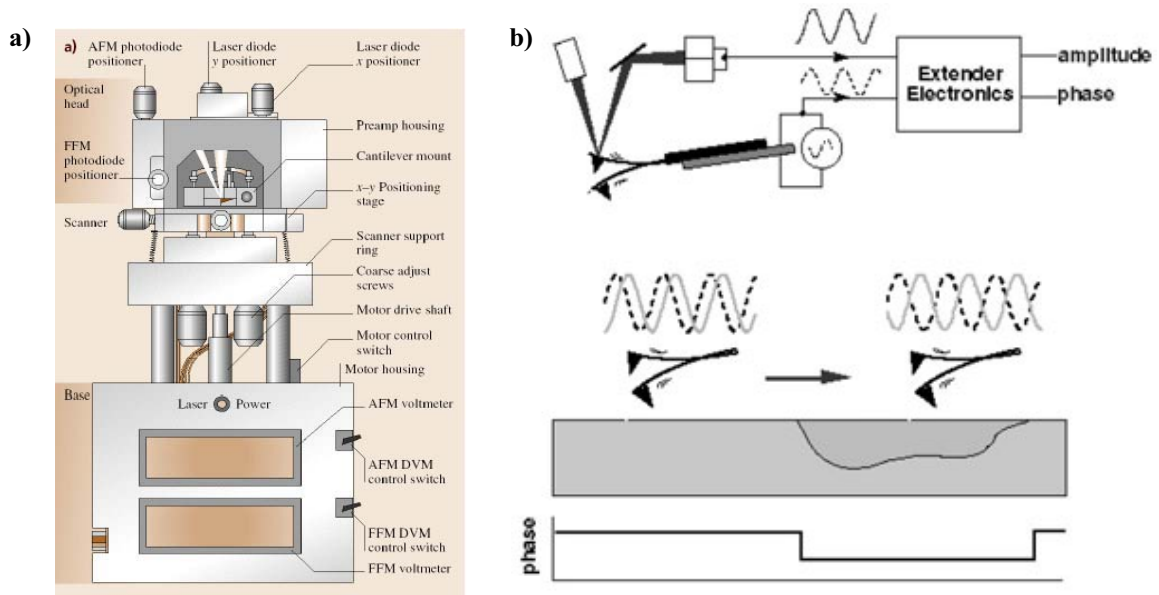
#### 3.3.5.4. Microscòpia de força atòmica (AFM)

La microscòpia de força atòmica s'ha utilitzat per a caracteritzar les nanopartícules de poliuretà i poliurea determinant la morfologia i la homogeneïtat estructural de les composicions.

Aquesta tècnica microscòpica permet obtenir imatges de la superfície de la mostra a partir de les interaccions per forces mecàniques que es produeixen entre la punta del microscopi i la mostra a estudiar. Aquestes forces poden ser de curt abast i per tant, forces de repulsió degudes a la interacció entre la densitat electrònica dels àtoms de la

punta i de la mostra, o bé de llarg abast on predominen les forces tipus Van der Waals (atractives) i les forces magnètiques i/o elèctriques (d'atracció o repulsió). Els valors de les forces d'interacció depenen de la distància existent entre una punta acoblada a una micropalanca i la superfície de la mostra i es determina mitjançant mesures precises dels desplaçaments d'aquesta sonda sobre la mostra.

El microscopi de força atòmica es troba constituït doncs, per una punta que escaneja la superfície de la mostra. En conseqüència, en funció de la topografia, la micropalanca realitzarà un moviment de deflexió vertical en sentit positiu (cap amunt) o negatiu (cap avall). Durant aquest procés també es produeix una deflexió lateral degut a la fricció del material amb la mostra. Ambdós processos són enregistrats en un fotodetector a partir del canvi d'angle d'un feix de llum làser reflexat sobre la superfície superior del microflexe (micropalanca). Durant la presa de les imatges intervé un mecanisme de retroacció que permet mantenir constant la força que exerceix la punta sobre la mostra. A la Fig. 3.22 es pot observar una il·lustració esquemàtica dels diferents components de l'AFM.



**Figura 3.22:** a) Il·lustració esquemàtica d'un microscopi de forces atòmiques (Díaz Marcos, 2005) i b) Il·lustració esquemàtica de la detecció de fases i de la imatge de fases en la modalitat de "tapping". La fase d'oscil·lació de la sonda es modifica en el precís moment en que la sonda interacciona amb la mostra (Magonov i Yerina, 2005).

Els microscopis de força atòmica poden emprar-se en la modalitat de contacte on la punta es situa a una alçada de 0,1 a 0,3 nm de la superfície de la mostra i per tant

predominen les forces de repulsió o en la modalitat de no contacte, a distàncies entre 1 i 2 nm i per tant, predomini de les forces d'atracció. En la modalitat de "tapping", la micropalanca realitza moviments oscil·latoris a una freqüència de ressonància degut a la presència d'un transductor piezoelèctric produint-se així, un contacte intermitent entre la punta i la mostra. D'aquesta manera s'eviten les forces d'arrossegament lateral que podrien deformar les mostres. En la modalitat de "tapping" es mesura doncs l'amplitud de vibració i no la deflexió (veure figura 3.23b).

L'AFM permet realitzar tant estudis a nivell topogràfic com d'imatge de fases obtenint-se informació dins del rang nanomètric de l'estructura superficial.

Els estudis s'han dut a terme en un microscopi electrònic de força atòmica Extended Multimode de Digital Instruments-Veeco connectat al controlador Nanoscope IV.

Per a l'observació de nanopartícules de poliuretà i poliurea mitjançant AFM es va aplicar el procediment descrit a continuació:

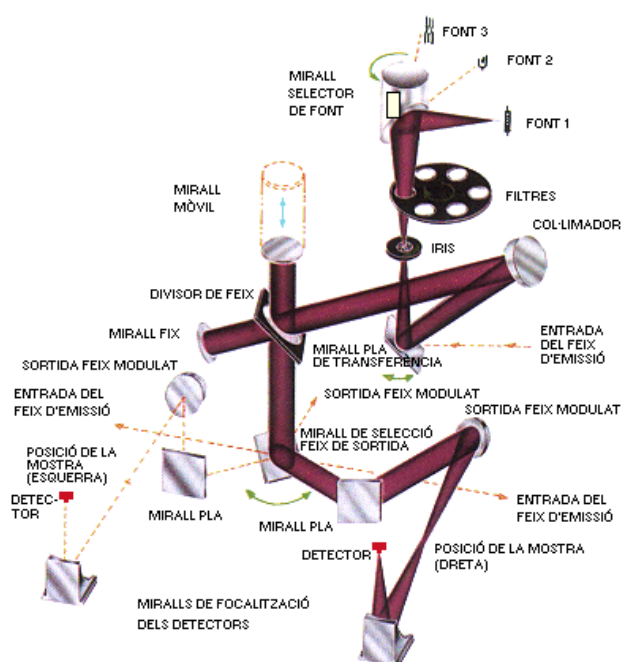
Sobre una superfície de mica fresca V1 de dimensions 1\*1 cm i prèviament netejada amb cinta adhesiva, es dipositen 50 µl de la suspensió de nanopartícules diluïda a una concentració adequada per a la seva observació. En la major part de les composicions es va emprar un factor de dilució 1:125. La formulació s'estén sobre la mica formant una pel·lícula molt fina de rugositat inferior a l'alçada de la punta. Per tal d'aconseguir la fixació de les nanopartícules al substrat de mica fresca, les preparacions es deixen assecar a l'interior d'una cambra amb atmosfera de nitrogen durant un temps mínim de 12 hores. Les imatges d'AFM es van obtenir per la modalitat de "tapping" utilitzant un micropalanca de diòxid de silici amb una constant elàstica de la molla de 42 N/m i una freqüència de ressonància de 330 kHz. Es van realitzar estudis tant de topografia com de contrast de fases.

### **3.3.5.5. Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier (FT-IR)**

L'estructura química dels polímers que conformen l'embolcall polimèric de les nanopartícules de poliuretà (PU) i poliurea (PUR) s'ha caracteritzat per Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier (FT-IR)

L'espectroscòpia d'infraroig és un tipus d'espectroscòpia d'absorció que utilitza la regió corresponent a l'infraroig de l'espectre electromagnètic. L'espectre d'infraroig consta de 3 zones ben diferenciades: l'infraroig proper que comprèn l'interval 13330-4000 cm<sup>-1</sup>, l'infraroig mig amb unes freqüències entre 4000 i 400 cm<sup>-1</sup> i finalment l'infraroig llunyà

que correspon a la regió entre  $400$  i  $10\text{ cm}^{-1}$ . Aquesta tècnica espectroscòpica consisteix en l'estudi de les vibracions moleculars que es produeixen en interaccionar una radiació electromagnètica amb la matèria. Els enllaços químics de les substàncies presenten freqüències de vibració específiques corresponents als nivells energètics de la molècula. Quan es fa incidir un feix de llum sobre una molècula amb una energia corresponent a la seva freqüència de vibració, aquesta llum pot ésser absorbida (la molècula experimenta un canvi en el seu moment dipolar durant la vibració) i en conseqüència apareix un senyal en l'espectre d'infraroig. En l'Espectroscòpia d'Infraroig per Transformada de Fourier la llum d'infraroig, en totes les longituds d'ona de la regió a estudiar (infraroig mig:  $2,5\text{-}15\ \mu\text{m}$ ), és dirigida cap a la mostra a través d'un interferòmetre. Una vegada ha interaccionat amb la mostra els senyals determinats són analitzats i s'obté un interferograma on es troben representades totes les freqüències de vibració. Cal destacar que la informació obtinguda en l'espectre d'infraroig és característica de cada substància i per tant es podran caracteritzar diferents molècules amb un cert grau d'especificitat. Tot i això, aquesta tècnica s'empra habitualment per anàlisis de tipus qualitatiu i no quantitatiu degut a la seva relativa baixa sensibilitat.



**Fig. 3.23.** Configuració òptica d'un espectròmetre d'infraroig per transformada de Fourier (SCT-UB, 2009).

La preparació de les mostres per a dur a terme les anàlisis espectroscòpiques ha consistit en aplicar una pel·lícula molt fina del liofilitzat de la suspensió de



nanopartícules (veure capítol 3.2.6.2) sobre una “pastilla” prèviament elaborada de bromur potàssic que actua com a suport. La pastilla de KBr sobre la qual s’ha dipositat la mostra ha estat premsada a elevades pressions (premsa hidràulica) per assegurar la seva translucidesa. El bromur potàssic es caracteritza perquè no absorbeix la radiació infraroja de tal manera que la informació obtinguda en l’espectre d’infraroig correspondrà únicament a la mostra analitzada. Una vegada preparades, les composicions s’han caracteritzat en un Espectròmetre d’infraroig per transformada de Fourier, Bomem MB-120, amb un rang de freqüències de treball de 350 a 5000  $\text{cm}^{-1}$  i una resolució màxima d’1  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.6. Estudis d’estabilitat de les nano-emulsions i nanopartícules

Per a estudiar l’estabilitat cinètica de les nano-emulsions, les composicions es van deixar reposar en un bany termostatat a 25°C durant un llarg període de temps (superior a 1 any). Per tal de mantenir la temperatura constant, els banys d’aigua de metacrilat de metil es van equipar amb un termòstat d’immersió (Tectron bio P Selecta) i un criostat (ThermoHaake®). La temperatura es va comprovar experimentalment amb un termòmetre de mercuri. Periòdicament es va realitzar una valoració macroscòpica de les nano-emulsions anotant la pèrdua de transparència (indicativa d’un procés de maduració d’Ostwald o coalescència), l’aparició de fenòmens de sedimentació ja sigui directa o inversa i els canvis en la viscositat de les mescles.

Paral·lelament, l’estabilitat cinètica de les nano-emulsions seleccionades es va estudiar determinant l’increment en el diàmetre de les gotes que constitueixen la fase interna i la polidispersió del sistema en un període de temps de 4 mesos mitjançant espectroscòpia de correlació fotònica (DLS). Aquests estudis també van permetre determinar el principal mecanisme implicat en la desestabilització de les formulacions.

Els estudis d’estabilitat en les nanopartícules també van consistir en una valoració macroscòpica de les composicions i en la determinació del diàmetre de partícula mitjançant espectroscòpia de correlació fotònica. Tot i que les determinacions amb DLS es van realitzar a 25°C, les nanopartícules de poliurea preparades amb estreptavidina i biotina es van emmagatzemar en nevera a 4°C per preservar millor la integritat dels biomaterials. Les nanopartícules de poliuretà amb polietilenglicol i les de poliurea amb lisina es van mantenir a 25°C en un bany termostatat. Els estudis es van dur a terme

durant un període de temps de 6 mesos. La valoració macroscòpica va consistir en la detecció de canvis en l'aspecte de les composicions, principalment l'aparició de precipitat. Un dels principals mecanismes d'inestabilitat en les nanopartícules en suspensió és el fenomen d'agregació. Amb la finalitat d'evitar aquesta agregació i millorar l'estabilitat de les composicions, es va estudiar el procés d'ultracentrifugació i de liofilització en les nanopartícules de PU i PUR. A continuació s'expliquen cadascun d'aquests processos.

### **3.3.6.1. Ultracentrifugació**

La ultracentrifugació es una tècnica separativa que permet aïllar les nanopartícules del medi en el que es troben suspeses mitjançant l'aplicació d'un elevat camp centrífug generat a partir de la rotació al voltant d'un eix a gran velocitat, que supera en escreix la força de gravetat. El procés d'ultracentrifugació es va dur a terme amb una ultracentrífuga Kontron (Centrikon T-1170) acoblada a un sistema de buit i emprant un rotor Kontron TFT 70,13 capaç de suportar una velocitat màxima de 70000 rpm. En tubs de centrífuga kontron es dipositen aproximadament dos grams de la suspensió de nanopartícules (poliuretà i poliurea) prèviament preparades i preservades a una temperatura de 4°C durant 24 hores. Les composicions es centrifuguen a 40000 rpm durant 1 hora a una temperatura de 10°C. En finalitzar el procés, s'elimina el sobrenedant i es recull el concentrat de nanopartícules ("pellet"). El sediment recollit es desseca a 25°C fins a l'eliminació de l'aigua en un dessecador de vidre emprant sílica gel com agent dessecant i clorur de cobalt com a indicador d'humitat. Les mescles es reconstitueixen amb aigua MilliQ fins a completar el pes inicial i s'homogeneïtzen durant 1 minut aplicant únicament agitació mecànica (vòrtex).

### **3.3.6.2. Liofilització**

En el procés de liofilització, l'eliminació de l'aigua (deshidratació) es produeix per sublimació en presència d'un alt buit després de congelar la mostra a baixes temperatures. Les nanopartícules de poliuretà (PEG 400) i les de poliurea (lisina) es van liofilitzar en un liofilitzador model Alpha 2-4 LD plus de Biobloc Scientific acoblat a una bomba de buit. Immediatament abans d'introduir les composicions en el liofilitzador, les suspensions de nanopartícules es submergeixen durant 5 minuts en una mescla de neu carbònica i acetona per a la seva congelació. Amb aquesta mescla

s'aconsegueix una temperatura de  $-78^{\circ}\text{C}$ . Depenent de la composició de les formulacions pot ser necessària la incorporació de crioprotectors. Per a la liofilització de les nanopartícules de PU i PUR no es va addicionar cap crioprotector ja que les mostres no es van alterar en ser congelades a tan baixa temperatura. Les condicions inicials de liofilització són de  $-89^{\circ}\text{C}$  i una pressió de buit de 0,1 mbar o inferior. El temps de liofilització depèn en gran mesura del volum i del tipus de mostra. Per a aconseguir la transició d'estat sòlid a estat gasós de l'aigua continguda en 5 ml de suspensió de nanopartícules, les mescles van romandre en el liofilitzador durant 48 hores. Les mostres liofilitzades s'emmagatzemen a  $25^{\circ}\text{C}$  en un dessecador de vidre per evitar la captació d'humitat. Per a realitzar la reconstitució de les suspensions s'addiciona la quantitat corresponent d'aigua milliQ al liofilitzat. Les mescles s'homogeneïtzen mitjançant agitació mecànica durant 1 minut. Finalment, les composicions es caracteritzen per DLS a  $25^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.7. Solubilització de ketoprofèn en nano-emulsions i nanopartícules seleccionades

La solubilització de ketoprofèn en **nano-emulsions** s'ha dut a terme mitjançant dos processos diferents depenent de com s'incorpora el fàrmac en les mescles, una vegada ja constituïda la nano-emulsió (**determinació de la concentració màxima de solubilització**) o bé en la mescla oli/tensioactiu prèvia addició de l'aigua (**solubilització d'una concentració determinada de ketoprofèn**).

Per a determinar la **concentració màxima de solubilització**, les nano-emulsions seleccionades es preparen a  $70^{\circ}\text{C}$  mitjançant l'addició lenta i successiva de petites quantitats d'aigua a les mescles oli/tensioactiu o oli/ tensioactiu/co-tensioactiu prèviament homogeneïtzades per agitació mecànica. Després de cada nova addició les mescles s'agiten amb vòrtex fins a esdevenir homogènies per a reduir al màxim l'índex de polidispersitat de la composició final. Un cop preparades es deixen reposar a  $25^{\circ}\text{C}$  en un bany termostat .

La determinació de la solubilitat màxima de ketoprofèn consisteix en l'addició de quantitats exactament pesades de principi actiu a una quantitat coneguda de nano-emulsió de manera que cada vegada es produeix un increment aproximat de la concentració del 0.1%. Després de cada addició, les mostres es sotmeten a ultrasons durant 15 minuts (si és necessari s'aplica calor), s'homogeneïtzen amb vòrtex i es deixen

reposar a un bany termostatat a 25°C durant 24 hores. Finalment es procedeix a l'observació visual de les mostres amb llum normal i polaritzada determinant si s'ha produït algun canvi en la transparència, aparició de precipitat, formació de cristalls sòlids macroscòpics, separació en fases i birrefringència. La detecció de qualsevol d'aquests fenòmens és indicativa de que no es pot solubilitzar més principi actiu en la nano-emulsió i s'ha assolit per tant la concentració màxima solubilitzada.

Per a preparar **nano-emulsions amb una concentració determinada de ketoprofèn**, es pesen acuradament les mescles oli/tensioactiu o oli/tensioactiu/ co-tensioactiu, depenent del sistema, s'escalfen a 70°C i s'homogeneïtzen amb vòrtex. A continuació s'addiciona la quantitat de ketoprofèn exactament pesada que correspon a la concentració desitjada de fàrmac en la nano-emulsió. Les mescles amb el ketoprofèn incorporat s'escalfen a 70°C i s'homogeneïtzen amb agitació mecànica fins a la total solubilització del principi actiu. En algunes composicions i per a concentracions de ketoprofèn  $\geq 1\%$  en pes s'apliquen ultrasons per tal d'afavorir la solubilització d'aquest. Finalment, s'addiciona lenta i progressivament el component aquós prèviament escalfat a 70°C. Les dispersions obtingudes es deixen reposar en un bany termostatat a 25°C. Les nano-emulsions són observades visualment amb llum normal i polaritzada. Posteriorment, es determina el diàmetre de gota i l'índex de polidispersitat per DLS.

La incorporació de ketoprofèn en les **nanopartícules** de poliuretà i poliurea únicament s'ha dut a terme una vegada preparades les formulacions ja que el grup carboxílic present en el principi actiu, és susceptible de reaccionar amb el diisocianat impedit la formació de l'embolcall polimèric. Així, les nanopartícules de PU i PUR es preparen a partir de nano-emulsions tal i com es descriu al capítol 3.2.3.2. de l'apartat de material i mètodes. Després de reposar 24 hores en un bany termostatat a 25°C, s'addicionen quantitats exactament pesades de ketoprofèn en una quantitat coneguda de suspensió de nanopartícules. Les composicions es sotmeten durant 15 minuts a un bany d'ultrasons amb gel per evitar que s'incrementi la temperatura durant la solubilització, s'homogeneïtzen amb agitació mecànica i es deixen reposar 24 hores a 25°C per a la seva observació. Aquest procediment es repeteix n vegades fins que s'observa algun canvi en l'aspecte macroscòpic de la composició que indicaria que ja no es pot solubilitzar més principi actiu en la formulació.

Per a preparar composicions amb un 0,5 o un 1% en pes de ketoprofèn es procedeix de la mateixa manera però en aquest cas, la quantitat de principi actiu necessària per a assolir la concentració requerida en la dispersió, s'incorpora en una única addició. Les composicions es sotmeten a ultrasons fins que visualment ja no es detecta la presència del fàrmac. Una vegada solubilitzat el ketoprofèn, les suspensions de nanopartícules es deixen reposar en un bany termostatat a 25°C.

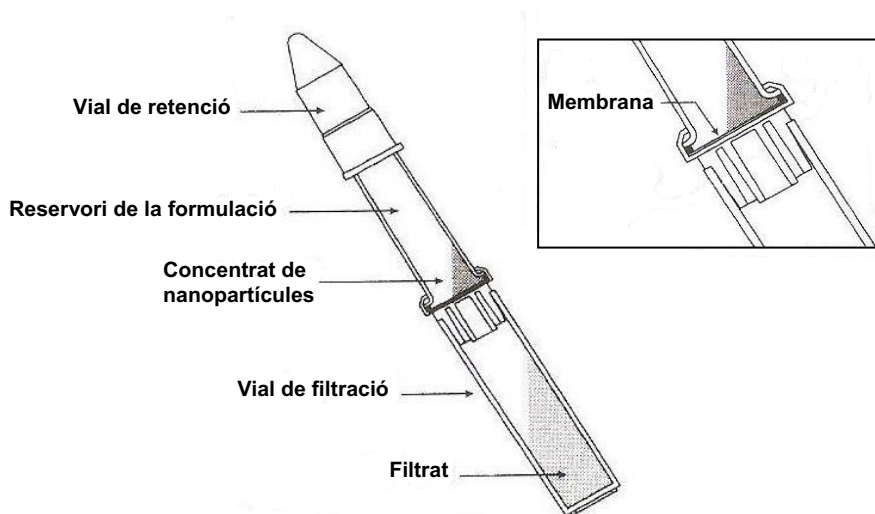
La determinació de la màxima concentració de ketoprofèn solubilitzada es va realitzar per HPLC. Prèviament, les composicions es deixen reposar un mínim de 24 hores en un bany termostatat a 25°C per tal d'afavorir la sedimentació dels cristalls de principi actiu que es formen en excedir la concentració de saturació. Per a poder quantificar el ketoprofèn solubilitzat, es va dur a terme una dilució 1:200 de les composicions a analitzar. Les condicions de l'anàlisi cromatogràfic van ser les següents:

- Equip: HPLC Waters; detector UV/vis Waters- 487, bomba binària Waters 1525. Autoinjector Waters 717 plus.
- Columna de fase reversa: Kromasil 100 C18 25x 0,46 cm, mida de partícula 5 µm.
- Fase mòbil: Està constituïda per una fase aquosa (3,299 g d'àcid cítric, 1,733 g de clorur sòdic, 0,0414 g d'hidròxid sòdic (quantitats per a preparar 1 l de solució), 45,5 % d'aigua) i una fase orgànica: 55% d'acetonitril. El pH de la fase aquosa es va ajustar a 3,00.
- Flux: 1ml/min.
- λ detector: 233 nm.
- Volum d'injecció: 20 µl.
- Temperatura: 25°C.
- Temps de retenció: 6,5 minuts.
- Recta de calibrat: Per a preparar els patrons es va emprar fase mòbil com a medi de dissolució. Les concentracions dels patrons oscil·len entre 1 i 200 µg/ml.

### 3.3.8. Eficiència d'encapsulació

L'eficiència d'encapsulació únicament s'ha determinat en les composicions corresponents a nanopartícules (nanopartícules de poliuretà i poliurea) pel mètode de filtració-centrifugació. Per a conèixer el percentatge en pes de ketoprofèn encapsulat es

van preparar composicions amb un 0,9 % en pes de principi actiu tal i com es descriu a l'apartat anterior. En dispositius de filtració-centrifugació Centricon (Amicon bioseparations, Millipore) que contenen una mebrana hidrofílica de baixa absorció (YM-100) amb un diàmetre de porus de 100000 Da., es dipositen aproximadament dos grams de la suspensió de nanopartícules. Les composicions es centrifuguen durant 4 hores a 4000 rpm en una centrífuga Sigma, model 301 K. En finalitzar el procés, el concentrat de nanopartícules queda retingut al filtre i la solució aquosa que conté el fàrmac lliure no encapsulat es recull en el vial de filtració tal i com es mostra a la Fig. 3.24.



**Figura 3.24:** Esquema dels dispositius de filtració-centrifugació Centricon

La concentració de fàrmac lliure present en el filtrat es quantifica per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en columna de fase reversa (veure capítol 3.2.6). A partir d'aquesta concentració i tenint en compte la quantitat de ketoprofèn incorporada en la formulació es pot determinar l'eficiència d'encapsulació d'acord amb la següent equació:

$$\text{Eficiència d'encapsulació: } \frac{Q_{\text{total}} - Q_{\text{lliure}}}{Q_{\text{total}}} * 100$$

on Q total correspon a la quantitat de ketoprofèn present en la suspensió de nanopartícules i Q lliure a la quantitat de fàrmac en solució (quantitat no adsorbida i/o encapsulada) expressades en µg/ml.

### 3.3.9. Estudis de cessió *in vitro*

Els estudis d'alliberació de ketoprofèn s'han realitzat en composicions corresponents a nano-emulsions i nanopartícules (PU i PUR). Per a dur a terme els assaigs d'alliberació, les composicions es preparen prèviament a concentració màxima de solubilització del ketoprofèn i es deixen reposar a 25°C durant 24 hores. Aquests estudis s'han dut a terme en vasos de vidre encamisats Vidrafoc connectats a un bany d'aigua termostatada a 37°C. Com a solució receptora s'ha emprat solució reguladora de fosfats a pH 7,4 (veure capítol 3.1.5.1.). Per a estudiar el % de fàrmac alliberat en funció del temps s'ha dut a terme una diàlisi directa. Així, cadascun dels vasos s'omple amb 180 ml de solució receptora i la formulació amb el ketoprofèn incorporat (2g exactament pesats) es diposita a l'interior d'un sac de diàlisi. Per a realitzar els assaigs es va seleccionar com a sac de diàlisi una membrana tubular de cel·lulosa regenerada Cellu-Sep® T3 (Orange Scientific) amb un gruix de paret de 20 µm i una mida de porus de 12000-14000 Da. A la figura 3.25 es mostra un esquema dels vasos encamisats on ja s'ha introduït el sac de diàlisi.

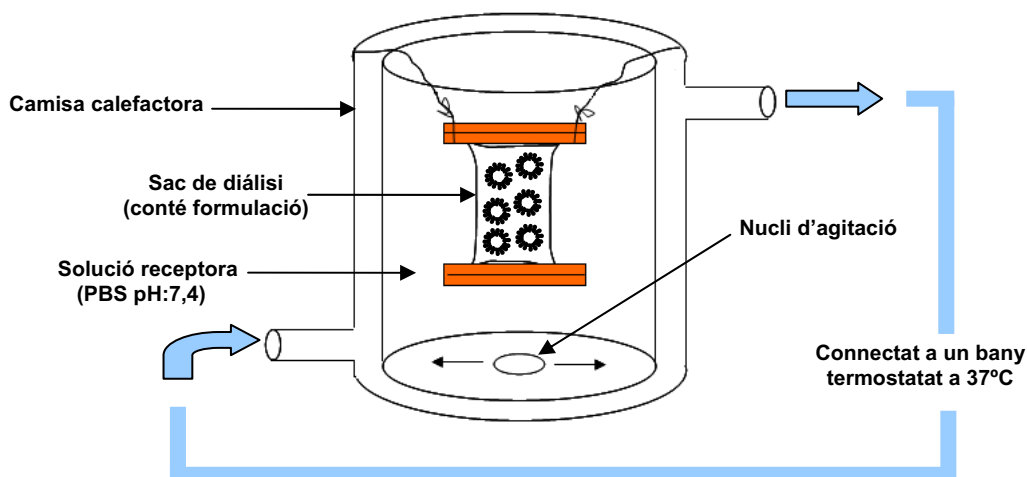


Fig.3.25.: Esquema dels vasos encamisats emprats en la diàlisi directa

A diferents intervals de temps i durant 6 hores s'extreuen 1000 µl de la solució receptora i es reemplacen per 1000 µl de PBS a pH 7,4 escalfat prèviament a 37°C. La solució receptora ha de mantenir-se en contínua agitació fins a la finalització de l'assaig per afavorir la correcta difusió del principi actiu a través de la membrana de cel·lulosa. Per a mantenir l'agitació s'han utilitzat plaques d'agitació magnètica SBS regulant la velocitat d'agitació a 250 rpm.

La quantificació de les mostres s'ha realitzat per HPLC mantenint les condicions ja esmentades al capítol 3.2.6. En aquest cas, els patrons per a la recta de calibrat es preparen a partir d'una solució mare en la qual s'ha emprat PBS a pH 7,4 com a medi de dissolució del ketoprofèn enloc de fase mòbil. Per a la calibració, s'han emprat concentracions de ketoprofèn compreses entre 1 i 100 µg/ml.

### **3.3.10. Efecte de les nano-emulsions O/W seleccionades sobre la pell *in vivo***

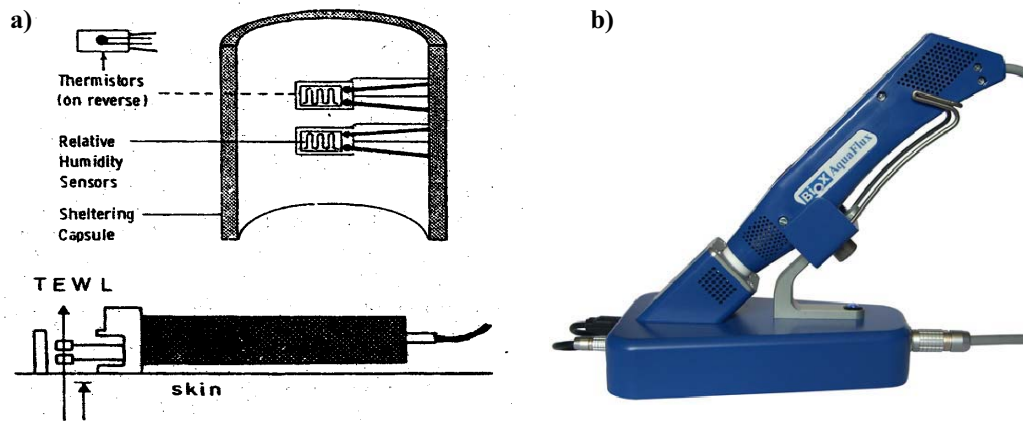
Per a determinar la tolerància de les nano-emulsions sobre la pell s'ha utilitzat un evaporímetre que mesura la pèrdua transepidermica d'aigua (Transepidermal Water Loss, TEWL) que es produeix en aplicar una formulació, és a dir, la quantitat total de vapor d'aigua que s'evapora per unitat de superfície i temps. Aquest mètode va ser desenvolupat per Nilsson (Nilsson, 1977) i es basa en la primera llei de Fick. Per tant, considera que el gradient de pressió de vapor existent prop de la superfície de la pell és aproximadament proporcional a la diferència que hi ha en la pressió de vapor mesurada entre dos punts fixes i separats en línia perpendicular a la superfície en la zona de difusió. Aplicant la següent relació:

$$(1/A)(dm/dt)=-D dp/dx$$

on A és l'àrea de superfície (m<sup>2</sup>) en contacte amb la pell, m la massa d'aigua transportada expressada en g, t el temps en hores, D una constant relacionada amb el coeficient de difusió i amb un valor de 0,0877g/mh (1/mmHg), p la pressió parcial atmosfèrica de vapor d'aigua en mm Hg i x és la distància en metres de la superfície, es dedueix que la velocitat d'evaporació (dm/dt) és proporcional al gradient de pressió parcial, dp/dx i per tant es pot determinar mesurant aquest últim.

L'aparell consta principalment d'una petita àrea de mesura protegida per una càpsula de Teflon i de dos sensors situats respectivament a 3 i 9mm de la superfície de la pell que determinen tant la humitat relativa com la temperatura en aquests punts i a partir dels senyals derivats d'aquests sensors, es determina la pressió parcial de vapor d'aigua a les dues distàncies de la superfície, el gradient de pressió parcial i la velocitat d'evaporació (veure fig.3.26).





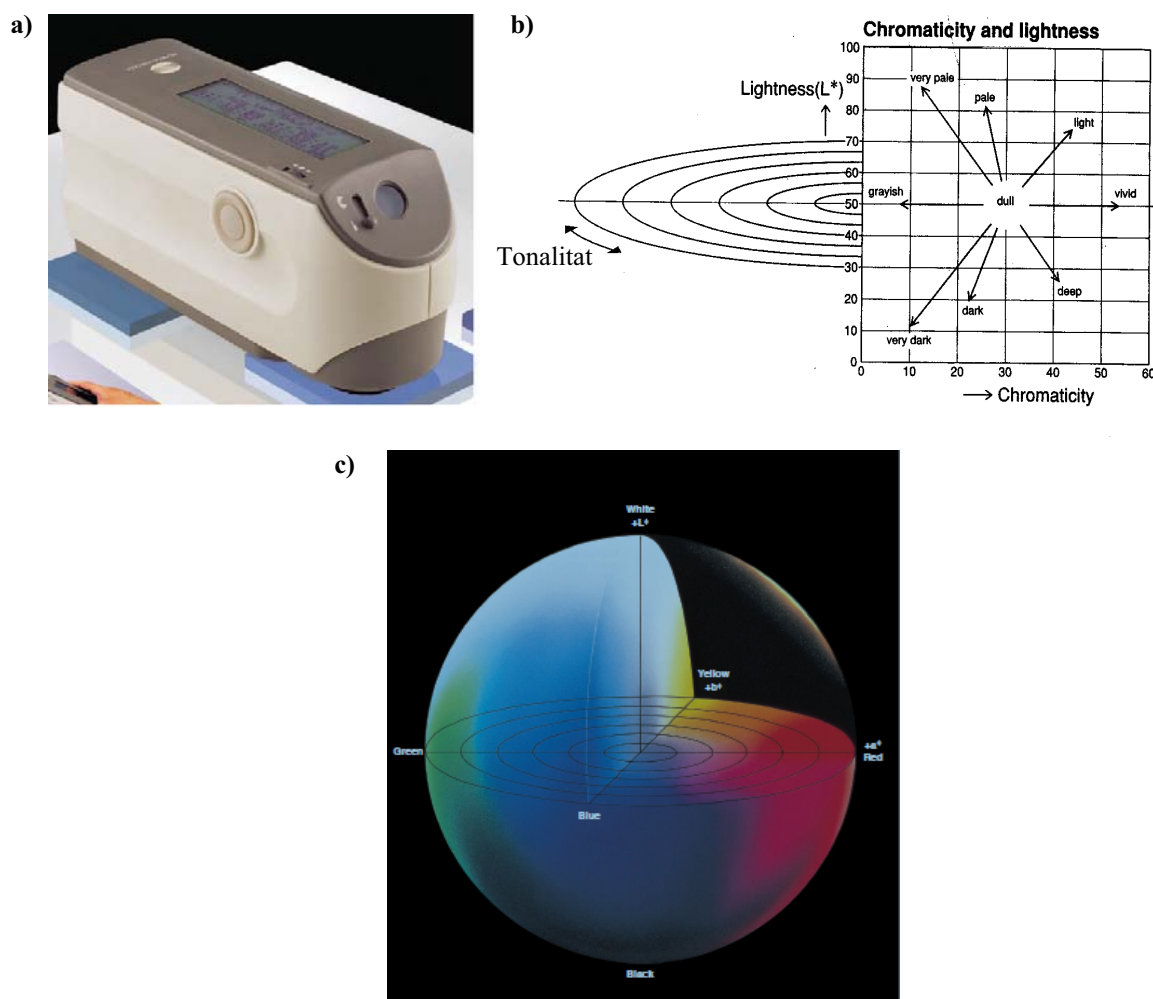
**Figura 3.26:** a) Diagrama esquemàtic de la unitat sensora de l'Evaporímetre que mostra els transductors de la humitat relativa i de la temperatura. A la part inferior, el dispositiu aplicat sobre la superfície de la pell (Pinnagoda, 1995). b) Imatge de l'Evaporímetre Aquaflux model AF102 (Biox Systems LTD).

L'estudi de la tolerància de les nano-emulsions sobre la pell s'ha dut a terme en l'avantbraç de voluntaris sans, en una sala amb temperatura i humitat relativa controlada ( $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  i  $50\pm 5\%$ ). Els voluntaris han de romandre a la sala com a mínim 15 minuts abans de l'inici de l'assaig amb la finalitat d'adaptar-se a les condicions. En primer lloc es neteja la zona de mesura amb paper de cel·lulosa i s'aplica un teixit oclusiu (Foam 3M<sup>®</sup>) que s'adhereix sobre la pell de l'avantbraç deixant uns orificis de 1,5 cm de diàmetre per a poder aplicar les diferents formulacions sense principi actiu després de realitzar les corresponents mesures basals de pèrdua transepidermica d'aigua. Degut a la naturalesa líquida de les nano-emulsions abans d'aplicar les composicions els orificis es recobreixen amb una capa fina de paper de cel·lulosa. Sobre cada orifici es dipositen uniformement 200  $\mu\text{l}$  de formulació i es cobreixen amb un apòsit oclusiu (Scotch<sup>®</sup> Tapping) durant 2 hores. Transcorregut aquest temps es retiren completament les nano-emulsions i es mesura el TEWL a diferents intervals de temps durant dues hores. Com a blanc s'utilitza aigua Milli Q.

Per a poder avaluar la innocuïtat de les nano-emulsions en ser aplicades sobre la pell també s'han realitzat determinacions del color sobre la superfície d'aplicació de la formulació mitjançant un espectrofotòmetre. Aquests estudis s'han dut a terme conjuntament amb les mesures de TEWL en els mateixos intervals de temps. Abans d'aplicar les diferents nano-emulsions i l'aigua MilliQ sobre la pell s'han determinat els

valors basals. L'espectrofotòmetre utilitzat consta de 40 sensors que mesuren la llum reflectida en una regió de longituds d'ona estrictament definida dins del rang de longituds d'ona de la llum visible. La utilització d'un espectrofotòmetre per mesurar el color permet detectar el fenomen del metamerisme (dos colors semblen iguals o diferents en funció del feix de llum incident). Per a poder avaluar aquest fenomen es necessari mesurar les mostres amb diferents feixos de llum que donin distribucions de potència espectral molt diferents com per exemple il·luminant A (llum incandescent) i il·luminant D<sub>65</sub> (llum blanca incloent les longituds d'ona de l'ultraviolat); malgrat que en l'espectrofotòmetre s'utilitza un únic feix de llum l'aparell disposa d'una base de dades que calcula dades colorimètriques per diferents fonts d'iluminació.

D'acord amb el mètode d'indexació de colors L\*a\*b proposat l'any 1976 per la CIE (Comission Internationale de l'Eclairage) els paràmetres que s'han determinat són la brillantor (L\* i L<sub>65</sub>\*) i les coordenades de cromaticitat (a\*, a<sub>65</sub>\*, b\* i b<sub>65</sub>\*). Els paràmetres a\* i b\* indiquen la direcció dels colors de manera que +a\* es indicatiu del color vermell, -a\* del color verd, +b\* del groc i -b\* del blau donant un centre acromàtic. A mesura que els valors de a\* i b\* s'incrementen i s'allunyen del centre més augmenta la saturació del color.



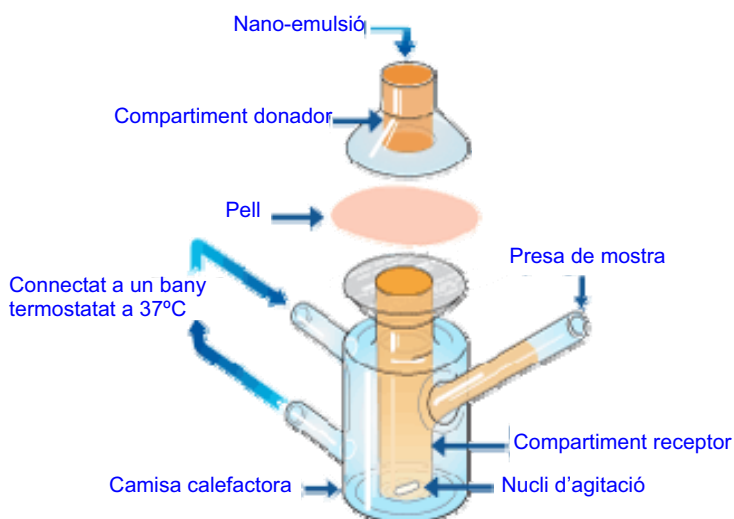
**Figura 3.27:** a) Imatge corresponent a l'espectrofotòmetre Konika Minolta model CM-2600d; b) Representació gràfica de la cromaticitat envers la brillantor (Konika Minolta, 2007; c) Diagrama cromàtic tridimensional de  $L^*a^*b^*$  (Konika Minolta, 2007)

### 3.3.11. Permeació cutània *ex vivo*

Per a la realització d'aquest estudi s'ha emprat pell d'orella de porc dermatomitzada (Zimmer Electric Dermatomed, Ref. 8821-06) a un gruix de 750  $\mu\text{m}$  des de la capa còrnia i cel·les de difusió de Franz de 1,5 cm de diàmetre (àrea de difusió 1,76  $\text{cm}^2$ ) i amb un volum de solució receptora comprès entre 5 i 6 ml.

Per al desenvolupament dels assaigs es preparen prèviament tant la solució reguladora de fosfats (en la qual ha de ser soluble el principi actiu que es vol estudiar), que s'introduirà en el compartiment receptor, com les nano-emulsions a concentració saturada de ketoprofèn, que es dipositaran en el compartiment donador. En el compartiment donador s'incorporen 2 ml de formulació. La solució receptora (solució reguladora de fosfats a

pH 7,4) ha de mantenir-se en contínua agitació magnètica durant tot el temps de durada de l'assaig. Ambdós compartiments estan separats per una capa fina de pell trobant-se la dermis en contacte amb la solució receptora (veure figura 3.28). La temperatura a la qual es realitza l'assaig de permeació és de 37°C. A diferents intervals de temps durant 8 hores s'extreuen 500 µl de solució del compartiment receptor que es reemplacen per 500 µl de solució reguladora de fosfats.

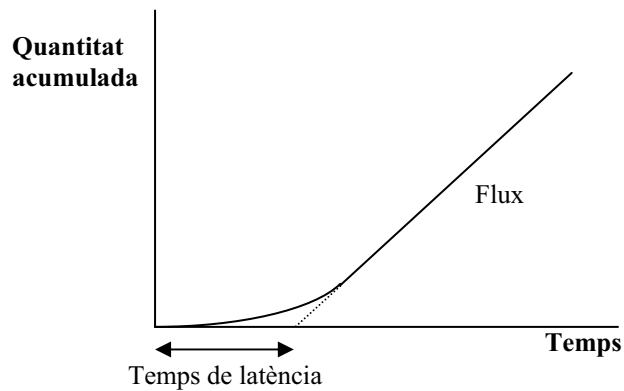


**Figura 3.28** : Esquema d'una cel·la de difusió de Franz (Permegear)

Les mostres s'han analitzat per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) en un cromatògraf Jasco equipat amb un detector de llum ultraviolada Jasco UV- 2075 plus i una bomba Jasco PN-2080 plus. El mètode utilitzat ha estat prèviament validat. Les condicions d'anàlisi per a quantificar el ketoprofèn es corresponen amb les descrites al capítol 3.2.6. tot i que el volum d'injecció per a determinar la concentració permeada va ser superior (50 µl enfront 20µl) i el temps de retenció lleugerament més baix (6,2 minuts). Per a la calibració es va solubilitzar ketoprofèn en PBS a pH 7,4. Les concentracions dels patrons estan compreses ente 1 i 70 µg/ml.

Les dades experimentals obtingudes dels assaigs de permeació *ex vivo* s'han ajustat al model de la dosi infinita en el qual la quantitat de principi actiu present en el compartiment donador és suficientment elevada com per a poder considerar negligible la disminució de concentració que es produeix amb el temps durant les 8 hores d'assaig. Així es pot representar gràficament la quantitat de principi actiu acumulada en el

compartiment receptor en funció del temps. La part lineal de la gràfica s'ajusta a una recta, on el pendent correspon al flux expressat en unitats de quantitat de principi actiu per àrea i temps, i de l'extrapolació sobre l'eix d'abscisses s'obté el temps de latència tal i com es mostra a la figura 3.29. Aquests paràmetres es calculen per cada replicat i la mitjana dels resultats dóna el valor de flux i el temps de latència per a cadascuna de les formulacions estudiades.



**Figura 3.29:** Representació esquemàtica de resultats de permeació a partir del model de dosi infinita.

L'anàlisi estadística dels resultats s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi de la variància (ANOVA) aplicant el test de comparació múltiple de Newman-Keuls. Les diferències s'han considerat estadísticament significatives per a aquells valors de  $p \leq 0,05$ . Per al tractament estadístic de les dades s'ha emprat el software Graphpad Prism versió 5.00.

## **4. RESULTATS I DISCUSSIÓ**

---

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ:

### 4.1. NANO-EMULSIONS

#### 4.1.1. Selecció de components i de sistemes aigua/tensioactiu/component oliós per a la formació de nano-emulsions

En aquest treball d'investigació, s'han preparat nano-emulsions de tipus O/W per mètodes d'emulsificació de baixa energia com a sistemes d'alliberació controlada de principis actius i com a medi de polimerització per a l'elaboració de nanopartícules polimèriques. Per a la formació de les nano-emulsions es van seleccionar components tensioactius, co-tensioactius i oliosos biocompatibles i adequats per a poder ser administrats per via parenteral i tòpica, d'acord amb les fonts bibliogràfiques consultades (Schmolka, 1991; Jumaa, 1998; Lawrence, 2000; Vandamme, 2002; Lee 2002; Strickley, 2004; BASFa, 2008; BASFb, 2008; BASFc, 2008; Abhijit, 2008; Jiao, 2008; Rowe, 2009; Ibrahim, 2009). Així, es van seleccionar fonamentalment tensioactius de tipus no iònic com són el Tween 80 i el Cremophor EL, que presenten un número HLB similar essent de 15 per al Tween 80 i comprés entre 12-14 per al Cremophor EL (Rowe, 2009); altres tensioactius no iònics (Lutrol F127, Lutrol F68 i Cremophor WO7) amb un número HLB > 20 per ambdós tipus de Lutrol i entre 4-7 per al Cremophor WO7 (Rowe, 2009) i un tensioactiu amfòter (Epikuron 170). Malgrat que s'han descrit casos de reaccions anafilàctiques atribuïdes al Cremophor EL i al Tween 80 quan s'empren com a agents solubilitzants en formulacions d'administració per via parenteral (Gelderblom, 2001; Tije, 2003; Aronson, 2006; Engels, 2007), a les baixes concentracions de tensioactiu requerides per a la formació de nano-emulsions i nanopartícules, el risc a desencadenar-se aquests efectes secundaris es redueix considerablement (He, 2003). De fet, existeixen preparats injectables ja comercialitzats que contenen Tween 80 o Cremophor EL com a component tensioactiu (Strickley, 2004). Per altra banda, les concentracions aprovades per la FDA per a formulacions d'administració intravenosa són del 10% i del 65% p/v per a Tween 80 i Cremophor EL respectivament (FDA, 2010). El component oliós d'elecció va ser un triglicèrid de cadena mitja, el Miglyol 812, molt utilitzat en la preparació de nano-emulsions i nanocàpsules (Santos- Magalhães, 2000; Anton, 2007; Mora-Huertas, 2010), i com a

component aquós es va emprar aigua purificada MilliQ. En alguns sistemes es va incorporar l'aminoàcid lisina (lys) i el polietilenglicol 400 (PEG 400). A la taula I es detallen els diferents sistemes estudiats.

**Taula I:** Composició dels sistemes estudiats per a la preparació de nano-emulsions O/W

---

<b>Sistema component aquós/Tensioactiu/Co-tensioactiu/component oliós</b>
Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812
Aigua/ PEG 400/Tween 80/ Miglyol 812
Aigua/ lisina/ Tween 80/ Miglyol 812
Aigua/ Tween 80/Lutrol F127/ Miglyol 812
Aigua/ Tween 80/ Lutrol F68/ Miglyol 812
Aigua/ Tween 80/ Cremophor WO7/ Miglyol 812
Aigua/ Tween 80/ Epikuron 170/ Miglyol 812
Aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812
Aigua/ Cremophor EL/ Lutrol F127/ Miglyol 812
Aigua/ Cremophor EL/ Lutrol F68/ Miglyol 812
Aigua/ Cremophor EL/ Epikuron 170/ Miglyol 812

---

### 4.1.2. Comportament fàsic

Amb la finalitat de delimitar les regions on es formen composicions líquides, isòtropses, transparents o translúcides corresponents a microemulsions i nano-emulsions de fase externa aquosa, s'ha estudiat el comportament fàsic a 25°C de diferents sistemes aigua/tensioactiu no iònic/ co-tensioactiu/ component oliós. Les fases s'han assignat per observació visual de les composicions. Es va iniciar l'estudi amb el sistema ternari aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 i posteriorment, es van afegir com a components co-tensioactius lecitina d'origen vegetal (Epikuron 170) i tensioactius de tipus co-polímer en bloc com el Poloxàmer 188 (Lutrol F 68) i el Poloxàmer 407 (Lutrol F127), que s'utilitzen habitualment en l'elaboració de nanopartícules (Calvo, 1997; Vega, 2006; Huang, 2007; Puglia, 2008; Durand, 2009). També es va estudiar la influència en la formació de nano-emulsions O/W d'un tensioactiu amb un HLB baix, el Cremophor WO7, quan s'empra conjuntament amb el Tween 80.



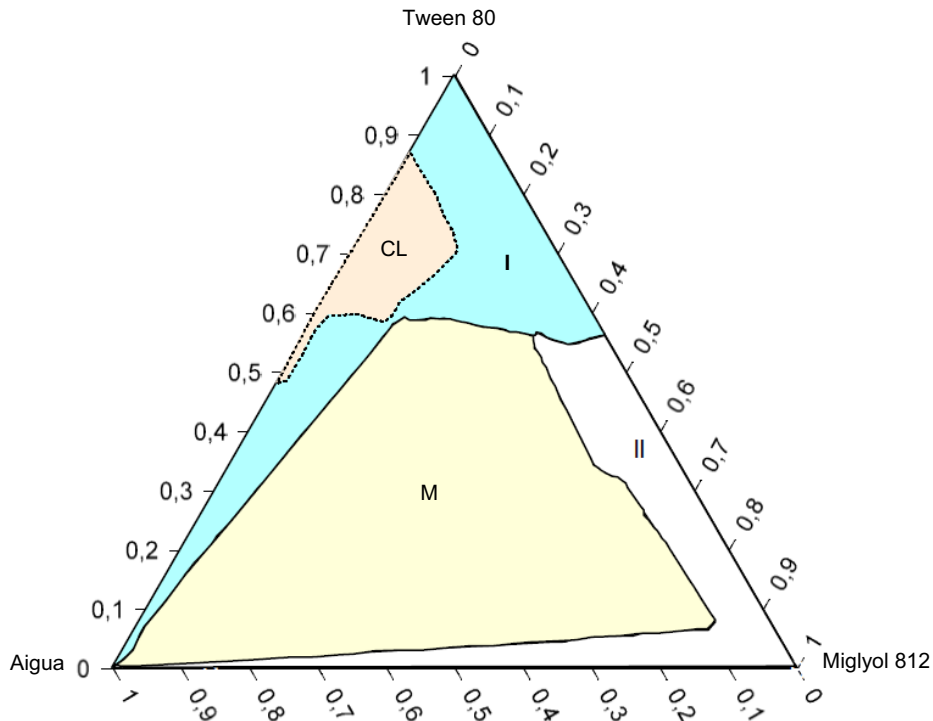
Per a estudiar el comportament fàsic es van elaborar els diagrames de fases de cadascun dels sistemes tal com s'explica al capítol 3.3.1. Malgrat que totes les observacions es van realitzar a 25°C, degut a la formació d'estructures que confereixen una elevada viscositat a les mecles, en alguns sistemes les composicions es van escalfar a 70°C per a facilitar l'homogeneïtzació dels components després de les corresponents addicions d'aigua. Una vegada homogeneïtzades, les mecles es van deixar reposar a 25°C durant un interval mínim de temps de 24 hores.

A continuació es mostren els diferents diagrames de fases obtinguts quan s'utilitza Tween 80 o Cremophor EL com a component tensioactiu.

#### 4.1.2.1. Sistemes amb Tween 80 com a tensioactiu

##### Sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812

A la figura 4.1 es mostra el diagrama de fases a 25°C obtingut per observació visual de les mostres del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812.



**Fig.4.1:** Diagrama de fases obtingut per observació visual de les mostres a 25°C del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812. I: Regió líquida, transparent i isotròpica; II: Regió líquida bifàsica; CL: Regió anisòtropa; M: Regió multifàsica.

Quan es considera el sistema binari Tween 80/ Miglyol 812 es pot observar que el Miglyol 812 és soluble en Tween 80 fins a una concentració del 45% en pes. Per a concentracions de Miglyol 812 superiors, s'observa una ràpida separació en fases indicant que el tensioactiu Tween 80 és insoluble en el component oliós.

En relació al sistema binari aigua/ Miglyol 812 s'ha observat que els dos líquids són immiscibles en totes les proporcions assajades. En canvi, sobre l'eix Tween 80/ aigua es formen composicions transparents, per tant, ambdós components són miscibles entre si.

En la regió I del diagrama es formen composicions líquides isòtropes que poden ser solucions micel·lars, microemulsions o nano-emulsions. Aquesta regió s'estén des del vèrtex de l'aigua fins al vèrtex del tensioactiu solubilitzant un màxim del 15 % d'oli a concentracions d'aigua superiors al 30% en pes i un màxim del 43 % d'oli a baixes concentracions d'aigua.

Trencant la continuïtat d'aquesta zona, sobre l'eix aigua/ tensioactiu per a concentracions d'aigua compreses entre el 12 i el 51 % i solubilitzant un màxim d'un 18% de component oliós, apareix una regió de composicions anisòtropes amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal (CL). La presència de cristall líquid es va detectar per observació visual directa amb polaritzadors de llum.

La regió M correspon a una zona multifàsica on es formen emulsions amb diferent estabilitat cinètica. A mesura que augmenta la concentració d'aigua la desestabilització de les emulsions es produeix més ràpidament i a partir de concentracions d'aigua superiors al 65%, les composicions presenten una baixa estabilitat cinètica produint-se fenòmens de cremat en un període de 24 hores.

En la regió II les composicions són líquides, bifàsiques i amb fases isòtropes. En aquesta zona s'assoleix ràpidament l'equilibri ja que la separació en fases té lloc en menys de 24 hores.

A partir d'aquest sistema, es va estudiar l'efecte de l'addició d'un polietilenglicol de baix pes molecular, el polietilenglicol 400 i d'un aminoàcid, la lisina, en la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa. Els polietilenglicols i els aminoàcids són components utilitzats freqüentment en la preparació de nanopartícules per a augmentar la hidrofília del sistema i així prevenir el procés d'opsonització (Roser, 1998; Moghimi, 2003; Owens, 2006; Kumari, 2010). Amdós components es van solubilitzar en el component aquós en proporció aigua/ PEG 400: 111/1 (p/p) i aigua/ lisina: 299/1 (p/p). Aquestes proporcions es van fixar després de fer un estudi preliminar de preparació de

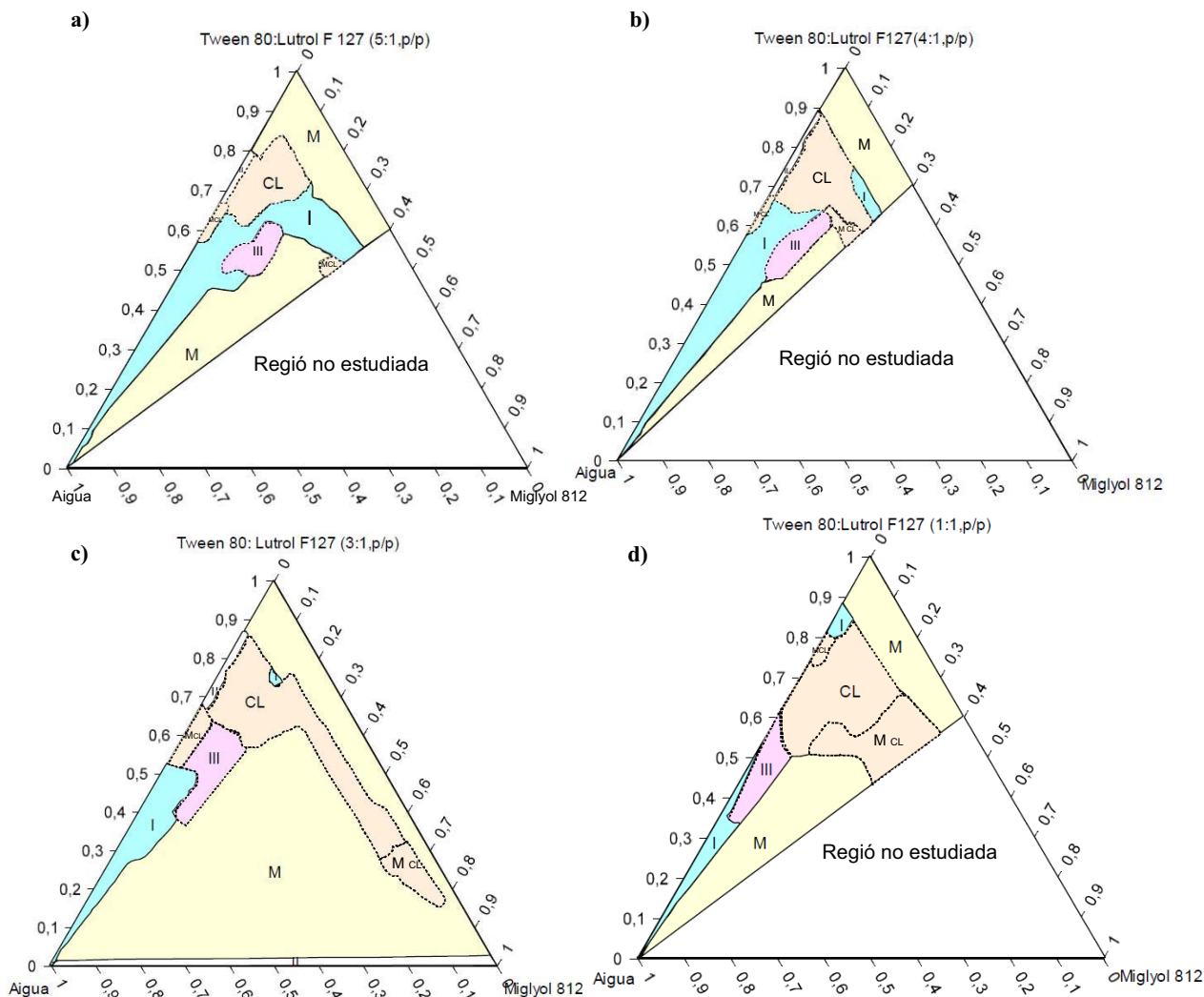
nanopartícules i comprovar que es podien formar amb una determinada quantitat de PEG 400 i lisina. Considerant les baixes concentracions de PEG 400 i de lisina en relació a l'aigua, la seva incorporació en el sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 no va suposar l'aparició de canvis significatius en les regions del diagrama.

Per tal d'incrementar la regió I cap a composicions amb una menor concentració de tensioactiu i una major proporció de component oliós, es van incorporar en el sistema ternari altres components tensioactius en diferents relacions en pes respecte al Tween 80. A continuació es detalla la influència de l'addició d'aquests co-tensioactius en el comportament fàsic.

### **Sistemes aigua/ Tween 80: Lutrol F127/ Miglyol 812 i aigua/ Tween 80: Lutrol F68/ Miglyol 812**

S'ha estudiat el comportament fàsic a 25° C de sistemes pseudo-ternaris del tipus aigua/ tensioactiu no iònic: co-tensioactiu/ component oliós. Com a component tensioactiu s'ha emprat Tween 80 i com a co-tensioactiu Lutrol F127 o Lutrol F68 en diferents relacions en pes. Ambdós tipus de Lutrol s'utilitzen habitualment en la formació de nanopartícules polimèriques per a estabilitzar i augmentar la hidrofília del sistema (Calvo, 1997; Moghimi, 2000; Vega, 2006; Huang, 2007; Santander-Ortega, 2007; Puglia, 2008; Durand, 2009). Per tant, es va considerar important estudiar la influència d'aquests tensioactius, que presenten un elevat HLB, en la formació de nano-emulsions O/W quan s'incorporen en un sistema que conté un triglicèrid de cadena mitja i un tensioactiu amb un HLB intermig (Tween 80). En estudis preliminars en els que es va determinar el comportament fàsic dels sistemes ternaris aigua/Lutrol F68/Miglyol 812 i aigua/Lutrol F127/Miglyol 812, es va posar de manifest la formació de composicions líquides i isòtropes únicament quan s'incorporaven concentracions molt baixes d'oli ( $\leq 1\%$  en pes). Així, per tal d'ampliar aquesta regió, es van seleccionar diferents proporcions en pes Tween 80/ Lutrol en les quals es va anar incrementant la concentració de co-tensioactiu. A la figura 4.3 es troben representats els sistemes aigua/ Tween 80: Lutrol F 127 (relacions 1:1, 3:1, 4:1 i 5:1, p/p)/ Miglyol 812 i a la figura 4.4 els sistemes aigua/ Tween 80: Lutrol F68/ Miglyol 812. En alguns sistemes únicament s'ha estudiat la regió amb una relació O/T inferior a 40/60, perquè és la zona que al sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 s'obtenien composicions transparents i isòtropes amb elevats continguts d'aigua.

**Sistemes aigua/ Tween 80: Lutrol F 127(1:1, 3:1, 4:1 i 5:1, p/p)/Miglyol 812**



**Fig.4.3:** Diagrames de fases a 25°C dels sistema aigua/Tween 80: Lutrol F 127/ Miglyol 812 amb diferents proporcions en pes Tween 80: Lutrol F127: a) 5:1, b) 4:1, c) 3:1 i d) 1:1. I: Regió líquida, transparent i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; III: Regió monofàsica, isòtropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M CL: Regió multifàsica anisòtropa; M: Regió multifàsica.

En aquests diagrames es poden observar fins a sis regions diferenciades: I, II, III, CL, M CL i M que es van modificant en funció de la proporció en pes de co-tensioactiu respecte al tensioactiu.

La regió I correspon a composicions líquides, transparents i isòtrops. En els sistemes estudiats (Fig.4.3), es pot observar que aquesta regió esdevé més àmplia com més baixa és la proporció en pes de co-tensioactiu (Lutrol F127).

En els sistemes amb una relació tensioactiu: co-tensioactiu 3:1, 4:1 i 5:1 pes/pes, sobre l'eix tensioactiu/ aigua i solubilitzant un màxim del 2% de Miglyol 812, es troba una petita regió bifàsica (II).

Cal destacar que la incorporació de Lutrol comporta la formació de composicions multifàsiques molt viscoses en l'eix tensioactiu/co-tensioactiu/Miglyol 812 fins i tot per a les mescles de tensioactius, en comparació amb el sistema sense Lutrol on el Miglyol 812 era soluble en Tween 80 fins al 45% en pes.

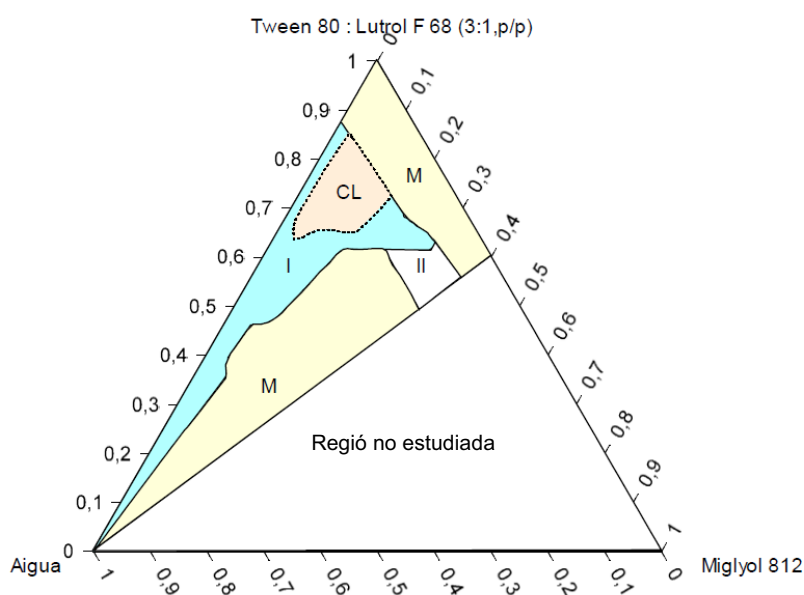
Hi ha una regió on es formen composicions anisòtropes amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal, identificades per observació visual directa amb polaritzadors de llum (CL i M CL). La regió CL correspon a composicions monofàsiques i la regió MCL a composicions multifàsiques. Aquesta zona va incrementant-se a mesura que augmenta la concentració del co-tensioactiu polimèric Lutrol F127. En els diferents diagrames, la formació d'estructures amb anisotropia òptica també s'ha observat sobre l'eix aigua/tensioactiu per a concentracions d'aigua compreses entre 18-38% (proporció en pes Tween 80: Lutrol F127 d' 1:1), 32-46% i 32-42% (proporcions en pes de 3:1 i 4:1-5:1 respectivament). En el sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F127(3:1, p/p)/ Miglyol 812 (Fig. 4.3.b) es pot observar com la regió anisòtropa s'estén cap el vèrtex del component oliós en solubilitzar concentracions d'aigua del 5-12% en pes en diferents mescles oli/tensioactiu.

En tots els sistemes estudiats, independentment de la relació tensioactiu: co-tensioactiu, s'ha detectat la presència d'una regió de composicions monofàsiques molt viscoses i isotropes (III) que podrien correspondre a estructures de cristall líquid cúbic. La ubicació d'aquesta zona es va desplaçant des de l'eix aigua/tensioactiu cap a relacions O/T superiors a mesura que disminueix la proporció en pes del co-tensioactiu respecte el tensioactiu (veure Fig. 4.3). Així, per a la relació Tween 80: Lutrol F127 de 5:1 (Fig.4.3.d), aquestes composicions es formen a partir d'una relació O/T de 15/85 mentre que per la relació 1:1 (Fig.4.3.a) ja apareixien per una O/T de 0/100.

Finalment la regió M correspon a composicions multifàsiques on es formen emulsions amb diferent estabilitat cinètica depenent de la concentració d'aigua. Per a concentracions d'aigua fins el 12% en pes, les composicions són molt viscoses mentre que aquelles més properes al vèrtex de l'aigua són líquides i amb menor estabilitat cinètica, observant-se fenòmens de cremat en transcórrer 24 hores.

**Sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F 68 / Miglyol 812**

El diagrama de fases representat a la figura 4.4 correspon al sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. D'acord amb els resultats obtinguts en els diagrames de fases aigua/Tween/ Miglyol 812 (figura 4.1) i aigua/Tween 80:Lutrol F127 (3:1),p/p)/Miglyol 812, únicament es va estudiar la zona compresa entre les relacions O/T 0/100 i O/T 40/60.



**Fig.4.4:** Diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F 68(3:1, p/p)/ Miglyol 812. I: Regió líquida, transparent i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; CL: Regió anisòtropa; M: Regió multifàsica.

En el sistema pseudo-binari aigua/ tensioactiu: co-tensioactiu es pot observar que la mescla de tensioactius i el component aquós són miscibles entre si a partir d'una concentració d'aigua superior al 10% en pes. Pel que fa a l'eix oli/tensioactiu, per a totes les proporcions estudiades es formen composicions multifàsiques molt viscoses degut a la presència de Lutrol F68 que és sòlid a temperatura ambient.

La regió I, que s'estén sobre l'eix aigua /tensioactiu a partir de concentracions d'aigua superiors al 10% en pes i s'expandeix fins a la relació O:T 30:70 per a concentracions d'aigua inferiors al 25% solubilitzant un màxim de 30% d'oli i fins la relació O/T:15/85 per aquelles concentracions més elevades del component aquós, correspon a composicions líquides i isòtrops. Cal destacar que aquesta zona és considerablement més gran en comparació amb el sistema que contenia Lutrol F127 en la mateixa

proporció en pes respecte al Tween 80 (veure Fig.4.3c) per a baixes concentracions d'aigua.

Per a concentracions d'aigua compreses entre un 12 i un 34 % en pes solubilitzant un màxim d'un 18% de component oliós, hi ha una zona on es formen composicions anisòtropes amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal (CL).

En la regió M, a partir de la relació O:T 20:80 i per a concentracions d'aigua superiors al 20% en pes, es formen emulsions fluides que es comencen a separar ràpidament en fases a partir de concentracions d'aigua superiors al 50% en pes. Per a concentracions d'aigua inferiors al 15% les composicions són multifàsiques i molt viscoses.

Al diagrama de fases també s'observa una petita zona (II) on s'obtenen composicions líquides bifàsiques, assolint-se ràpidament l'estat d'equilibri.

La reducció de la fracció en pes del Lutrol F68 en relació al Tween 80 (proporció en pes de 5:1) no va suposar la formació de noves regions ni canvis apreciables en les zones ja observades.

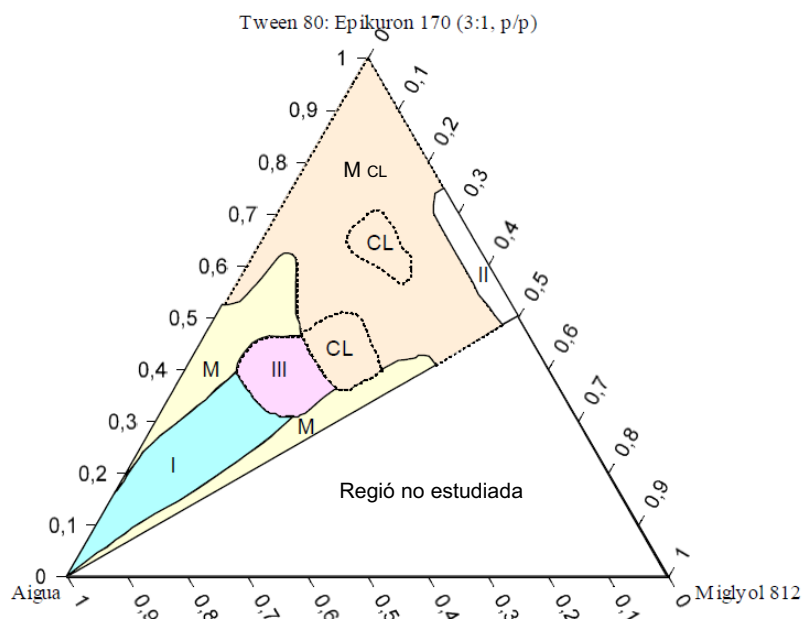
La substitució del co-tensioactiu Lutrol F127 pel Lutrol F68 únicament ha comportat la desaparició de la regió d'estructures isòtropes, molt viscoses (III) relacionades amb la formació de cristall líquid cúbic i l'estretament de la zona de composicions anisòtropes (CL) per a relacions O/T inferiors a la 40/60. Aquestes modificacions en el comportament fàsic es van atribuir a l'estructura molecular del Lutrol F68 que presenta un pes molecular molt inferior al del Lutrol F127 (veure apartat 3.1.2.1).

En relació al sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol pràcticament no es van observar diferències importants en les regions detectades tret de la formació de composicions multifàsiques i amb una elevada viscositat en incorporar el Lutrol F68 per a concentracions d'aigua inferiors al 12% en pes. Aquesta regió ja s'havia identificat en els sistemes amb Lutrol F127.

### **Sistema aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812**

S'ha estudiat el comportament fàsic a 25°C del sistema que conté Tween 80 com a tensioactiu i una lecitina d'origen vegetal com a co-tensioactiu. La figura 4.6 correspon al diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/ Tween 80: Epikuron 170/ Miglyol 812 amb una relació entre tensioactiu i co-tensioactiu 3:1, p/p. Aquesta proporció es va establir després de realitzar un estudi preliminar de solubilització de l'Epikuron 170 en

Tween 80 i comprovar que s'obtenien mescles homogènies per a determinades concentracions d'Epikuron. El comportament fàsic d'aquest sistema s'ha estudiat fins la relació O/T 50/50.



**Fig.4.6:** Diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. I: Regió líquida, transparent i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; III: Regió monofàsica, isòtropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M CL: Regió multifàsica anisòtropa; M: Regió multifàsica.

En el diagrama de fases de la Fig. 4.6 es poden observar fins a 6 regions: I, II, III, CL, MCL i M. A continuació es detalla cadascuna d'aquestes zones.

Pel que fa als sistemes binaris, sobre l'eix tensioactiu/oli i a partir de concentracions superiors al 25% en pes de Miglyol 812 es troba una estreta regió de composicions líquides, bifàsiques que s'estén cap el vèrtex de l'oli indicant que la mescla de tensioactius i el Miglyol 812 són immiscibles entre si. En canvi, la mescla de tensioactius és soluble en aigua fins a una concentració del 15% en pes, formant-se composicions monofàsiques, líquides i isòtropes corresponents a solucions micel·lars directes.

La regió I, que s'estén cap el vèrtex de l'aigua a partir de concentracions superiors al 50% en pes de component aquós per a relacions oli/tensioactiu compreses entre la 1/99 i la 45/55, solubilitzant com a màxim concentracions del 20% en pes de component oliós correspon a composicions líquides i isòtropes.



Per sobre d'aquesta zona I, per a concentracions d'aigua compreses entre el 40 i 50% en pes, les composicions són monofàsiques, molt viscoses i isotropes (III), suggerint la formació d'estructures de cristall líquid cúbic.

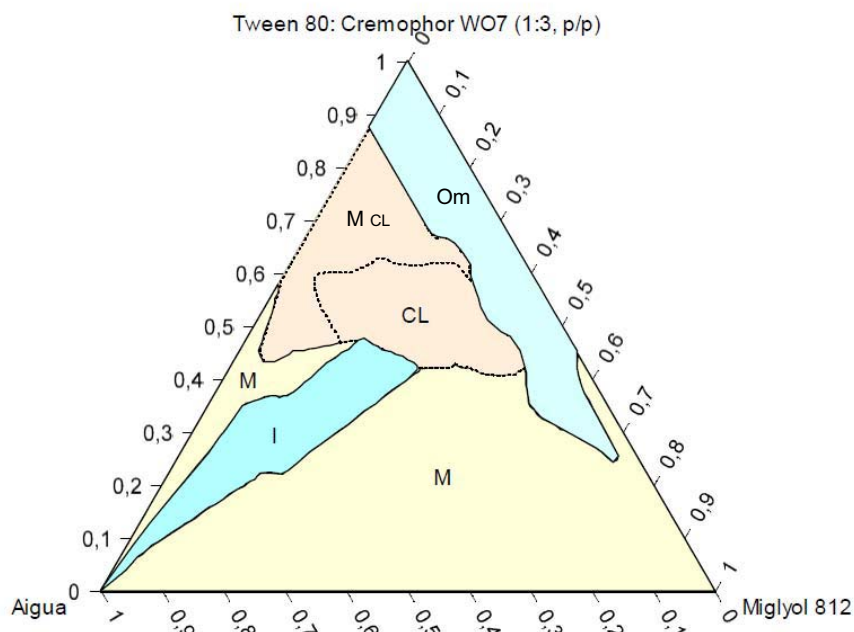
En el diagrama de fases d'aquest sistema apareix una regió molt extensa de composicions multifàsiques amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal (MCL) que s'estén des del vèrtex del tensioactiu cap el vèrtex de l'aigua fins a una concentració del 45% en pes d'aigua i cap el vèrtex de l'oli fins a la màxima relació O/T estudiada. La zona caracteritzada com a CL correspon a composicions monofàsiques on s'ha detectat la presència de cristall líquid.

La regió M correspon a composicions multifàsiques que presenten diferent viscositat en funció de la concentració de component aquós. Les composicions tendeixen a ser més fluides a mesura que s'apropen al vèrtex de l'aigua i per la relació O/T 50/50 s'observa la formació de cremat quan s'assoleixen concentracions d'aigua del 70% en pes.

En relació al sistema bàsic aigua/Tween 80/ Miglyol 812, s'observa que la incorporació d'Epikuron comporta un desplaçament de la zona I cap a composicions amb una major concentració d'oli, la desaparició d'aquesta zona a baixes concentracions d'aigua i una ampliació important de la zona de cristall líquid amb elevades concentracions de tensioactiu. La lecitina (Epikuron) degut a la seva important fracció lipòfila presenta un elevat paràmetre crític d'empaquetament que afavoreix la formació d'estructures anisòtropes per un determinat rang de concentracions de tensioactiu (Trotta, 1999).

### **Sistema aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812**

A la figura 4.5 s'ha representat el diagrama de fases del sistema aigua/Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812. EL Cremophor WO7, a diferència dels poloxàmers (Lutrol F 68 i Lutrol F127) utilitzats en els capítols anteriors, presenta un número HLB relativament baix comprès entre 4 i 6 (Basfd, 2010). La proporció d'1:3 entre Tween 80 i Cremophor WO7 es va seleccionar amb la finalitat d'estudiar si es podien formar composicions líquides i isotropes amb un elevat contingut d'aigua quan predomina la presència d'un tensioactiu amb un domini preferentment lipòfil (baix HLB). En estudis preliminars on es va estudiar el comportament fàsic del sistema ternari aigua/Cremophor WO7/Miglyol 812 aquest tipus de composicions únicament es va obtenir per a baixes concentracions d'aigua.



**Fig.4.5:** Diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812. I: Regió líquida, transparent i isòtropa; Om: Regió de composicions de fase reversa.; CL: Regió anisòtropa; M CL: Regió multifàsica anisòtropa; M: Regió multifàsica.

Pel que fa a les mecles tensioactiu/co-tensioactiu/oli, el Miglyol 812 és soluble en la mescla de tensioactius, mentre que aquests són insolubles en el component oliós.

Tal com s'observa a l'eix tensioactiu/co-tensioactiu /aigua, en la mescla Cremophor WO7: Tween 80 es poden solubilitzar quantitats d'aigua fins el 12 % en pes.

Entre les relacions O/T 20/80 i 40/60 i per a concentracions d'aigua superiors al 30% en pes es troba una regió (I) que s'estén fins el vèrtex de l'aigua on es formen composicions líquides i isòtropes. En relació al sistema bàsic aigua/Tween 80/ Miglyol 812, la incorporació de Cremophor WO7 comporta un notable desplaçament d'aquesta zona líquida isòtropa cap a majors concentracions d'oli.

El diagrama de fases del sistema aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812 mostra una regió Om de composicions monofàsiques, líquides i isòtropes que s'estén des del vèrtex del tensioactiu cap el vèrtex de l'oli solubilitzant fins a un 12 % d'aigua dependent de la concentració de tensioactiu. Aquesta regió correspon a solucions micel·lars o microemulsions de fase reversa.

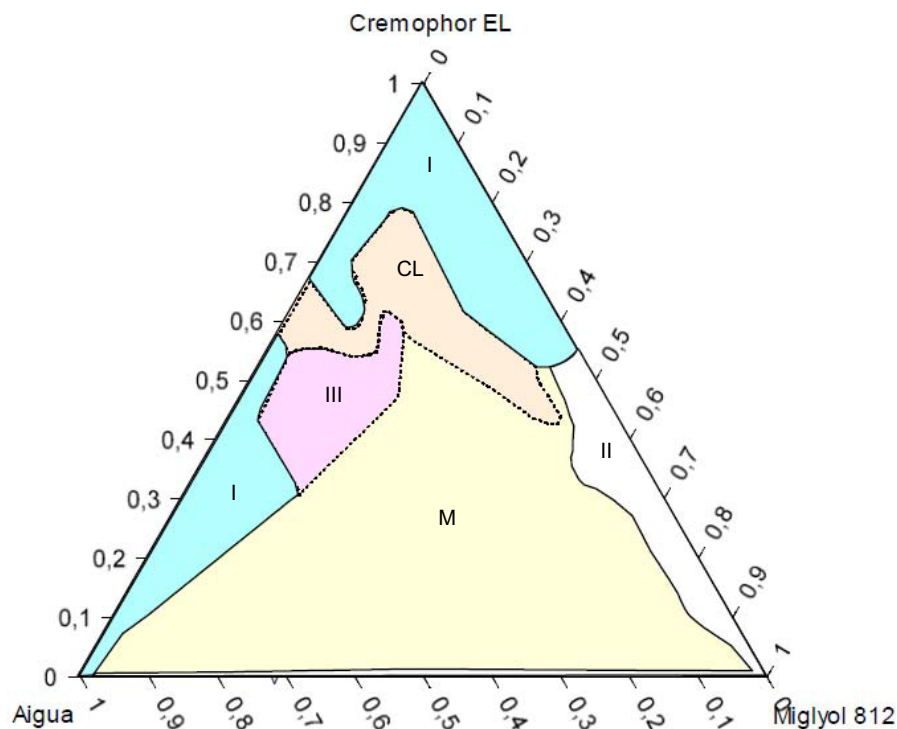
Les regions MCL i CL corresponen a composicions anisòtropses. Per a la formació d'estructures de cristall líquid laminar i /o hexagonal en aquest sistema es va requerir una concentració mínima del 10% en pes d'aigua. Aquestes composicions anisòtropses es van mantenir fins a una concentració màxima del 50% de component oliós.

La regió M correspon a emulsions amb major o menor estabilitat cinètica en funció de la concentració d'aigua i de component oliós. Com més properes al vèrtex de l'aigua i l'oli, més ràpidament es van observar fenòmens d'instabilitat.

#### 4.1.2.2. Sistemes amb Cremophor EL com a tensioactiu

##### Sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812

La figura 4.7 correspon al comportament fàsic a 25°C del sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812. Aquest sistema ha estat descrit a la literatura (Sadurní, 2005). Degut a que el tensioactiu Cremophor EL és de grau tècnic i que el component oliós correspon a una mescla de triglicèrids, es va considerar oportú determinar el diagrama de fases del sistema ja que hi poden haver algunes diferències segons el lot comercial del tensioactiu i del component oliós emprats.



**Fig.4.7:** Diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 12. I: Regió líquida transparent, i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; III: Regió monofàsica, isòtropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M: Regió multifàsica.

En relació als estudis desenvolupats per Sadurní et al. (2005) en els que es va determinar el comportament fàsic a 25°C del sistema aigua /Cremophor EL/ Miglyol 812 en condicions d'equilibri, no s'han obtingut pràcticament diferències en les regions observades tret de la formació d'una regió monofàsica isòtropa d'elevada viscositat que

correspondria a estructures de cristall líquid cúbic (regió III, Fig 4.7). Tot i això, en ambdós sistemes s'han identificat regions líquides isotropes (I), regions anisòtropes (CL), una regió bifàsica (II) i una àmplia regió multifàsica (M).

D'acord amb el diagrama de fases representat a la Fig. 4.7, les mescles binàries de Cremophor EL i aigua són miscibles pràcticament en totes les proporcions assajades, però per a composicions entre un 35 i 45% d'aigua es formen estructures anisòtropes. En relació a l'eix tensioactiu/ oli es pot observar que el Miglyol 812 és soluble en el tensioactiu fins a un 45% en pes mentre que el Cremophor EL no és soluble en el component oliós obtenint-se mescles bifàsiques.

Pel que fa a la regió I on es formen composicions líquides, transparents i isotropes es poden diferenciar dues zones depenent de la concentració de tensioactiu i aigua solubilitzades. Per a baixes concentracions d'aigua (inferiors al 35% en pes) i concentracions de tensioactiu superiors al 53% en pes es formen solucions micel·lars inverses i microemulsions W/O. Aquesta regió es lleugerament més àmplia que l'observada en el diagrama de fases de Sadurní et al (2005) solubilitzant-se un màxim d'un 34% en pes d'aigua. Per a concentracions d'aigua superiors al 42%, la regió I s'estén al llarg de l'eix aigua/tensioactiu i s'expandeix fins la relació O/T 35/75, aconseguint-se incorporar un màxim del 17% de component oliós. En el diagrama de fases de Sadurní et al. (2005), la major part d'aquesta zona, exceptuant les composicions que es formen sobre l'eix aigua/tensioactiu i solubilitzen un màxim del 3% d'oli (identificades com solucions micel·lars directes i microemulsions de fase externa aquosa), es troba descrita com a multifàsica ja que correspon a nano-emulsions O/W. Aquesta regió és lleugerament més estreta que l'obtinguda en els estudis de Sadurní et al. (2005) on es va aconseguir la formació d'aquest tipus de composicions fins la relació O/T 40/60.

Com ja s'ha esmentat anteriorment, entre les relacions O/T 8/92 i 35/65 i per a concentracions d'aigua en pes compreses entre el 23% i el 52% apareix una regió de composicions monofàsiques, molt viscoses i isotropes no observada en el diagrama de fases determinat per Sadurní et al. (2005) on, aquesta zona, correspondria a composicions multifàsiques amb estructures de cristall líquid.

Trencant la continuïtat de la regió I es troba una zona (CL) on es formen composicions amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal. Sadurní et al. (2005) van diferenciar una regió anisòtropa monofàsica de cristall líquid hexagonal propera a l'eix aigua/tensioactiu solubilitzant un màxim del 6% de Miglyol 812 i una regió monofàsica

de cristall líquid laminar per a concentracions O/T de 9/91 i de 50/50 i d'aigua compreses entre un 12 i un 23% en pes.

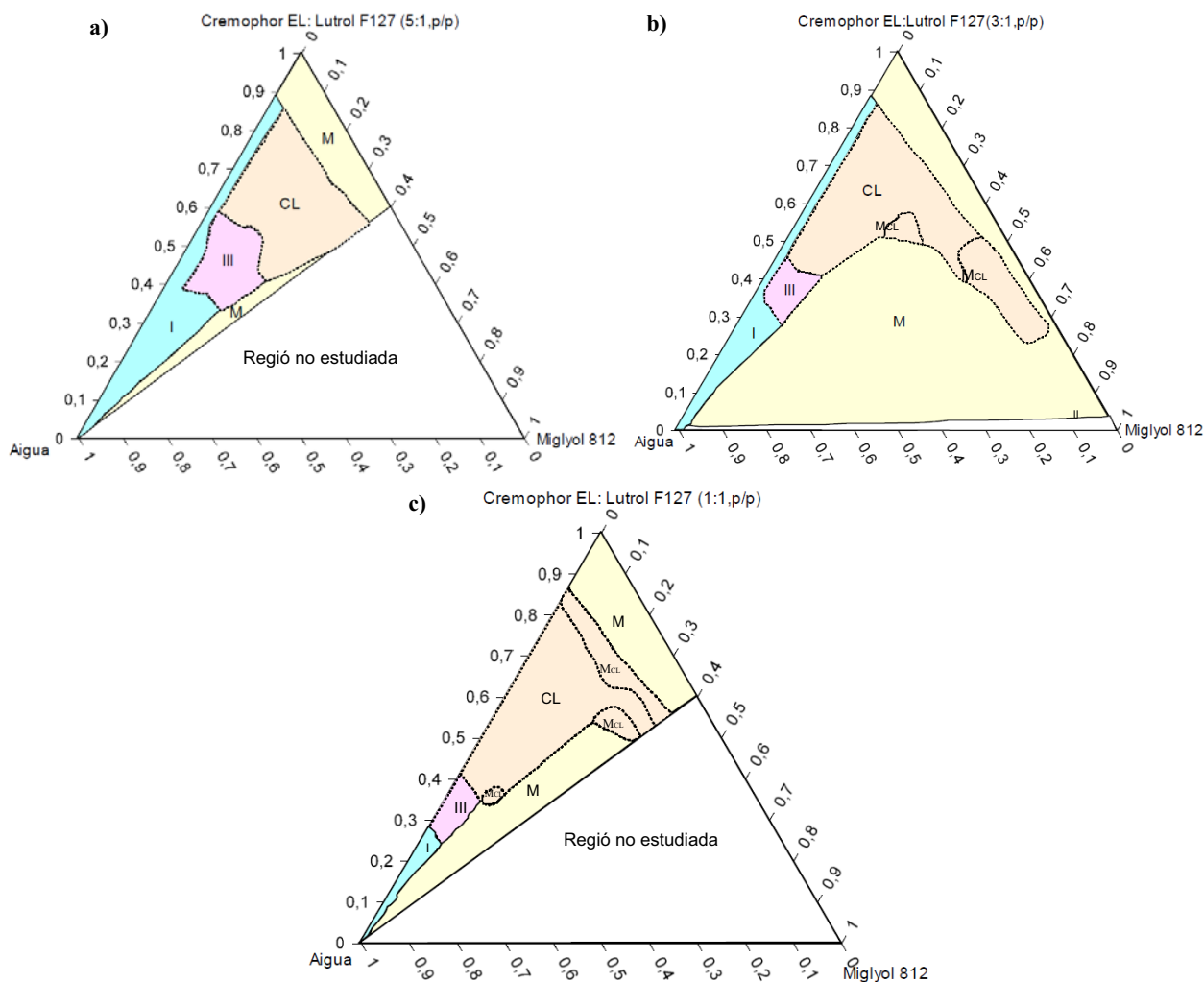
La regió M, que ocupa la part central del diagrama, correspon a composicions multifàsiques amb diferent viscositat depenent de la concentració d'aigua. Així les composicions són molt viscoses a la part superior de la regió i tendeixen a fer-se més fluides com més properes es troben als vèrtex aigua i oli. Per a concentracions elevades de component aquós i oliós es van observar fenòmens de desestabilització (cremat) en períodes de temps inferiors a 24 hores. En els estudis de Sadurní et al. (2005) on es van caracteritzar diferents composicions d'aquesta regió per microscòpia òptica i per espectrofotometria de dispersió de raigs X es va detectar la presència d'estructures de cristall líquid.

Pel que fa a la regió líquida bifàsica (II), no es van observar diferències entre ambdós diagrames de fases. En aquesta regió s'assoleix l'estat d'equilibri en períodes curts de temps, produint-se una ràpida separació en fases.

Finalment, destacar, que en relació al sistema ternari amb Tween 80 estudiat en capítols anteriors (Fig. 4.1) i considerant que ambdós tensioactius presenten un número HLB similar, en el sistema amb Cremophor EL com a tensioactiu es formarien composicions transparents, líquides isòtropes (regió I) amb un elevat contingut d'aigua capaces de solubilitzar majors concentracions de component oliós.

#### **Sistemes aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 127/ Miglyol 812 i aigua / Cremophor EL: Lutrol F68/ Miglyol 812**

Igual que als sistemes que contenen Tween 80 com a tensioactiu, s'ha estudiat la influència de la incorporació de Lutrol F127 i Lutrol F68 als sistemes amb Cremophor EL. Molts d'aquests sistemes s'han determinat únicament fins a una relació oli/tensioactiu 40/60. A la figura 4.8 es poden observar els diagrames de fases corresponents als sistemes aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 127 (relacions 5:1, 3:1 i 1:1, p/p)/ Miglyol 812, i a la figura 4.9 els sistemes aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (relacions 3:1 i 5:1, p/p)/ Miglyol 812.



**Fig.4.8:** Diagrames de fases a 25°C del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 127/ Miglyol 812 amb diferents relacions en pes Cremophor EL: Lutrol F127: a) 5:1, b) 3:1 i c) 1:1. I: Regió líquida transparent i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; III: Regió monofàsica, isòtropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M CL: Regió multifàsica anisòtropa; M: Regió multifàsica.

En aquests sistemes s'han identificat fins a 6 regions I, II, III, CL, MCL i M, depenents de la concentració en pes tensioactiu/co-tensioactiu.

Com ja es va observar en els diagrames amb Tween 80 com a tensioactiu (Fig 4.3), la incorporació de Lutrol F127 en el sistema comporta un desplaçament progressiu de la regió líquida i isòtropa (I) cap a l'eix aigua/tensioactiu, que es manifesta amb una reducció important d'aquesta zona sobretot per a proporcions elevades de co-tensioactiu. De fet, per al sistema amb una relació en pes tensioactiu:co-tensioactiu d'1:1 (Fig. 4.8c), aquest tipus de composicions únicament es formen per a elevades concentracions d'aigua (>70% en pes) i baixes concentracions de component oliós ( $\leq 5\%$  en pes).

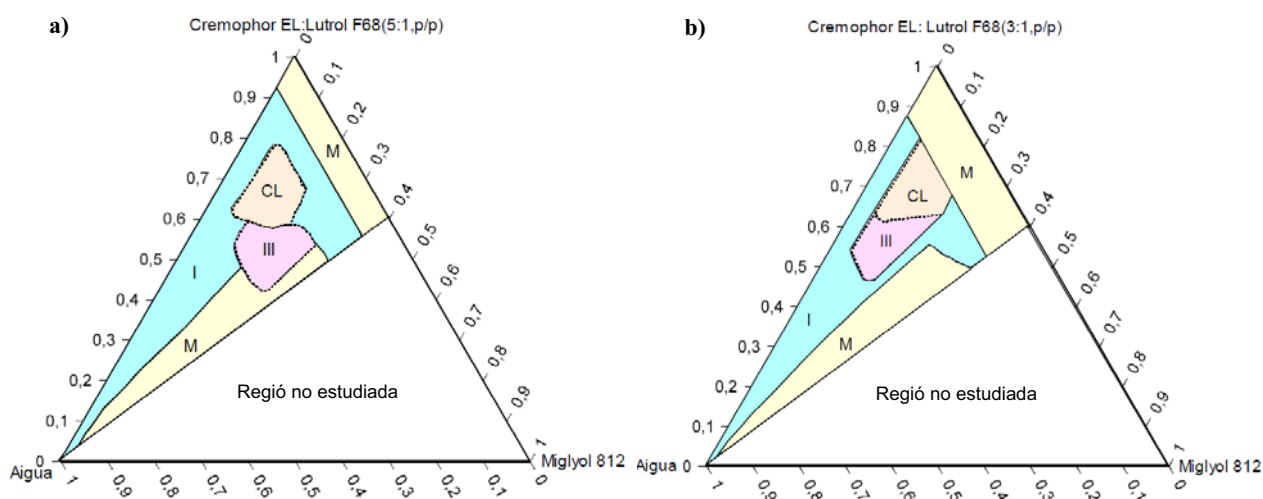
Pel que fa a les regions CL i MCL en les que s'obtenen composicions amb fases de cristall líquid laminar i/o hexagonal, en incorporar el co-tensioactiu Lutrol F 127, s'observa un augment considerable d'aquesta regió anisòtropa que creix gradualment

cap el vèrtex de l'aigua amb l'increment de la fracció en pes de Lutrol F127. Destacar que, per a la relació co-tensioactiu: tensioactiu d'1:1, aquest tipus d'estructures es formen fins i tot sobre l'eix aigua/tensioactiu per a un ampli rang de concentracions d'aigua (veure Fig. 4.8c). L'ampliació de la zona de cristall líquid, en incorporar Lutrol F127 al sistema ja s'havia observat en els sistemes amb Tween 80 (Fig 4.3).

En relació a la regió III, que es forma a continuació de la regió de cristall líquid en augmentar la concentració d'aigua, la incorporació de Lutrol F127 suposa un desplaçament cap a majors concentracions d'aigua i un estretament de la regió cap a l'eix aigua/tensioactiu en concordança amb la reducció de la zona de composicions líquides isotropes (I).

Finalment, igual que en els sistemes amb Tween 80 (Fig.4.3), l'addició del co-tensioactiu Lutrol F127 al sistema comporta la formació de composicions multifàsiques (M) d'elevada viscositat sobre l'eix oli/tensioactiu a baixes concentracions d'aigua (<15% en pes) que no s'observen al sistema bàsic (Fig. 4.7).

#### Sistemes aigua/ Cremophor EL : Lutrol F 68 (3:1 i 5:1, p/p)/ Miglyol 812



**Fig.4.9:** Diagrammes de fases a 25°C del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68/ Miglyol 812 amb diferents relacions en pes Cremophor EL: Lutrol F68: a) 5:1, b) 3:1. I: Regió líquida transparent i isotropa; III: Regió monofàsica, isotropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M: Regió multifàsica.

Quan es comparen els sistemes representats a les Fig. 4.8 i 4.9, es pot observar que la substitució del Lutrol F127 pel Lutrol F68 (de menor pes molecular i superior HLB), comporta una reducció considerable de la regió anisòtropa de cristall líquid (CL) per a elevades concentracions de tensioactiu, un estretament de la regió multifàsica a baixes concentracions d'aigua (veure figures 4.8a i 4.9a), i un eixamplament de la regió on es

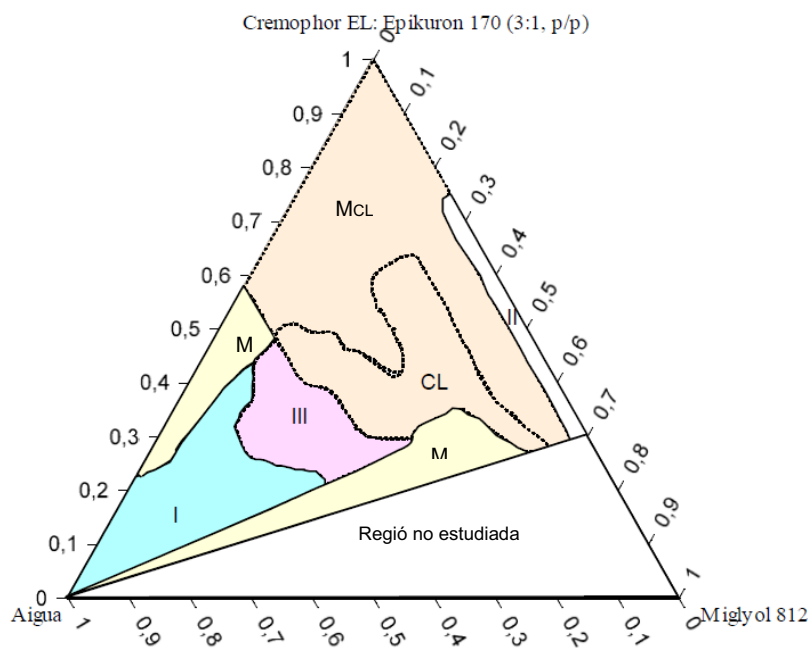
formen composicions líquides isòtropes (I) cap a una major concentració d'oli per a baixes concentracions d'aigua.

Pel que fa a l'increment de la fracció en pes de Lutrol F68 respecte al Cremophor EL, (Fig. 4.9) únicament s'observa un estretament a elevades concentracions de tensioactiu de la regió líquida i isòtropa (I) per a concentracions d'aigua compreses entre el 7% i el 12% formant-se, per aquestes proporcions, composicions multifàsiques d'elevada viscositat.

En relació al sistema bàsic aigua/Cremophor EL/Miglyol 812 (Fig. 4.7), amb la incorporació del co-tensioactiu Lutrol F68 al sistema, s'observa principalment una lleugera reducció de la zona I que es desplaça cap a l'eix tensioactiu/aigua per a elevades concentracions d'aigua i la desaparició de les regions de cristall líquid que es formaven en absència del component oliós.

#### **Sistema aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812**

S'ha estudiat la influència d'una lecitina d'origen vegetal, l'Epikuron 170, en la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa quan s'empra Cremophor EL com a tensioactiu. A la figura 4.10 es troba representat el diagrama de fases corresponent determinat a 25°C. Es va seleccionar una proporció en pes de 3:1 entre tensioactiu i co-tensioactiu. El sistema es va estudiar fins una relació O/T: 70/30.



**Fig. 4.10:** Diagrama de fases a 25°C del sistema aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. I: Regió líquida transparent i isòtropa; II: Regió líquida bifàsica; III: Regió monofàsica, isòtropa, d'elevada viscositat; CL: Regió anisòtropa; M CL: Regió multifàsica anisòtropa; M: Regió multifàsica.



En el diagrama de fases es pot observar una zona líquida i transparent (I) a partir de concentracions elevades d'aigua (superiors al 50%) capaces de solubilitzar fins a un màxim del 30% en pes de component oliós. Aquesta regió s'estén fins el vèrtex de l'aigua obtenint-se composicions amb elevades concentracions d'aigua i baixa concentració de tensioactiu idònies per a l'aplicació farmacèutica.

Les composicions de la regió II (sobre l'eix tensioactiu/oli) són líquides i bifàsiques ja que assoleixen ràpidament l'estat d'equilibri indicant la immiscibilitat dels diferents components.

Per a concentracions d'aigua entre el 30 i el 55% en pes i de Miglyol 812 superiors al 10 % en pes, es troba una regió de composicions monofàsiques, molt viscoses i isòtropes que suggereixen la presència de cristall líquid cúbic (III).

Des del vèrtex del tensioactiu estenen-se cap els altres dos vèrtex (aigua i component oliós) fins arribar a concentracions d'aigua del 42% en pes, es pot observar una àmplia zona de composicions anisòtropes ja siguin monofàsiques (CL) o multifàsiques (MCL). Sobre l'eix aigua/tensioactiu/co-tensioactiu i per a concentracions d'aigua entre el 42 i el 75% apareix una regió multifàsica, degut a que la mescla de tensioactius és soluble en aigua únicament fins a una concentració del 25%. Aquesta zona M incorpora un màxim del 10% en pes d'oli. Per a relacions O/T superiors a 55/45 i concentracions d'aigua del 15% s'observa també una regió de composicions multifàsiques (M).

Igual que en el sistema amb Tween 80, la incorporació d'Epikuron 170 al sistema bàsic aigua/Cremophor EL/ Miglyol 812 implica un notable desplaçament de la regió líquida isòtropa cap a composicions amb una major concentració d'oli quan s'incorporen elevades concentracions d'aigua, la desaparició d'aquestes mescles a baixes concentracions d'aigua i un increment considerable de la regió anisòtropa.

### 4.1.3. Preparació de nano-emulsions per diferents mètodes d'emulsificació i caracterització per espectroscòpia de correlació fotònica

S'han seleccionat diferents composicions amb un 90% o 95% en pes d'aigua de la zona líquida i isotropa (zona I) dels diagrames de fases. Les composicions seleccionades s'han preparat per diferents mètodes d'emulsificació amb la finalitat de determinar si es tractava de microemulsions o de nano-emulsions. Per a cada sistema es van preparar composicions fins a la màxima relació O/T amb la que s'havien obtingut composicions líquides, isotropes, transparents o translúcides. A la taula II es troben detallades cadascuna de les formulacions corresponents als sistemes bàsics i als que contenen Lutrol com a co-tensioactiu seleccionades per a aquest estudi. Les composicions dels sistemes amb Cremophor WO7 i Epikuron 170 es descriuran més endavant.

**Taula II:** Composició i nomenclatura de les formulacions seleccionades dels sistemes amb Tween 80 o Cremophor EL com a tensioactiu.

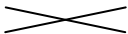
Sistema aigua/ tensioactiu no iònic/ oli	Formulació	Composició de formulacions amb un 90% en pes d'aigua
		Relació O/T
Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812	E1	10/90
Aigua/ Tween 80: Lutrol F127 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	F1	10/90
Aigua/ Tween 80: Lutrol F127 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	H1	10/90
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	F'1	10/90
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	H'1	10/90
Aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812	J1	10/90
	J2	20/80
	J3	30/70
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F127 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	I1	10/90
	I2	20/80
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F127 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	L1	10/90
	L2	20/80
	L3	30/70
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	N1	10/90
	N2	20/80
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	M1	10/90
	M2	20/80

Els mètodes d'emulsificació seleccionats s'han classificat en funció de com s'ha realitzat la homogeneïtzació (vòrtex o ultratúrrax) i de la temperatura. A la taula III es troben

descrits els diferents mètodes emprats. El procés de preparació de les composicions per cadascun d'aquests mètodes es troba detallat al capítol 3.3.2.

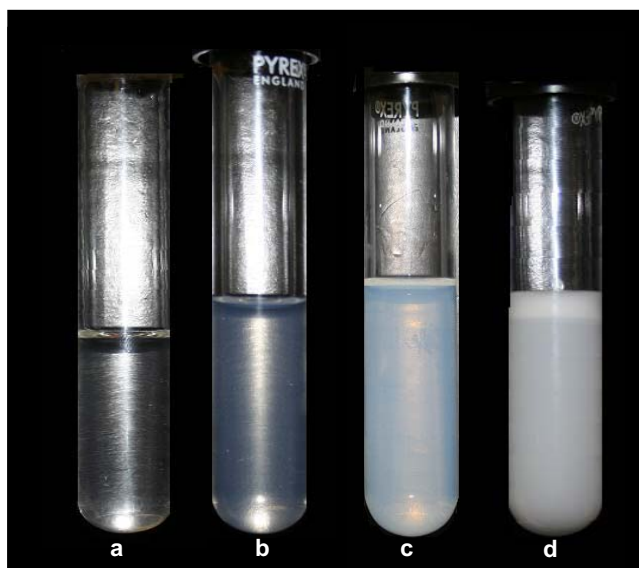
Una vegada preparades les composicions s'han deixat reposar en un bany termostatat a 25°C durant un període de temps de 24 hores.

**Taula III:** Mètodes d'emulsificació emprats per a la preparació de les composicions seleccionades.

	TEMPERATURA		
	25°C	50°C	70°C
VÒRTEX	A: Pesada directa	B: Pesada directa	E: Addicions successives d'aigua a la mescla oli/tensioactiu
	C: Addicions successives d'aigua a la mescla oli/tensioactiu	D: Addicions successives d'aigua a la mescla oli/tensioactiu	
ULTRATÚRRAX	F: Pesada directa		G: Pesada directa

El criteri de selecció ha consistit en una valoració macroscòpica (observació visual de l'aspecte de les mostres després de deixar-les en repòs a 25°C durant 24 hores). Quan es troben diferències en l'aspecte de la mescla obtinguda segons el mètode d'elaboració es considera que és una nano-emulsió perquè en les microemulsions, degut a la seva estabilitat termodinàmica es formen espontàniament i s'obtindria la mateixa mescla transparent i isòtropa independentment del mètode de preparació (Solans, 2003, 2005).

A la figura 4.11 es pot observar l'aspecte macroscòpic que presenten algunes de les composicions estudiades.



**Fig. 4.11:** Aspecte macroscòpic de composicions preparades per diferents mètodes d'emulsificació seleccionades de sistemes aigua/ tensioactiu no iònic/component oliós.

D'acord amb la figura 4.11, quan les composicions presenten l'aspecte de la imatge **a** es consideren com a dispersions fluides i transparents, si es corresponen amb la imatge **b** es poden descriure com dispersions fluides, transparents, blavoses i si son com la **c** com dispersions fluides, translúcides, blavoses. Finalment, si el seu aspecte és el de **d**, com a sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós.

Considerant aquesta classificació es va elaborar la taula IV on es descriu l'aspecte de les mescles preparades pels diferents mètodes d'emulsificació excepte les que contenen Cremophor WO7 i Epikuron 170.

**Taula IV:** Aspecte macroscòpic de les formulacions seleccionades amb concentracions d'aigua del 90% en pes preparades per diferents mètodes d'emulsificació.

Formulació	Mètodes d'emulsificació						
	A	B	C	D	E	F	G
E1	Dispersió fluida, translúcida	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida i transparent	Dispersió fluida i transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent
F1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent-translúcida (cremat a les 24 hores)	—	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida i transparent	—	Dispersió fluida, transparent
H1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent (cremat a les 24 hores)	—	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida transparent	—	Dispersió fluida, transparent
F'1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida i transparent	—	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent
H'1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida i transparent	—	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent	Dispersió fluida, transparent
J3	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, translúcida tèrbola i blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa
I2	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent-translúcida, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa
L2	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent - translúcida blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, blavosa
L3	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, translúcida, blavosa	—	Dispersió fluida, translúcida, blavosa	Dispersió fluida, translúcida, blavosa	—	Dispersió fluida, translúcida-tèrbola, blau-blanquinosa
N1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent-translúcida, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa
N2	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol, blanquinós	Dispersió fluida, transparent - translúcida i blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, translúcida-tèrbola, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa
M1	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent-translúcida, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, lleugerament blavosa
M2	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió fluida, transparent - translúcida, blavosa	—	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, transparent, blavosa	Dispersió fluida, translúcida-tèrbola i blavosa	Dispersió fluida, transparent i blavosa

\* Les composicions J1, J2, H1 i L1 no consten en aquesta taula ja que únicament es van preparar pels mètodes A i E amb la finalitat de discriminar si corresponien a microemulsions o nano-emulsions. Quan les mescles es preparen pel mètode A s'obtenen composicions multifàsiques, fluides, tèrboles i blanquinoses mentre que pel mètode E es van formar dispersions fluides, isòtropes, transparents o translúcides i lleugerament blavoses.

Totes les composicions seleccionades corresponen a nano-emulsions ja que a diferència de les microemulsions, depenen del mètode d'emulsificació i no s'han pogut preparar o presentaven diferències en el seu aspecte macroscòpic per a tots els mètodes utilitzats. Així, les formulacions amb Lutrol F68 i Lutrol F127 com a co-tensioactiu no s'han pogut preparar a 25°C per addicions successives d'aigua a la mescla oli/tensioactiu (mètode C) degut a la dificultat d'aconseguir la homogeneïtat de la mescla a 25°C. Quan les composicions es preparen pel mètode A són multifàsiques i tèrboles excepte la corresponent al sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 que presentava un aspecte translúcid. La preparació pels altres mètodes d'emulsificació dona lloc a composicions més o menys transparents, sent el mètode més eficaç d'acord amb la valoració macroscòpica, el que consisteix en addicionar l'aigua a 50°C a la mescla oli/ tensioactiu homogeneïtzant amb agitació mecànica (vòrtex). Amb aquest mètode totes les composicions obtingudes eren completament transparents (pel mètode B les composicions amb Cremophor El i Lutrol F68 o F127 eren translúcides), requerint una temperatura d'emulsificació inferior als 70°C per a la seva formació i sense la necessitat d'haver d'aplicar una força de cisalla (ultratúrrax).

Amb la finalitat de seleccionar el millor mètode d'emulsificació per a la preparació de les nano-emulsions, les composicions es van caracteritzar per DLS a 25°C. Únicament es van caracteritzar aquelles composicions preparades a 50°C i 70°C (mètodes B, D, E i G) amb els quals es va aconseguir la formació de dispersions líquides, transparents o translúcides amb la major part de les formulacions. A la taula V es poden observar els valors del diàmetre de gota i els índex de polidispersitat de les nano-emulsions preparades pels diferents mètodes d'emulsificació. Les determinacions de la mida de gota es van dur a terme després de deixar reposar les composicions en un bany termostatat a 25°C durant 24 hores.

**Taula V:** Diàmetre de gota i índex de polidispersitat determinats per DLS a 25°C de les composicions preparades pels mètodes B, D, E i G.

Nano-emulsió	Mètode d'emulsificació							
	B		D		E		G	
	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P
E1	12,28	0,236	<b>11,57</b>	<b>0,178</b>	<b>13,76</b>	<b>0,154</b>	29,19	0,617
F1	16,76	0,460	13,37	0,360	<b>16,37</b>	<b>0,302</b>	17,43	0,501
H1	13,37	0,360	<b>12,43</b>	<b>0,309</b>	<b>12,15</b>	<b>0,310</b>	15,95	0,447
F'1	30,87	0,244	25,12	0,223	<b>23,63</b>	<b>0,186</b>	31,85	0,227
H'1	19,35	0,248	19,01	0,213	<b>16,78</b>	<b>0,176</b>	—	—
J3	28,30	0,332	24,85	0,231	<b>25,82</b>	<b>0,162</b>	29,50	0,197
I2	—	—	—	—	<b>33,91</b>	<b>0,372</b>	—	—
L2	35,81	0,461	26,34	0,265	<b>25,21</b>	<b>0,253</b>	41,12	0,413
L3	—	—	—	—	<b>36,18</b>	<b>0,283</b>	—	—
N1	33,05	0,298	<b>26,82</b>	<b>0,120</b>	<b>27,12</b>	<b>0,156</b>	31,11	0,314
N2	39,29	0,152	<b>39,92</b>	<b>0,132</b>	<b>40,73</b>	<b>0,134</b>	41,27	0,147
M1	25,06	0,269	<b>22,39</b>	<b>0,108</b>	<b>21,75</b>	<b>0,119</b>	23,93	0,199
M2	31,88	0,190	<b>29,83</b>	<b>0,133</b>	<b>31,20</b>	<b>0,118</b>	31,81	0,149

\* En el cas d'obtenir-se un índex de polidispersitat superior a 0,250 el valor del diàmetre de gota com a Z-Average no es pot considerar fiable.

\*\* En negreta es troben marcats els valors més baixos de diàmetre de gota i de polidispersió obtinguts per DLS per a cada composició.

\*\*\* En relació a les composicions I2 i L3, només es van caracteritzar les mescles preparades pel mètode E ja que amb els mètodes B, D i G es va observar la formació de cremat en transcórrer 24 hores.

Els diàmetres de gota més petits i els índex de polidispersitat més baixos per a cada composició es van obtenir amb els mètodes E i D que consisteixen en l'addició successiva de petites quantitats d'aigua a la mescla oli/tensioactiu a 70°C i a 50°C respectivament. En ambdós mètodes la formació de les gotes de nano-emulsió s'esdevé a partir de les transicions de fases que tenen lloc durant el procés d'emulsificació. En els estudis de Sadurní et al. (2005) i Solè et al. (2006) l'obtenció de nano-emulsions O/W amb una mida de gota molt petita i uniforme es va relacionar amb la formació d'estructures de cristall líquid laminar i de cristall líquid cúbic respectivament durant el procés d'emulsificació. Per tant, els canvis en la curvatura natural del tensioactiu que tindrien lloc durant l'emulsificació jugarien un paper clau en la formació de les nano-emulsions. En els corresponents diagrames de fases de les composicions estudiades (apartat 4.1.2), es va observar la formació de regions de cristall líquid per a baixes

concentracions d'aigua. L'obtenció de nano-emulsions per addicions successives d'aigua permetria la formació d'aquest tipus d'estructures durant l'emulsificació i això explicaria la petita mida de gota i la baixa polidispersitat de les composicions preparades per aquest mètode. Cal destacar que durant l'elaboració dels diagrames de fases, tot i que l'observació de les composicions es va realitzar a 25°C, les mescles es van escalfar per a facilitar-ne l'homogeneïtzació. Per contra, quan les composicions es preparen per pesada directa incorporant l'aigua en una única addició (mètodes B i G), no es produeix una transició de fases progressiva durant el procés i per tant no es formarien aquestes estructures de cristall líquid. De fet, la utilització dels mètodes B i G per a la preparació de les nano-emulsions, suposa un increment del diàmetre de gota per a la gran majoria de les composicions estudiades.

Pel mètode G, on les nano-emulsions s'obtidrien per fenòmens de trencament i col·lisió de les gotes en aplicar una força de cisalla i una elevada velocitat d'agitació, únicament s'ha aconseguit la formació de sistemes de baixa polidispersitat (índex de polidispersitat < 0,200) amb les composicions J3, N2, M1 i M2. Si es comparen els valors de mida de gota i dels índex de polidispersitat d'aquestes mateixes mescles obtinguts amb els mètodes E i G, s'observa que en aplicar-se el mètode E les nano-emulsions presenten una mida de gota lleugerament més petita i una polidispersió relativament més baixa que quan es preparen pel mètode G.

Finalment amb el mètode B (pesada directa a 50°C), les úniques composicions que han presentat una polidispersitat inferior a 0,200 han sigut les mescles N2 i M2. Per a la resta de composicions es van obtenir uns valors de polidispersió compresos entre 0,236 i 0,461.

D'acord amb els resultats obtinguts, com a mètode d'elecció per la preparació de les nano-emulsions es va seleccionar el mètode E (addicions successives a 70°C) ja que amb aquest mètode d'emulsificació es van obtenir els valors més petits de diàmetre de gota i uns índex de polidispersitat més baixos per la majoria de les composicions estudiades.

Amb el mètode E pràcticament totes les composicions corresponen a sistemes monodipersos (índex de polidispersitat < 0,200) tret de les que contenen Lutrol F127 com a co-tensioactiu (mescles F1, H1, I2, L2 i L3). En aquests casos l'índex de polidispersitat va ser superior a 0,250 i per tant les determinacions de Z-Average no es poden considerar com a fiables. Per tant, no es van prosseguir els estudis amb aquestes formulacions.



Les composicions dels sistemes aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p) Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p) Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p) Miglyol 812 únicament es van preparar pels mètodes A i E i no consten a les taules anteriors. En aquests sistemes es van seleccionar mescles amb un 90 o un 95% en pes d'aigua i unes relacions O/T de 30/70 i 40/60. En el sistema amb Cremophor EL i Epikuron 170 s'han estudiat també les relacions O/T, 50/50 i 60/40 (veure taula VI).

**Taula VI:** Composició de les nano-emulsions seleccionades de sistemes aigua/tensioactiu: co-tensioactiu/oli

Sistema aigua/ tensioactiu no iònic/ co-tensioactiu/oli	Nano-emulsió	Composició de les nano-emulsions	
		Aigua (%)	Relació O/T
Aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812	O3	90	30/70
	O4	90	40/60
Aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	P3	95	30/70
	P4	95	40/60
Aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	Q3	95	30/70
	Q4	95	40/60
	Q5	95	50/50
	Q6	95	60/40

De la mateixa manera com s'havia procedit en els estudis anteriors, una vegada preparades les composicions es van deixar reposar durant 24 h en un bany termostatat a 25°C. Transcorregut aquest temps, les mescles es van valorar macroscòpicament. A la taula VII es descriu l'aspecte que presenten les formulacions preparades per pesada directa a 25°C (mètode A) i per addicions successives a 70°C (mètode E). A la temperatura de 70°C, en els sistemes que contenen Epikuron 170 com a co-tensioactiu, no es va produir enfosquiment de la lecitina (reacció de Maillard).

**Taula VII:** Aspecte macroscòpic a 25°C de diverses mescles preparades per diferents mètodes d'emulsificació

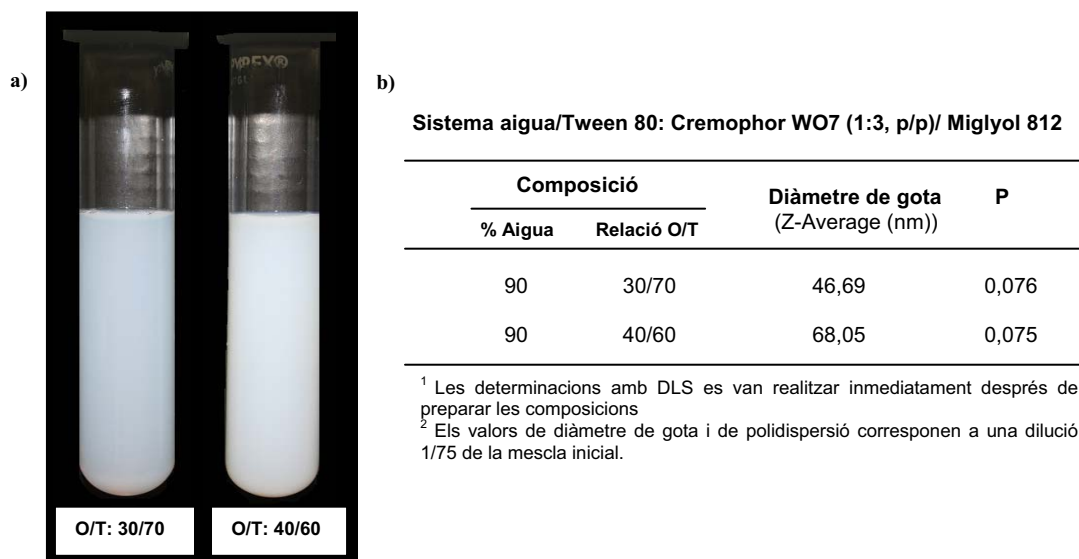
Nano-emulsió	Mètode A	Mètode E
O3	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, translúcida, blavosa. Formació de cremat.
O4	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, translúcida-tèrbola, blanc-blavosa. Presència de cremat
P3	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, transparent-translúcida, lleugerament blavosa i groguenca
P4	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, transparent-translúcida, blavosa
Q3	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, transparent-translúcida, lleugerament groguenca
Q4	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, transparent-translúcida, lleugerament blavosa
Q5	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, translúcida, blavosa
Q6	Sistema multifàsic, fluid, tèrbol i blanquinós	Dispersió líquida, translúcida, blau-blanquinosa

Quan les mecles es preparen pel mètode A (pesada directa a 25°C), s'obtenen composicions líquides, multifàsiques, tèrboles i blanquinoses per a totes les relacions O/T i concentracions d'aigua estudiades mentre que pel mètode E (addicions successives a 70°C) es formen dispersions fluides, transparents o translúcides, blavoses i/o lleugerament groguenques (sistemes amb Epikuron 170).

D'acord amb els resultats obtinguts, les composicions corresponen a nano-emulsions ja que s'han observat variacions importants en l'aspecte macroscòpic de les mecles en ser preparades per mètodes diferents, indicant que el procés d'emulsificació juga un paper clau en la formació d'aquestes dispersions.

Les composicions preparades pel mètode E es van caracteritzar per DLS a 25°C. A continuació es mostren els resultats obtinguts:

La figura 4.12 correspon a les composicions del sistema aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812. Les determinacions per DLS del diàmetre de gota i de l'índex de polidispersitat es van realitzar just després de preparar les mecles ja que a les 24 hores es començaven a evidenciar signes d'instabilitat (aparició d'un lleuger cremat fàcilment dispersable). Per tal d'evitar fenòmens de múltiple "Light Scattering" es va dur a terme una dilució 1/75 de la nano-emulsió inicial.

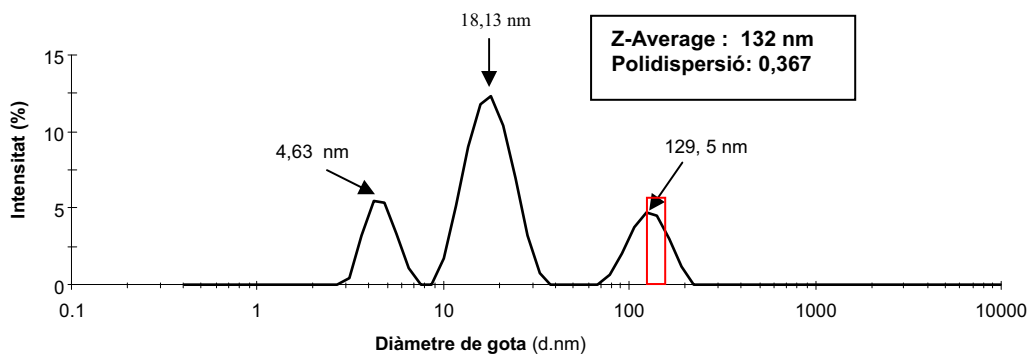


**Fig. 4.12:** a) Aspecte macroscòpic de les composicions del sistema aigua/ Tween 80: Cremophor WO7 (1:3, p/p)/ Miglyol 812 preparades pel mètode E. b) Diàmetre de gota com a Z-Average i polidispersió de les composicions determinades a 25°C per DLS.

Com es pot observar a la figura 4.12, la transparència de les mescles disminueix en augmentar la relació O/T, obtenint-se una dispersió líquida translúcida i blavosa amb la relació O/T de 30/70 mentre que amb la relació O/T 40/60 la mescla és translúcida-tèrbola i amb una coloració blanc-blavosa. Aquests canvis en l'aspecte visual de les composicions s'atribueixen a l'increment del diàmetre de gota en augmentar la concentració d'oli/tensioactiu (Sadurní, 2005, Liu, 2006; Solè, 2006). De fet, com es podria esperar, la nano-emulsió amb una mida de gota més petita correspon a la composició preparada amb una concentració O/T més baixa (composició O3, relació O/T de 30/70) obtenint-se un diàmetre de gota de 46,69 nm.

Amb ambdues formulacions es van obtenir nano-emulsions de baixa polidispersitat i amb un diàmetre de gota inferior als 100 nm. Malgrat els resultats obtinguts, les composicions no es van utilitzar en estudis posteriors ja que no presentaven una bona estabilitat cinètica i enfront temperatures elevades, com les aplicades per a la preparació de nanopartícules de poliuretà i poliurea (veure capítol nanopartícules), experimentaven una separació en fases.

En els sistemes amb Epikuron 170 com a co-tensioactiu es van obtenir uns valors de polidispersió superiors a 0,350, (per algunes composicions fins i tot propers a la unitat), indicant que les mescles eren polidisperses, i les determinacions de la mida de gota com a Z-Average poc fiables. En la majoria de les nano-emulsions estudiades es va observar fins i tot l'existència de diferents poblacions de gotes detectades per DLS dins la mateixa formulació (a títol representatiu veure Fig. 4.13).



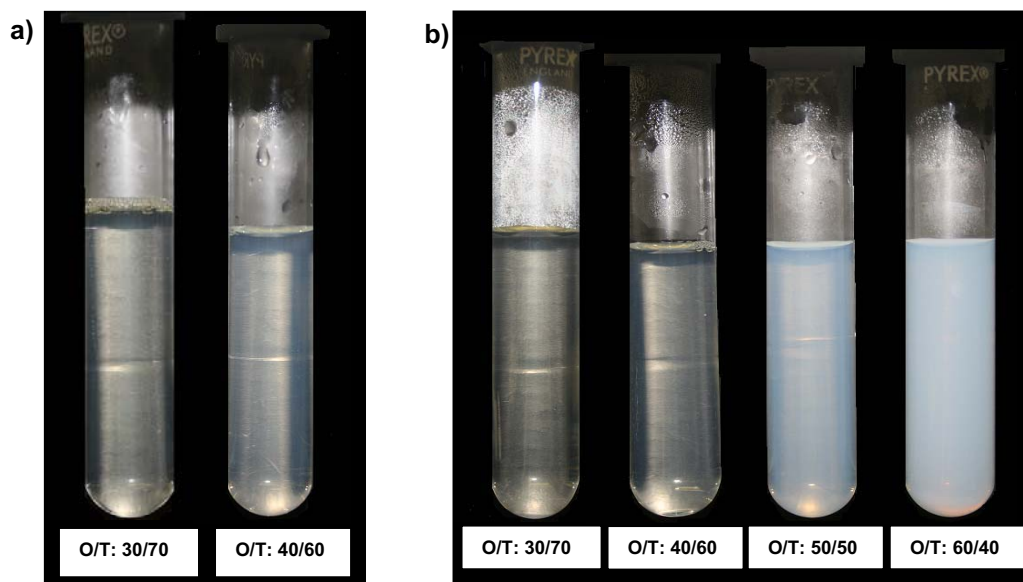
**Fig. 4.13:** Perfil de distribució de la mida de gota per intensitat obtingut per DLS de la composició amb un 95% d'aigua i una relació O/T: 50/ 50 del sistema aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

Amb la finalitat de disminuir l'índex de polidispersitat i aconseguir l'uniformitat de la mida de gota, les nano-emulsions dels sistemes amb Epikuron 170 es van preparar combinant un mètode d'emulsificació de baixa energia (E) amb un mètode d'emulsificació d'alta energia que consisteix en sotmetre les composicions a un bany d'ultrasons durant 1 hora.

La combinació d'un mètode de baixa energia amb un mètode d'alta energia per a la preparació de nano-emulsions amb lecitina (Epikuron) ja s'havia estudiat en treballs anteriors (Sadurní, tesi doctoral, 2005). En aquests estudis es va utilitzar un homogeneïtzador d'alta pressió com a mètode d'alta energia i es va aconseguir millorar notablement la polidispersitat del sistema.

Per a la present tesi doctoral es van seleccionar els ultrasons ja que a diferència dels homogeneïtzadors d'alta pressió no requereixen la preparació de grans quantitats de formulació (Antonietti, 2002; Asua, 2002; Landfester, 2004; Ouzineb, 2006).

La figura 4.14 correspon a diferents nano-emulsions dels sistemes aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 després de ser sotmeses durant un temps d'1 hora a ultrasons.



**Fig. 4.14:** Aspecte macroscòpic de nano-emulsions preparades per la combinació d'un mètode d'emulsificació de baixa energia (mètode E) amb un mètode d'emulsificació d'alta energia (ultrasons). a) Composicions del sistema aigua/Tween 80:Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 i b) composicions del sistema aigua/Cremophor EL:Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

A les imatges es pot observar com es va modificant l'aspecte de les nano-emulsions per als dos sistemes estudiats des de composicions completament transparents pràcticament

incolores fins a composicions translúcides i blavoses a mesura que augmenta la concentració oli/tensioactiu.

La utilització d'ultrasons va suposar un increment de la transparència del sistema, ja que les nano-emulsions prèvies preparades per un procés de condensació (mètode E) presentaven una lleugera terbolesa. Aquest augment de la transparència indicaria una disminució de la mida de gota de les nano-emulsions. Durant l'aplicació d'ultrasons s'esdevenen diferents cicles de compressió-cavitació que provoquen un trencament progressiu de les gotes que constitueixen la fase interna i en conseqüència, el diàmetre d'aquestes es redueix.

Les composicions un cop preparades es van caracteritzar per DLS a 25°C. A la taula VIII es mostren els resultats obtinguts.

**Taula VIII:** Diàmetre de gota i polidispersió de nano-emulsions amb un 95% en pes d'aigua i una relació O/T creixent de sistemes amb Epikuron 170 com a co-tensioactiu determinats per DLS a 25°C. Les nano-emulsions s'han preparat pel mètode E seguit de l'aplicació d'ultrasons.

Aigua/ Tween 80: Epikuron 170 (3:1, p/p) Miglyol 812				Aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p) Miglyol 812			
Composició		Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Composició		Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P
% Aigua	Relació O/T			% Aigua	Relació O/T		
95	30/70	18,94	0,263	95	30/70	20,92	0,276
95	40/60	31,13	0,281	95	40/60	33,42	0,232
				95	50/50	48,46	0,222
				95	60/40	64,58	0,209

En el sistema aigua/ Cremophor EL: Epikuron 170 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 es va aconseguir la formació de nano-emulsions amb una elevada concentració en pes de component oliós i una baixa concentració de tensioactiu (relacions 50/50 i 60/40).

Com es pot observar a la taula VIII, el diàmetre de gota de les nano-emulsions s'incrementa amb la relació O/T. En tots els casos estudiats les nano-emulsions van presentar un diàmetre de gota inferior als 100 nm i una polidispersió inferior a 0,300. La nano-emulsió amb una mida de gota més petita (18,94 nm) correspon a la composició 30/70 del sistema amb Tween 80 com a tensioactiu i la que presenta una mida més gran (64,58 nm) a la relació O/T: 60/40 del sistema amb Cremophor EL. Malgrat que es va aconseguir millorar notablement la polidispersitat en relació a les composicions preparades únicament pel mètode E, els valors obtinguts indiquen que es tracta de

sistemes polidispersos (tots els valors de polidispersió van ser  $> 0,200$ ) i per tant no es van continuar els estudis amb aquestes formulacions.

De tots els sistemes estudiats, es van considerar apropiats per a la posterior preparació de nanopartícules aquells amb els que s'havien obtingut nano-emulsions de baixa polidispersitat (índex de polidispersitat  $< 0,200$ ) amb un diàmetre de partícula inferior als 100 nm i que presentaven una estabilitat cinètica adequada (absència de fenòmens d'inestabilitat en un període mínim de 48 hores observats a ull nu). Així, es van descartar els sistemes amb Lutrol F127 i Epikuron 170 com a co-tensioactiu, ja que s'obtenien polidispersions superiors a 0,200, i els que presentaven Cremophor WO7, com a conseqüència de la seva baixa estabilitat cinètica. A la taula IX es detallen els sistemes i les composicions seleccionades i els paràmetres morfomètrics determinats a 25°C per DLS. Les nano-emulsions es van preparar pel mètode E (addicions successives d'aigua a 70°C a la mescla oli/ tensioactiu prèviament homogeneïtzada i agitació amb vòrtex).

**Taula IX: Composició, diàmetre de gota i polidispersió determinats a 25°C per DLS de diferents nano-emulsions preparades pel mètode E.**

Sistema	NE	Composició		Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P
		% Aigua	Relació O/T		
Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812	E1	90	10/90	13,76	0,154
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	F'1	90	10/90	23,63	0,186
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	H'1	90	10/90	16,78	0,176
Aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812	J1	90	10/90	14,71	0,109
	J2	90	20/80	18,87	0,138
	J3	90	30/70	25,82	0,162
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	N1	90	10/90	27,16	0,156
	N2	90	20/80	40,73	0,134
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	M1	90	10/90	21,75	0,119
	M2	90	20/80	31,20	0,118

Les determinacions per DLS es van dur a terme sense diluir les composicions després de deixar reposar les mescles 24h en un bany termostatat a 25°C. Les composicions J1 i J2 del sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812, després de comprovar que corresponien a nano-emulsions, es van preparar directament pel mètode E, ja que per aquest mètode d'emulsificació es van obtenir composicions amb una baixa polidispersitat per a la major part de les mescles estudiades (veure taula V). Per a aquestes composicions es van obtenir uns valors de diàmetre de gota de 14,71 nm i 18, 87 nm respectivament i una

polidispersió inferior a 0,140. La nano-emulsió amb una mida de gota més petita correspon a la mescla E1 (13,76 nm) i la que presenta una diàmetre més gran a la composició N2 (40,73 nm).

#### **4.1.3.1. Influència de variables de composició en la mida de gota de les nano-emulsions**

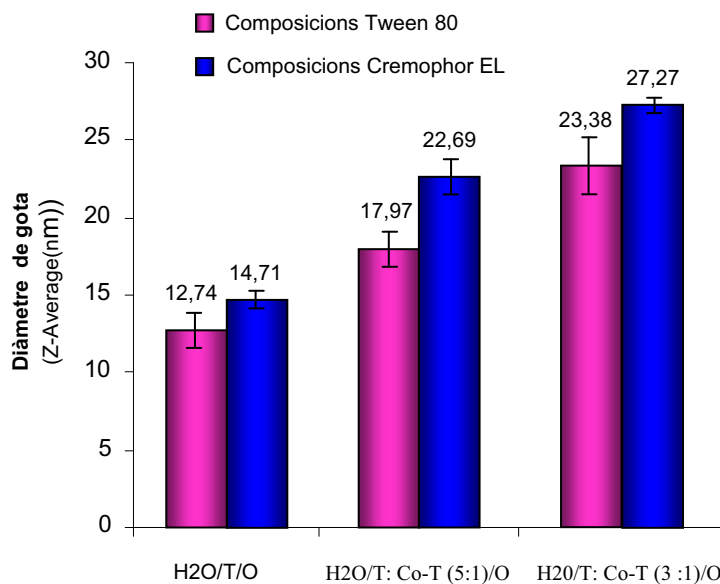
Un cop seleccionats els sistemes aigua/ tensioactiu no iònic/ Miglyol 812 i el mètode d'emulsificació, es va estudiar la influència de les variables de composició en la mida de gota de les nano-emulsions.

Es va estudiar la influència de la relació tensioactiu/ co-tensioactiu, de la concentració d'aigua i de la relació oli/tensioactiu.

#### ***Influència de la naturalesa del tensioactiu i concentració de co-tensioactiu en la preparació de nano-emulsions***

Per a dur a terme aquests estudis, es van preparar nano-emulsions amb una concentració fixa d'aigua (90%) i una relació O/T:10/90 en sistemes del tipus aigua/ tensioactiu/ Miglyol 812 i aigua/ tensioactiu: co-tensioactiu / Miglyol 812, emprant com a tensioactiu Tween 80 o Cremophor EL i com a co-tensioactiu Lutrol F68.

Les mescles es van elaborar pel mètode descrit anteriorment com a E amb la finalitat de garantir un petita mida de gota i un baix índex de polidispersitat. Una vegada preparades les mostres es van deixar temperar en un bany termostatat a 25°C i immediatament després es van caracteritzar per DLS a 25°C (veure Fig.4.15). Es van preparar triplicats per a cadascuna de les composicions. Els valors dels índex de polidispersitat per a cadascuna de les dispersions van ser inferiors a 0,200.



**Fig. 4.15:** Diàmetre (nm) de nano-emulsions amb Tween o Cremophor com a tensioactiu i Lutrol F68 com a co-tensioactiu amb un 90% d'aigua i una relació O/T de 10/ 90.

D'acord amb la figura 4.15, les nano-emulsions amb un diàmetre de gota més petit s'obtenen en els sistemes que contenen Tween 80 com a tensioactiu. Malgrat observar-se aquesta tendència les dispersions corresponents al sistema ternari (aigua /tensioactiu/ oli) presenten una mida de gota relativament similar (14,74 nm per a la composició amb Cremophor EL i 12,74 nm per a la composició amb Tween 80). Cal destacar que el Cremophor EL presenta una estructura química relativament més gran que el Tween 80 amb un pes molecular de 2560 g/mol enfront els 1310 g/mol corresponents al Tween 80 (Scott, 2005). Les diferències en el diàmetre de gota entre les nano-emulsions amb Tween i les nano-emulsions amb Cremophor EL semblen accentuar-se quan s'incorpora el co-tensioactiu a la formulació.

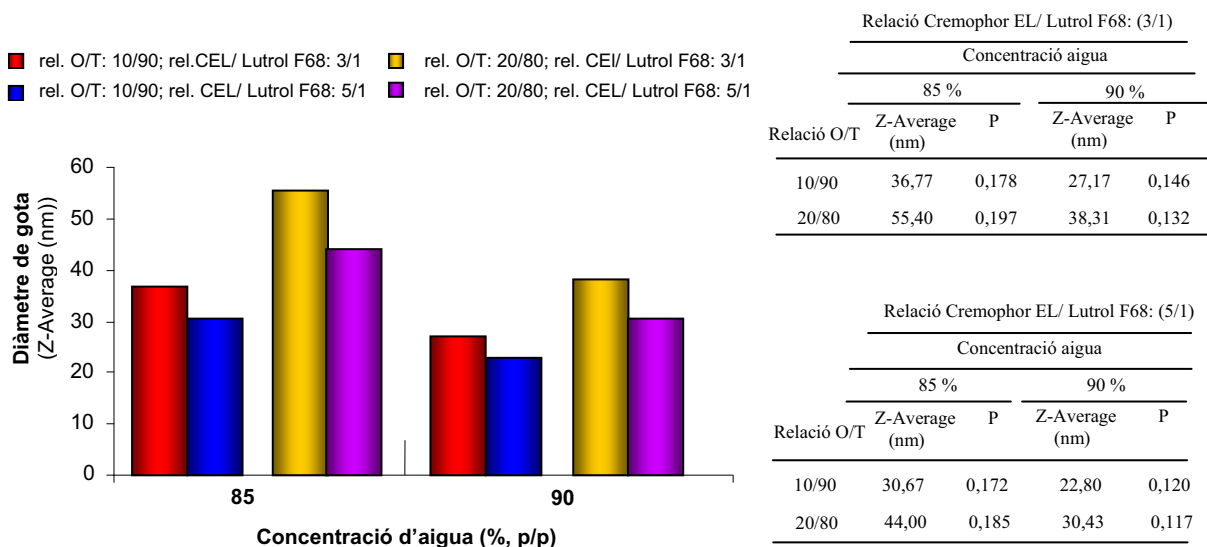
La presència de co-tensioactiu polimèric (Lutrol F68) en les composicions estudiades actua incrementant la mida de les gotes de les nano-emulsions. En totes les formulacions es va mantenir constant la concentració en pes d'aigua i de Miglyol 812 i únicament es va variar la proporció en pes entre tensioactiu i co-tensioactiu. Per a les composicions que contenen una concentració de co-tensioactiu més elevada (relació tensioactiu: co-tensioactiu 3:1) es van obtenir uns valors de diàmetre de 23,38 nm (nano-emulsions amb Tween 80) i 27,27 nm (nano-emulsions amb Cremophor EL). Tenint en compte que el Lutrol F68 presenta una estructura molecular molt més voluminosa que la del Cremophor EL i el Tween 80 (veure capítol 3.1.2.1), les variacions en el diàmetre que tenen lloc quan s'incorpora Lutrol F68 en les composicions es podrien atribuir a la



disposició que adopta el tensioactiu polimèric a la interfície oli/aigua de les gotes. L'elevat HLB del Lutrol F68 (HLB:29) en relació al Tween 80 (HLB:15) i al Cremophor EL (HLB:12-14) suggereix una predisposició del Lutrol a orientar-se majoritàriament cap a la fase externa aquosa mentre que el Tween o el Cremophor podrien quedar més internalitzats. Amb aquesta disposició interfacial, els múltiples grups d'òxid d'etilè presents en els dominis hidròfils de les molècules del tensioactiu Lutrol F68 es trobarien fortament hidratats i en conseqüència el diàmetre de les gotes determinat per DLS a 25°C podria incrementar-se (Noolandi, 1996; Zana, 1997; Dwyer, 2005).

***Influència de la concentració de co-tensioactiu i aigua en la preparació de nano-emulsions***

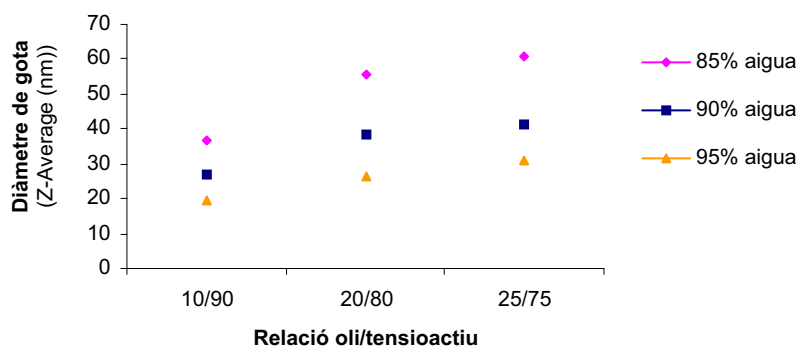
Amb la finalitat d'estudiar amb més detall la influència del co-tensioactiu polimèric, es van preparar composicions amb un 85 i un 90% en pes d'aigua i una relació O/T de 10/90 i de 20/80 dels sistemes aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812. Ambdós sistemes es diferencien únicament en la proporció tensioactiu: co-tensioactiu. Les nano-emulsions es van preparar a 70°C per addicions successives d'aigua sobre la mescla oli/tensioactiu prèviament homogeneïtzada (mètode d'emulsificació E). Les formulacions es van caracteritzar a 25°C per DLS immediatament després de la seva elaboració. Els resultats corresponents es mostren a la figura 4.16. Els valors de polidispersió per a totes les composicions van ser inferiors a 0,200 (sistemes de baixa polidispersitat).



**Fig. 4.16:** Diàmetre de les gotes en funció de la concentració d'aigua i de la relació O/T i índex de polidispersitat de nano-emulsions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68/ Miglyol 812.

Quan es comparen composicions amb la mateixa relació oli/ tensioactiu i concentració en pes d'aigua s'observa, com ja s'havia explicat a l'apartat anterior, que la mida de gota de les nano-emulsions és més gran com més elevada és la proporció de Lutrol en relació al Cremophor EL. Així, el diàmetre de les gotes de les composicions amb una relació en pes Cremophor EL/ Lutrol F68 de 3/1 va ser per a totes les concentracions d'aigua i totes les relacions O/T estudiades superior al de les nano-emulsions amb la relació en pes Cremophor/ Lutrol F68 de 5/1. Com ja s'ha esmentat a l'apartat anterior, l'increment de diàmetre observat en augmentar la concentració de Lutrol es podria atribuir a la situació del tensioactiu polimèric (Lutrol F68) a la interfície de les gotes.

A la Fig 4.16 també es pot observar que el diàmetre de gota disminueix en augmentar la concentració d'aigua. Per a estudiar amb més deteniment la influència de la concentració d'aigua en la formació de nano-emulsions es van seleccionar composicions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 amb diferents relacions oli/ tensioactiu i les següents concentracions en pes d'aigua: 85, 90 i 95%. Les nano-emulsions es van preparar pel mètode descrit a l'apartat 4.1.3 com a E (addicions successives a 70°C del component aquós a la mescla O/T). La caracterització es va dur a terme per DLS a 25°C. Els resultats corresponents al diàmetre de gota determinat com a Z-Average es mostren a la figura 4.17.



**Fig. 4.17:** Diàmetre de les gotes com a Z-Average en funció de la concentració d'aigua i de la relació O/T de nano-emulsions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

D'acord amb els resultats obtinguts, en augmentar la concentració d'aigua, el diàmetre de gota de les nano-emulsions disminueix per a totes les relacions O/T estudiades. De fet, per a les composicions amb un 95% en pes d'aigua la mida de gota de la fase dispersa es redueix pràcticament a la meitat en relació als valors de diàmetre de les composicions

constituïdes per un 85% d'aigua. Aquesta disminució de la mida es produeix conjuntament amb una disminució de la polidispersitat del sistema (veure taula X). Per a les composicions preparades amb un 85% en pes d'aigua s'obté una polidispersió propera a 0,200 mentre que per a les mescles amb un 95% d'aigua el valor de la polidispersió tendeix cap a 0,100. En totes les composicions estudiades es va obtenir una distribució monomodal del diàmetre de partícula i uns valors de polidispersió  $< 0,200$ , indicatius de la baixa polidispersitat dels sistemes. Per tant, no es va considerar l'aparició de múltiple "Light Scattering" en les determinacions realitzades.

**Taula X:** Diàmetre de gota i índex de polidispersitat determinat a 25°C per DLS de nano-emulsions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 preparades amb una concentració creixent d'aigua (85%, 90%, 95%).

Relació O/T	Concentració d'aigua (%, p/p)	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	p
10/90	85	36,02	0,176
	90	27,17	0,146
	95	19,68	0,097
20/80	85	55,40	0,197
	90	38,31	0,132
	95	25,26	0,106
25/75	85	61,01	0,186
	90	41,26	0,171
	95	31,16	0,136

La incorporació d'una major quantitat d'aigua en la mescla implica una disminució tant de la concentració de tensioactiu com de la concentració d'oli, per tant es formarien menys gotes de nano-emulsió O/W. La disminució del diàmetre de gota s'explicaria per la reducció de la concentració de component oliós acompanyada d'una major formació de micel·les (malgrat que disminueixi la concentració de tensioactiu, aquesta continua essent superior a la cmc). L'increment de la concentració d'aigua afavoriria el desplaçament de les molècules de tensioactiu situades a la interfície de les gotes cap a la fase externa (Alexandritis, 1995; Rapoport, 1999; Li, 2008) amb la consegüent formació d'estructures micel·lars. De fet, el diàmetre de gota obtingut per a la composició amb un 95% en pes d'aigua i una relació O/T 10/90 correspon a la mida de les micel·les d'aquest sistema (19,96 nm).

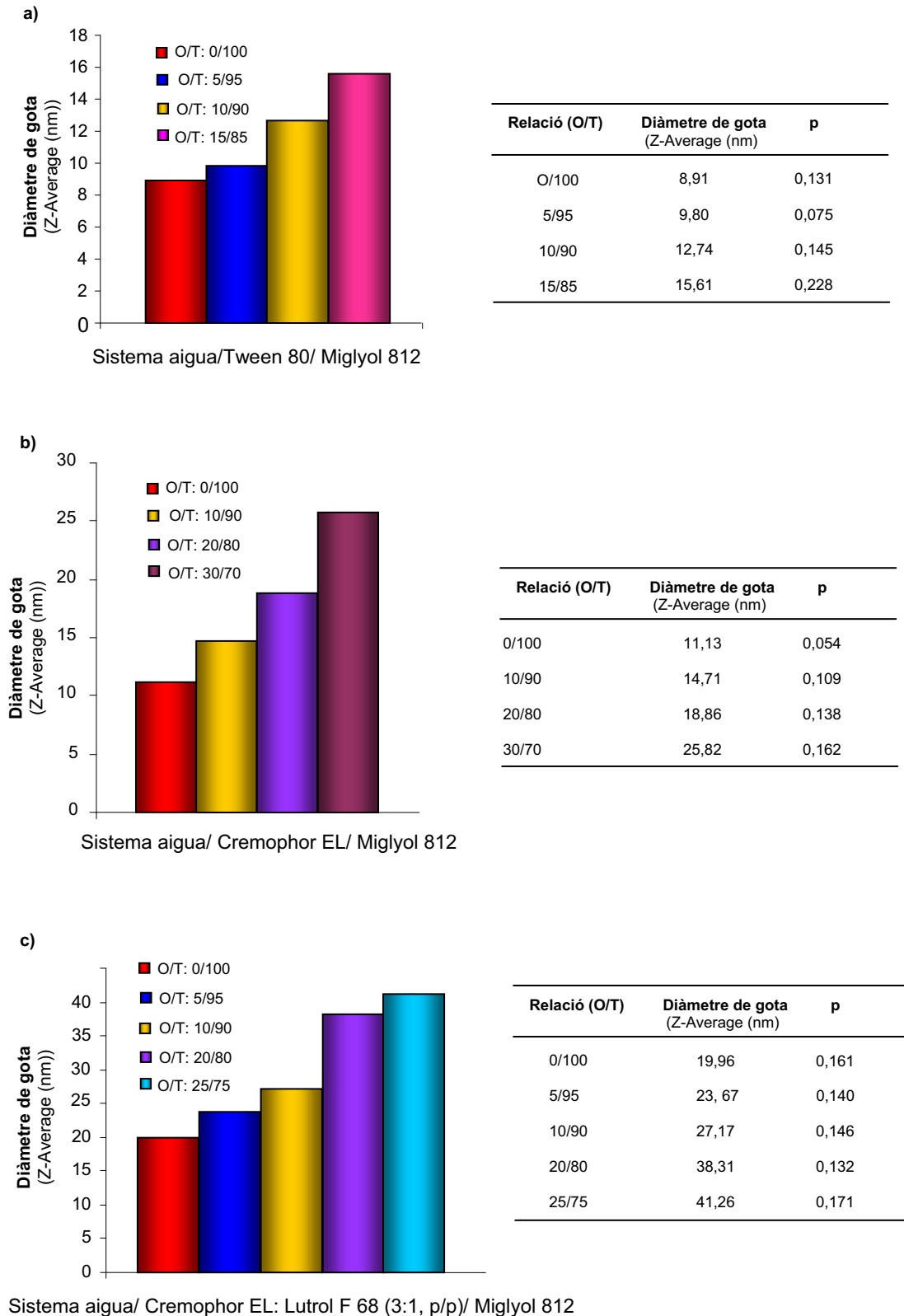
Tenint en compte els resultats obtinguts, la dilució influiria en el diàmetre de gota de les nano-emulsions que contenen Lutrol F68, per tant la caracterització de les composicions per DLS s'ha de dur a terme sense diluir les nano-emulsions.

Aquest efecte no es va observar en aquelles dispersions constituïdes únicament amb Tween 80 i amb Cremophor EL com a tensioactiu, on l'augment de la concentració d'aigua no va comportar modificacions en la mida de les gotes.

En les composicions estudiades també s'observa un augment del diàmetre de gota quan s'incrementa la relació O/T. A continuació s'explica amb més detall la influència de la concentració de tensioactiu i oli en la formació de nano-emulsions O/W.

### *Influència de la concentració O/T*

S'ha estudiat com es modifica el diàmetre de gota en funció de la concentració O/T en sistemes aigua/ tensioactiu/ oli i aigua/ tensioactiu/ co-tensioactiu/ oli dels quals es coneixia el comportament fàsic a 25°C. Per a realitzar aquests estudis es van seleccionar composicions corresponents a solucions micel·lars i nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua. Les formulacions es van preparar novament a 70°C per addicions successives del component aquós sobre la mescla oli/tensioactiu homogeneïtzant amb vòrtex. Una vegada preparades, les composicions es van deixar reposar a 25°C en un bany termostatat i es va procedir a la seva caracterització per DLS. A la figura 4.18 es mostren els resultats corresponents als sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.



**Fig. 4.17:** Diàmetre de gota en funció de la relació oli/tensioactiu i índex de polidispersitat per a composicions amb un 90% en pes d'aigua del sistema a: aigua/ Tween 80/ Miglyol 812; b: aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 i c: aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812

Com es pot observar a la Fig. 4.17, el diàmetre de gota augmenta amb la relació oli/tensioactiu per a tots els sistemes estudiats. Aquests resultats concorden amb els estudis desenvolupats per diferents autors amb composicions similars (Sadurní, 2005; Liu, 2006; Solè, 2006). Així, l'increment de la concentració de tensioactiu conjuntament amb una reducció de la concentració de component oliós, suposaria la formació d'un major nombre de gotes i de mida més petita. Per contra, la disminució de la concentració de tensioactiu i l'augment de la concentració d'oli comportaria l'obtenció de menys gotes i de mida més gran. Si es comparen les mateixes relacions O/T, les mesclades amb un diàmetre més petit (comprés entre 8,91 nm i 15,61 nm) corresponen al sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 i les que presenten un diàmetre més gran al sistema aigua/Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 (mida de gota entre 19,96 i 41, 26 nm).

Pel que fa als índex de polidispersitat, es van obtenir uns valors de polidispersió inferiors a 0,200 per a totes les composicions excepte per a la relació O/T:15/85 del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 on la polidispersió va ser de 0,228. La polidispersitat del sistema tendeix a augmentar amb la relació oli/tensioactiu malgrat que en el sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 únicament s'observa un canvi important entre les relacions O/T de 20/80 i de 25/75 on la polidispersió augmenta de 0,132 a 0,171.

### ***Estudi dels efectes simultanis de les variables de composició en les propietats de les nano-emulsions O/W***

Després d'estudiar individualment la influència de les diferents variables de composició (concentració de co-tensioactiu, concentració d'aigua i concentració de tensioactiu i oli) en les propietats morfomètriques (diàmetre de gota i polidispersió) de les nano-emulsions, es va aplicar el disseny de superfície de resposta amb la finalitat d'observar les possibles interaccions entre els factors. Així, es va desenvolupar un disseny factorial 4\*3\*2 amb 3 variables independents corresponents a la concentració de tensioactiu (%), concentració de co-tensioactiu (%) i tipus de tensioactiu, per tal de poder estudiar les composicions amb Tween 80 i Cremophor EL conjuntament i un disseny factorial central compost amb 3 variables de composició per a mesclades del sistema aigua/Cremophor EL: Lutrol F68/ Miglyol 812. Com a variables resposta (variables dependents) es van seleccionar el diàmetre de gota de les nano-emulsions i l'índex de

polidispersitat. Les determinacions d'ambdós paràmetres es van realitzar per DLS a 25°C. Totes les composicions es van preparar pel mateix mètode d'emulsificació (E, addicions successives d'aigua a 70°C) i es van caracteritzar immediatament després de la seva elaboració. L'anàlisi estadística dels resultats es va realitzar mitjançant el programa Statgraphics Centurion. A continuació es mostren els resultats obtinguts.

*Disseny experimental de nivell múltiple 4\*3\*2*

En els capítols anteriors (veure figures 4.15 i 4.17) es va observar que en incrementar la concentració en pes del co-tensioactiu (Lutrol F68) o del component oliós (l'augment de la concentració d'oli implica una disminució de la concentració de tensioactiu), augmentava la mida de gota de les composicions preparades amb Tween 80 o Cremophor EL com a tensioactiu. En aquests estudis, el component aquós s'ha mantingut constant a una concentració de 90% en pes. Per tal d'estudiar la influència del tipus de tensioactiu emprat i la seva interacció amb els factors de composició es va realitzar un disseny experimental de nivell múltiple. Com a variables independents es van seleccionar:

- Concentració de tensioactiu. Fa referència a la relació oli/tensioactiu expressada en % en pes de tensioactiu. Aquest factor es va estudiar a 4 nivells o concentracions diferents: 85%, 90%, 95% i 100%. No es van considerar concentracions de tensioactiu inferiors, ja que en el sistema amb Tween s'obtenen composicions entre tènues i opaques per a relacions O/T > 20/80, (veure sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812).
- Concentració de Lutrol F68. Correspon a la relació tensioactiu/co-tensioactiu expressada com a % en pes de co-tensioactiu. Es van considerar 3 concentracions diferents: 0 % (sistema sense Lutrol F68), 16,66% (relació tensioactiu/Lutrol F68: 5/1) i 25% (relació tensioactiu/Lutrol F68: 3/1).
- Tipus de tensioactiu (Tween 80 o Cremophor EL). Aquesta variable es va estudiar a 2 nivells diferents. Al tractar-se d'un factor de tipus categòric es va atribuir un valor de -1 per al Tween 80 i un valor d'1 per al Cremophor EL.

Un disseny factorial 4\*3\*2 comporta la realització de 24 experiments. A la taula XI es detallen les composicions de cadascun d'aquests experiments i els valors corresponents al diàmetre de gota i polidispersitat determinats per DLS a 25°C.

**Taula XI:** Disseny de nivell múltiple 4\*3\*2: valors de les variables de composició per a cada formulació i diàmetre de gota i índex de polidispersitat obtinguts per DLS a 25°C.

Nº	Concentració TA (% ,p/p)	Concentració Lutrol F68 (% ,p/p)	Tipus de TA*	Diàmetre de gota (Z-average (nm))	P
1	100,0	16,66	1,0	16,29	0,147
2	85,0	25,00	1,0	31,34	0,111
3	85,0	16,66	-1,0	21,52	0,202
4	85,0	16,66	1,0	24,68	0,117
5	90,0	25,00	-1,0	23,80	0,186
6	100,0	0,0	1,0	11,13	0,054
7	95,0	0,0	1,0	12,42	0,058
8	85,0	25,00	-1,0	30,80	0,221
9	100,0	25,00	1,0	19,96	0,161
10	95,0	16,66	-1,0	14,22	0,171
11	90,0	0,0	-1,0	12,74	0,145
12	95,0	25,00	-1,0	16,67	0,185
13	90,0	16,66	1,0	22,69	0,119
14	95,0	16,66	1,0	19,43	0,130
15	100,0	25,00	-1,0	15,13	0,231
16	100,0	0,0	-1,0	8,91	0,131
17	90,0	25,00	1,0	27,17	0,146
18	85,0	0,0	1,0	16,50	0,152
19	95,0	0,0	-1,0	9,80	0,075
20	95,0	25,00	1,0	23,67	0,140
21	100,0	16,66	-1,0	12,31	0,190
22	90,0	0,0	1,0	14,71	0,109
23	90,0	16,66	-1,0	17,97	0,176
24	85,0	0,0	-1,0	15,61	0,228

\* EL valor -1 correspon al tensioactiu Tween 80 i el valor 1 al Cremophor EL.

\*\* Les composicions es van preparar amb una concentració fixa d'aigua del 90% en pes.

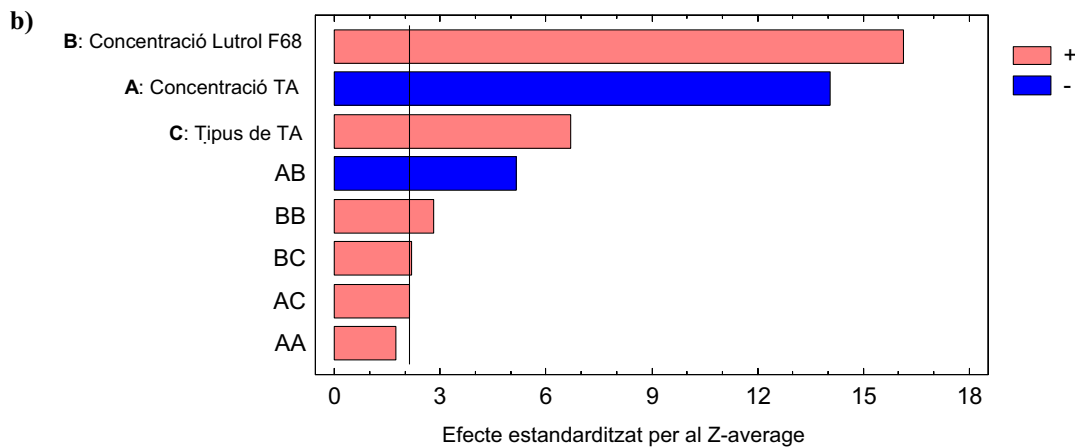
Per a determinar la influència en el diàmetre de gota de les variables seleccionades i les possibles interaccions entre factors es va dur a terme una anàlisi de la variància (ANOVA). Els efectes estandarditzats (efecte estimat dividit entre l'error estàndard) de les variables individuals i les combinacions binàries en la mida de gota s'han representat gràficament mitjançant un diagrama de Pareto. A la figura 4.18 es mostren els resultats obtinguts per al disseny experimental descrit a la taula XI.



a)

	<i>Suma de Quadrats</i>	<i>Gl</i>	<i>Quadrat promig</i>	<i>Relació-F</i>	<i>Valor-p</i>
A:Concentració de TA	280,807	1	280,807	258,46	<b>0,0000</b>
B:Concentració Lutrol F68	470,022	1	470,022	432,62	<b>0,0000</b>
C:Tipus de TA	62,3601	1	62,3601	57,40	<b>0,0000</b>
AA	3,293	1	3,293	3,03	0,1022
AB	28,745	1	28,745	26,46	<b>0,0001</b>
AC	4,83607	1	4,83607	4,45	0,0521
BB	8,86074	1	8,86074	8,16	<b>0,0120</b>
BC	5,13163	1	5,13163	4,72	<b>0,0462</b>
Error total	16,2968	15	1,08645		
Total (experiments)	908,494	23			

$R^2=0,9821$ ;  $R^2(\text{ajustada})=0,9725$ ; error estàndard= 1,0423; error promig absolut= 0,6193



**Fig. 4.18:** Anàlisi de la variància per al Z-Average (a) i Diagrama de Pareto (b) corresponents al disseny de nivell múltiple  $4 \times 3 \times 2$  detallat a la taula XI.

En el diagrama de Pareto de la Fig 4.18 es mostra la influència en el diàmetre de gota de cadascuna de les variables estudiades i les seves possibles combinacions binàries en ordre decreixent de magnitud. La longitud de cadascuna de les barres del diagrama és proporcional a l'efecte estandarditzat. Tot factor o combinació de factors que s'estengui més enllà de la línia vertical presentarà una influència estadísticament significativa en el diàmetre de gota amb un nivell de confiança del 95%.

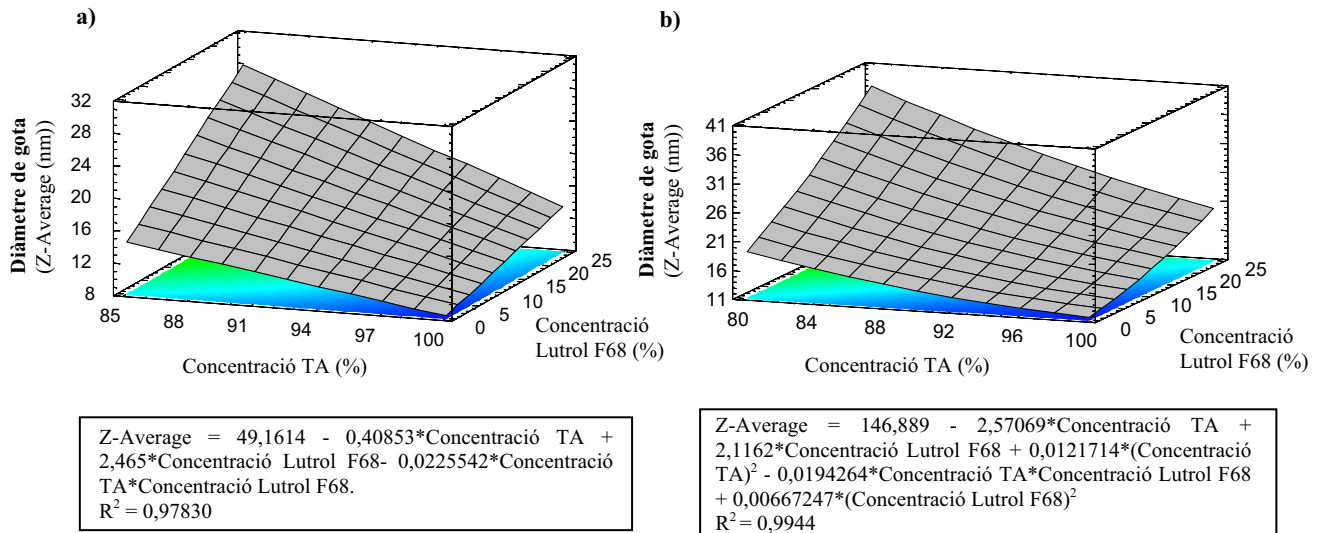
Per tant, per al disseny estudiat, es poden observar fins a 6 efectes estadísticament significatius en relació al diàmetre de gota de les composicions (Z-Average) amb un nivell de confiança del 95 % ( $p < 0,05$ ). Per a les variables concentració de Lutrol F68, concentració de TA i tipus de tensioactiu, es va obtenir una  $p < 0,01$ , indicant que aquests efectes són significatius amb un nivell de confiança del 99%. D'acord amb el valor

estadístic del coeficient de correlació al quadrat, el disseny factorial explicaria el 98,21% de la variabilitat obtinguda en la mida de gota.

En el diagrama de Pareto també s'observa que quan s'empra Cremophor EL com a tensioactiu o s'augmenta la concentració de Lutrol F68, es produeix un increment del diàmetre de gota (efecte positiu), tal i com ja s'havia observat al capítol "*Influència de la naturalesa del tensioactiu i concentració de co-tensioactiu en la preparació de nano-emulsions*". Per contra, un augment de la concentració de tensioactiu comportaria una disminució de la mida de les gotes (veure capítol "*Influència de la concentració O/T*"). L'efecte en el diàmetre de gota més important, no obstant, correspon a l'increment de la concentració de Lutrol F68.

Pel que fa a les interaccions entre variables, la concentració de Lutrol conjuntament amb el tipus de tensioactiu tenen un efecte positiu en el diàmetre de gota mentre que per al resultat de la interacció concentració de tensioactiu-concentració de Lutrol s'observa un efecte negatiu.

Degut a que la variable tipus de tensioactiu correspon a un factor categòric, per obtenir les gràfiques de superfície de resposta, es van realitzar dos dissenys factorials diferents per als sistemes amb Tween 80 i Cremophor EL. Per a les composicions amb Tween es va desenvolupar un disseny factorial 4\*3 i per a les mescles preparades amb Cremophor EL el disseny va ser 5\*3. Les variables independents en ambdós estudis van ser concentració de tensioactiu i concentració de Lutrol F68. Totes les mescles es van preparar a una concentració d'aigua de 90% en pes. Igual que per al disseny experimental de nivell múltiple explicat anteriorment, tant ambdós factors considerats individualment com la seva interacció presenten una influència estadísticament significativa en el diàmetre de gota amb un valor de  $p < 0,001$ . A la figura 4.19 es mostren els resultats obtinguts.



**Fig. 4.19:** Gràfiques de superfície de resposta corresponents al diàmetre de gota (nm) en funció de la concentració de tensioactiu i Lutrol F68 (%) per a sistemes amb a) Tween 80 i b) Cremophor EL com a component tensioactiu.

A les gràfiques de superfície de resposta de la figura 4.19 s'observa com es modifica el diàmetre de gota en funció de la concentració de tensioactiu i Lutrol F68. Així, per a concentracions elevades de tensioactiu (~100%) i en absència del co-tensioactiu Lutrol F68 s'obtenen els valors més baixos de diàmetre de gota. La major part d'aquestes composicions correspondrien a solucions micel·lars ja que la concentració d'oli és molt baixa (relacions O/T properes a 0/100). Quan s'incorpora el Lutrol F68, el diàmetre d'aquestes micel·les augmenta progressivament. Per altra banda, els diàmetres de gota més elevats s'obtenen per a les concentracions més baixes de tensioactiu emprades però en presència d'elevades proporcions de Lutrol F68. Reduir la concentració del co-tensioactiu afavoriria la formació de gotes de mida més petita. Aquestes formulacions són nano-emulsions O/W. Per tant, a mesura que disminueix la concentració de tensioactiu i augmenta la proporció de Lutrol F68 s'obtenen nano-emulsions O/W amb una mida de gota superior.

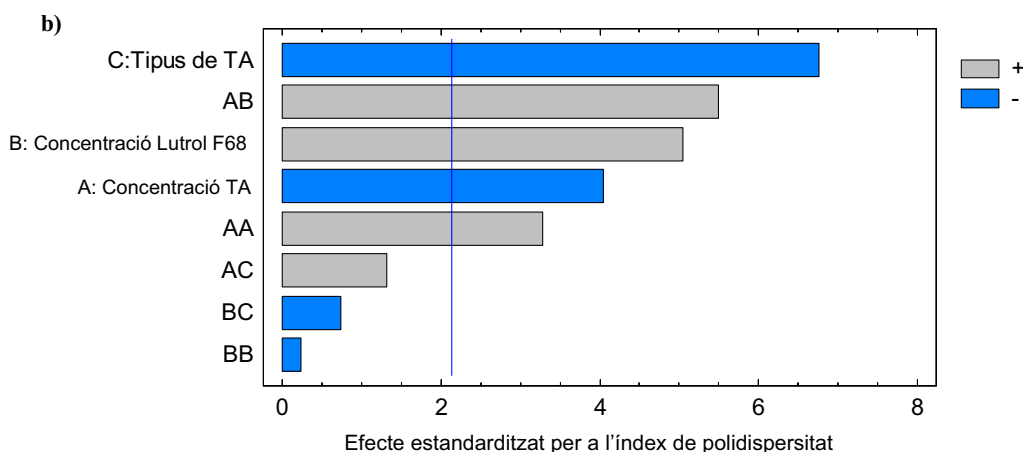
En ambdues gràfiques es pot observar una relació pràcticament lineal entre el diàmetre de gota i la concentració de tensioactiu així com també entre la mida de gota i la proporció de Lutrol F68. En els estudis de Pey et al. (2006) i Solè et al. (2006) on es va optimitzar la preparació de nano-emulsions obtingudes per mètodes de baixa energia a partir d'un disseny factorial ja es va observar l'existència d'una dependència lineal entre la relació oli/tensioactiu i el diàmetre de gota.

Pel que fa a la influència de les variables de composició i el tipus de tensioactiu emprat en l'índex de polidispersitat es van obtenir els següents resultats:

a)

	Suma de Quadrats	Gl	Quadrat Promig	Relació-F	Valor-p
A:Concentració de TA	0,00320526	1	0,00320526	8,92	<b>0,0092</b>
B:Concentració Lutrol F68	0,0115026	1	0,0115026	32,02	<b>0,0000</b>
C:Tipus de TA	0,0193704	1	0,0193704	53,92	<b>0,0000</b>
AA	0,00387604	1	0,00387604	10,79	<b>0,0050</b>
AB	0,0109126	1	0,0109126	30,38	<b>0,0001</b>
AC	0,000621075	1	0,000621075	1,73	0,2083
BB	0,0000160103	1	0,0000160103	0,04	0,8356
BC	0,000195093	1	0,000195093	0,54	0,4725
Error total	0,00538863	15	0,000359242		
Total (experiments)	0,0552116	23			

$R^2=0,9024$ ;  $R^2(\text{ajustada})= 0,8503$ ; error estàndard= 0,0189; error promig absolut= 0,0114

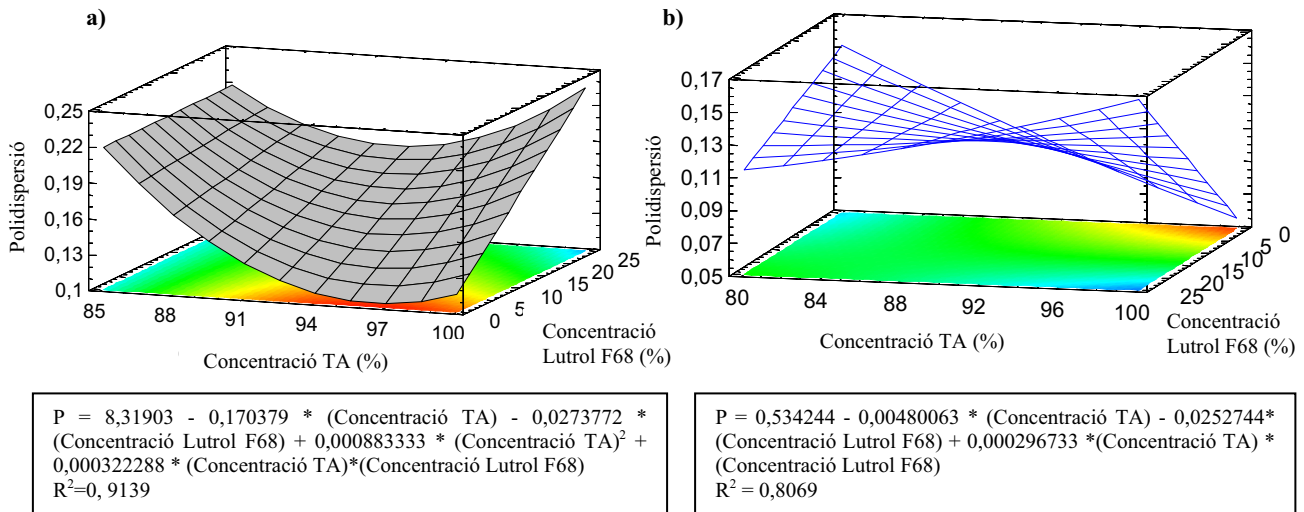


**Fig. 4.20:** Anàlisi de la variància per a l'índex de polidispersitat (a) i Diagrama de Pareto (b) corresponents al disseny de nivell múltiple 4\*3\*2 detallat a la taula XI

Tal com es mostra a la Fig 4.20, en relació a l'índex de polidispersitat, 5 factors presenten una influència estadísticament significativa amb un nivell de confiança del 95%. Pel que fa al tipus d'efecte observat, la utilització de Cremophor EL com a tensioactiu i de concentracions elevades d'aquest component afavoririen l'obtenció de composicions amb un diàmetre de gota més uniforme (corbes de distribució de mida de gota més estretes), mentre que incrementar la concentració de Lutrol F68 augmentaria la polidispersitat del sistema. Tot i això s'ha de tenir en consideració que el disseny factorial proposat únicament explicaria el 90,24% de la variabilitat observada.

Igual que en el cas dels estudis del diàmetre de gota, per obtenir les gràfiques de superfície de resposta es van analitzar les composicions preparades amb Tween i amb

Cremophor separatament. A la Fig 4.21 es poden observar les gràfiques de superfície de resposta obtingudes.



**Fig 4.21:** Gràfiques de superfície de resposta corresponents a l'índex de polidispersitat en funció de la concentració de tensioactiu i Lutrol F68 (%) per a sistemes amb a) Tween 80 i b) Cremophor EL com a component tensioactiu.

A les gràfiques de la Fig 4.21 s'ha representat el factor resposta índex de polidispersitat en funció de la concentració en pes de tensioactiu i de la concentració de Lutrol F 68.

Per a les composicions corresponents a solucions micel·lars (concentració de TA:100%), s'observa un augment de la polidispersió del sistema en incrementar la concentració de Lutrol F68 (relació lineal). Aquest increment podria explicar-se per la formació de micel·les mixtes de Tween 80 o Cremophor EL i Lutrol F68 que coexistirien amb micel·les constituïdes per l'agregació d'un únic tipus de molècules de tensioactiu. Pel que fa a les nano-emulsions no s'observa una relació directa entre la concentració de tensioactiu i el valor de l'índex de polidispersitat sino que aquest dependrà del sistema i de la composició estudiada.

Per a les nano-emulsions preparades amb Tween 80, la concentració O/T (expressada com a concentració de tensioactiu) no presenta un comportament lineal en relació a la polidispersió sino que respon a un model quadràtic, existint una relació O/T "òptima" que dependrà de la concentració de Lutrol F68, per a la qual s'obtenen uns valors de polidispersió més baixos. Cal destacar que tots els valors de polidispersió van ser inferiors a 0,200 tret els corresponents a la relació O/T 15/85 (85% de tensioactiu), amb la que es van obtenir valors pròxims a 0,220 independentment de la presència de Lutrol F68.

Pel que fa a les nano-emulsions amb Cremophor EL, únicament es pot predir una relació lineal entre la concentració O/T i la polidispersió quan no s'incorpora el co-tensioactiu a les mescles. En els sistemes amb Lutrol F 68, el valor de la polidispersió dependrà de la interacció entre la concentració de tensioactiu i de Lutrol F68, responnent novament a un model quadràtic. Tot i això s'ha de tenir en consideració que es va obtenir un baix coeficient de correlació (0,8069) i per tant el model proposat explicaria únicament un 80% de la variabilitat observada. Per altra banda, per a totes les composicions amb Cremophor EL els valors de polidispersió obtinguts van ser  $< 0,200$  indicant la formació de sistemes de baixa polidispersitat independentment de les diferències entre aquets valors.

*Disseny factorial central compost (composicions del sistema aigua/ Cremophor EL/Lutrol F68/Miglyol 812)*

El disseny factorial central compost es va elaborar d'acord amb els resultats obtinguts en els capítols ***“Influència de la concentració de co-tensioactiu i aigua en la preparació de nano-emulsions”*** i ***“Influència de la concentració O/T”***, on es va observar que un increment de la proporció de co-tensioactiu o una disminució de la concentració tant del tensioactiu com del component aquós, comportava una augment de la mida de les gotes de les nano-emulsions del sistema aigua/ Cremophor EL/Lutrol F68/Miglyol 812. Per tant, per a desenvolupar el disseny experimental, es van seleccionar les següents variables de composició:

- Concentració d'aigua (expressada en % en pes). Com a nivell mínim es va establir un valor del 85% i com a nivell màxim un 95%.
- Concentració de tensioactiu. Correspon a la relació oli/tensioactiu expressada en % en pes de tensioactiu amb un nivell màxim i mínim de la variable de 90 i 80 % respectivament.
- Concentració de co-tensioactiu. Fa referència a la relació tensioactiu/ co-tensioactiu expressada en % en pes de co-tensioactiu. Els nivells seleccionats com a màxim i mínim de la variable han sigut 25% (relació Cremophor EL/Lutrol F68 de 3/1) i 16,66% (relació Cremophor EL/Lutrol F68 de 5/1) respectivament.

Els valors de les variables de composició es van fixar en relació als estudis del comportament fàsic per tal de garantir que les formulacions obtingudes corresponguin a la regió I del diagrama on es formen composicions líquides, transparents i isòtropes (veure Fig.4.9).

Un cop aplicades aquestes condicions es van generar un nombre total de 16 experiments, on cada factor experimental es va estudiar a 5 nivells diferents. A la taula XII es mostren els valors de concentració de tensioactiu, aigua i Lutrol F68 per a cadascun dels experiments i el diàmetre de gota i l'índex de polidispersitat obtinguts per DLS a 25°C..

**Taula XII:** Disseny central compost: valors de les variables de composició per a cada formulació i diàmetre de gota i índex de polidispersitat obtinguts per DLS a 25°C.

Nº	Concentració TA (% ,p/p)	Concentració aigua (% ,p/p)	Concentració Lutrol F68 (% ,p/p)	Diàmetre de gota (Z-average (nm))	P
1	80,0	85,0	25,00	55,40	0,197
2	90,0	85,0	16,66	30,67	0,175
3	85,0	90,0	20,83	26,75	0,108
4*	85,0	90,0	20,83	26,84	0,144
5	85,0	98,4	20,83	21,64	0,109
6	85,0	81,6	20,83	51,17	0,190
7	76,6	90,0	20,83	34,92	0,112
8	90,0	85,0	25,00	36,02	0,176
9	85,0	90,0	13,81	25,75	0,095
10	85,0	90,0	27,84	35,96	0,161
11	90,0	95,0	25,00	19,68	0,097
12	80,0	95,0	16,66	23,56	0,112
13	80,0	85,0	16,66	44,00	0,174
14	90,0	95,0	16,66	17,79	0,066
15	93,4	90,0	20,83	24,14	0,131
16	80,0	95,0	25,00	25,26	0,106

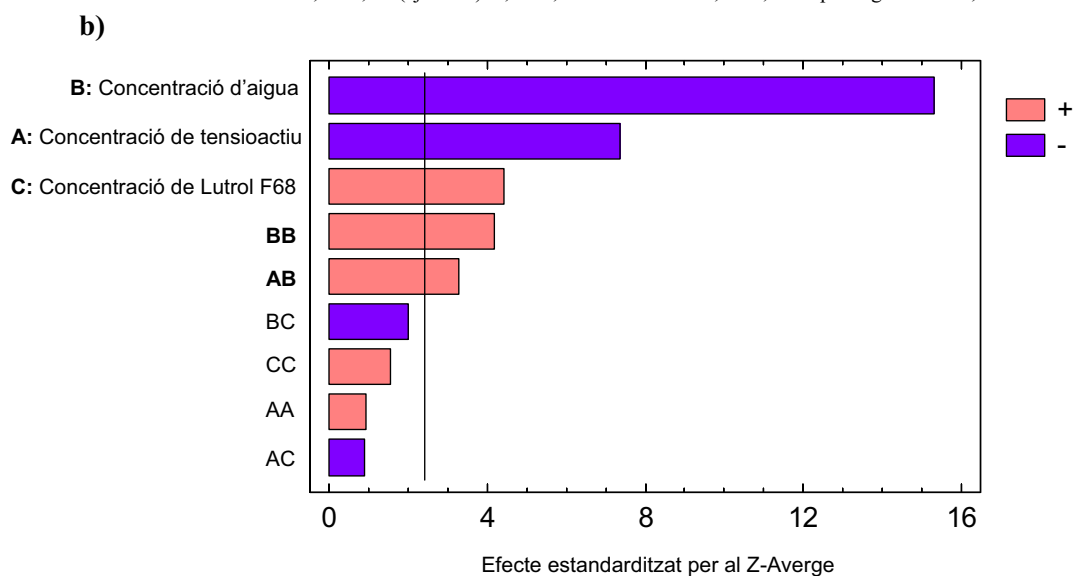
\* L'experiment nº 4 correspon a una rèplica de l'experiment nº3. Ambdós assaigs corresponen als 2 punts centrals del disseny factorial.

Els efectes principals i les interaccions entre factors es poden definir com les diferències obtingudes entre els valors de diàmetre de gota corresponents al nivell més baix i al més elevat per a cada variable de composició estudiada. Per tal de poder discernir quins són els efectes i les interaccions significativament diferents de zero i per tant no deguts a l'error experimental, es va realitzar una anàlisi de la variància (ANOVA). Tots els efectes i interaccions obtinguts s'han representat gràficament en un diagrama de Pareto. A la Fig. 4.22 es poden observar els resultats corresponents a l'ANOVA i el diagrama de Pareto corresponents al disseny central compost detallat a la taula XII.

a)

	<i>Suma de quadrats</i>	<i>Gl</i>	<i>Quadrat Promig</i>	<i>Relació-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:ConcentracióTA	283,195	1	283,195	53,99	<b>0,0003</b>
B:Concentració aigua	1227,28	1	1227,28	233,96	<b>0,0000</b>
C:Concentració CoTA	103,031	1	103,031	19,64	<b>0,0044</b>
AA	4,84214	1	4,84214	0,92	0,3738
AB	57,0312	1	57,0312	10,87	<b>0,0165</b>
AC	4,29245	1	4,29245	0,82	0,4005
BB	92,1356	1	92,1356	17,56	<b>0,0057</b>
BC	21,6482	1	21,6482	4,13	0,0885
CC	13,1503	1	13,1503	2,51	0,1644
Error total	31,4742	6	5,24569		
Total (experiments.)	1824,23	15			

$R^2=0,9827$ ;  $R^2$  (ajustada): 0,9568; error estàndard: 2,2903; error promig absolut: 1,1253



**Fig. 4.22** : Anàlisi de la variància per al Z-Average (a) i Diagrama de Pareto (b) corresponents al disseny central compost detallat a la taula XII.

D'acord amb els resultats obtinguts en la Fig. 4.22 per al sistema aigua/Cremophor EL/Lutrol F68 (3:1, p/p)/Miglyol 812 es poden observar fins a 5 efectes estadísticament significatius en el diàmetre de gota de les nano-emulsions amb un nivell de confiança del 95% i per tant amb un valor de  $p < 0,05$ . El valor estadístic del coeficient de correlació al quadrat indica que el disseny experimental seleccionat explica el 98,27% de la variabilitat en el diàmetre de les gotes. Cal destacar que per a les 3 variables de composició estudiades el valor de  $p$  és inferior a 0,01. Considerant únicament les variables que influeixen significativament en la mida de gota, per a la concentració



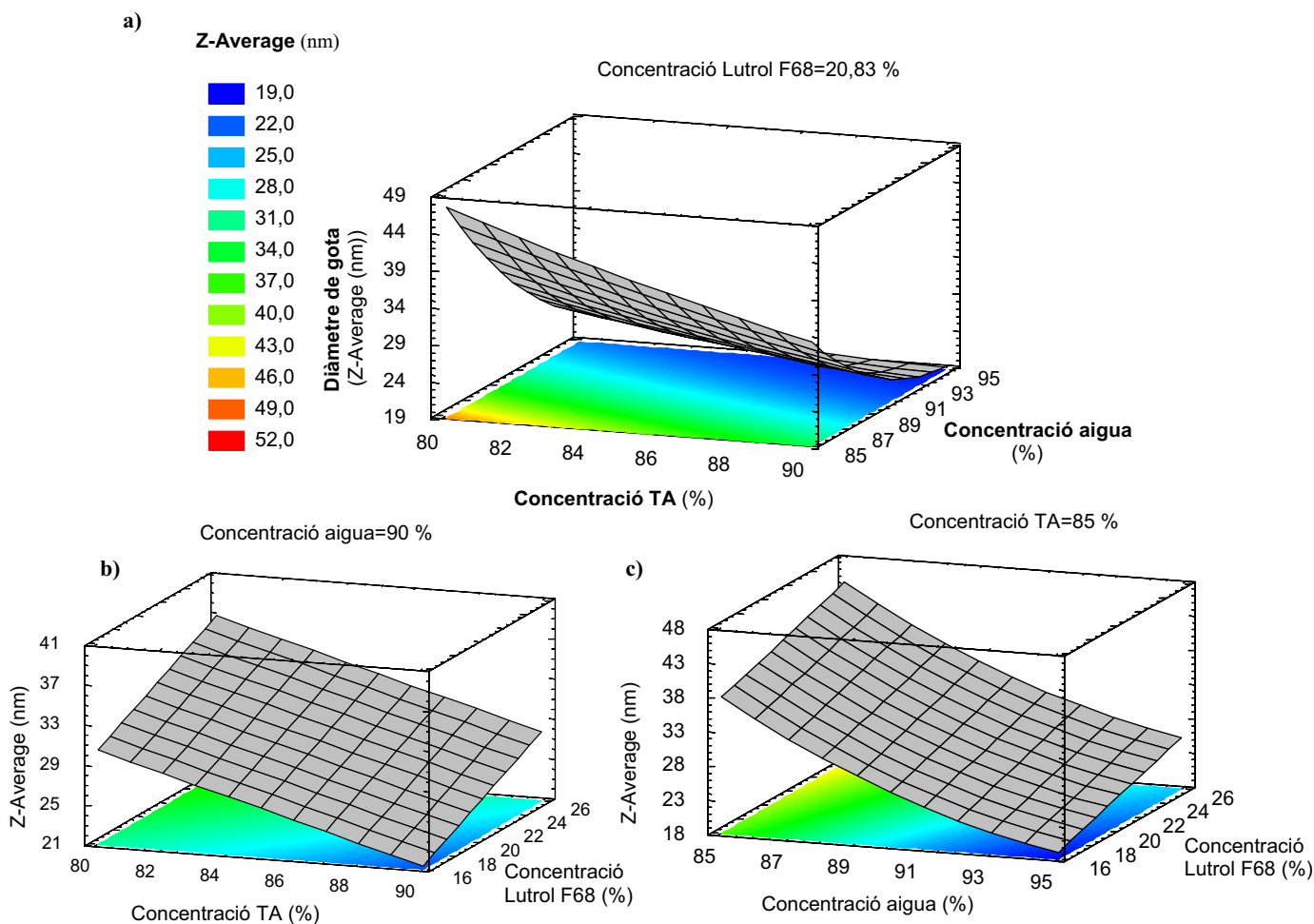
d'aigua i concentració de tensioactiu s'observa un efecte negatiu en el paràmetre resposta determinat, és a dir una disminució del Z-Average, mentre que per a la concentració de Lutrol F 68 l'efecte és positiu (increment del Z-Average). En els capítols anteriors (veure figures 4.16 i 4.17) ja es va posar de manifest la influència de la concentració de co-tensioactiu, aigua i relació oli/tensioactiu en el diàmetre de les gotes de nano-emulsions preparades amb Cremophor EL com a tensioactiu i Lutrol F68 com a co-tensioactiu.

A partir de les variables i interaccions estadísticament significatives es va determinar la funció de correlació quadràtica per al diàmetre de gota:

$$\mathbf{Z-Average (nm)} = a - b * (\% \text{Concentració TA}) - c * (\% \text{Concentració aigua}) + d * (\% \text{Concentració Lutrol F68}) + e * (\% \text{Concentració TA}) * (\% \text{Concentració aigua}) + f (\% \text{Concentració aigua})^2$$

$$\text{on } a = 1918,4; b = 10,52; c = 29,59; d = 0,66; e = 0,11; f = 0,103$$

A la Fig 4.23 s'han representat les gràfiques de superfície de resposta d'acord amb el model d'equació proposat. Cadascuna de les gràfiques descriu el diàmetre de gota en funció de dues variables de formulació. La variable restant es manté en un valor constant (normalment correspon al valor central entre els nivells màxim i mínim seleccionats).



**Fig. 4.23:** Gràfiques de superfície de resposta corresponents a: a) Diàmetre de gota (nm) en funció de la concentració de tensioactiu i aigua (%); b) diàmetre de gota (nm) en funció de la concentració de tensioactiu i la proporció de Lutrol F68 (%) i c) diàmetre de gota (nm) en funció de la concentració d'aigua i Lutrol F68 (%).

A les gràfiques es pot observar com es va modificant el diàmetre de gota de les nano-emulsions en funció de les diferents variables de composició.

En la figura 4.23a, per a una concentració de Lutrol F68 constant (20,83%), les nano-emulsions amb una mida de gota més petita es formen a elevades concentracions de tensioactiu i aigua, mentre que les que presenten un diàmetre de gota més gran correspondrien a les concentracions més baixes de tensioactiu i aigua estudiades (80 i 85% respectivament). Per tant, una disminució de la concentració de tensioactiu i aigua comportaria un increment del diàmetre de gota de les composicions. Com ja es va constatar al capítol anterior (disseny experimental múltiple 4\*3\*2), per a la variable concentració de tensioactiu (relació O/T), s'observa que hi ha una dependència lineal entre aquest factor i la mida de gota. Pel que fa a la concentració d'aigua, la relació amb

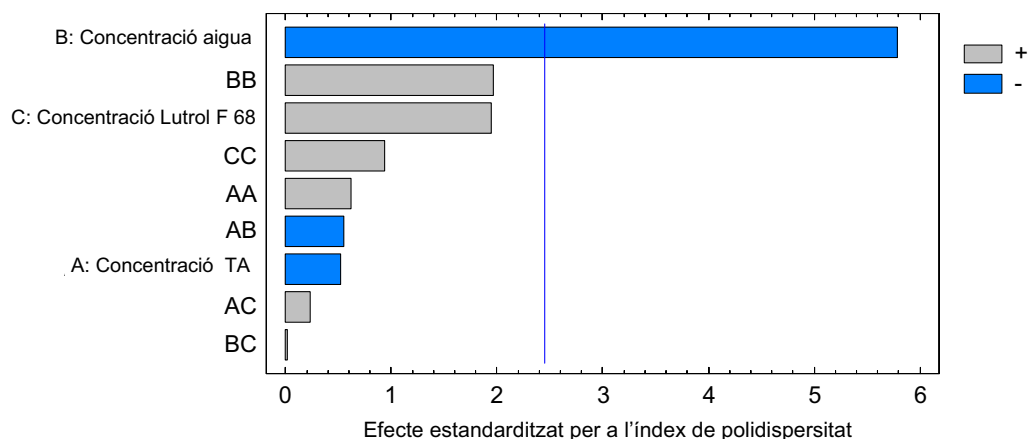
el diàmetre de gota és pràcticament lineal però s'observa una petita inflexió que és dependent de la concentració de tensioactiu (Cremophor EL).

En la Fig 4.23b on s'ha representat el diàmetre de gota de les composicions en funció de la concentració de tensioactiu i co-tensioactiu mantenint constant la concentració d'aigua a un 90% en pes, s'observa l'existència d'una relació lineal entre la concentració de Lutrol F68 i la mida de gota. En aquest cas l'increment de la concentració de co-tensioactiu dóna lloc a la formació de gotes d'un diàmetre superior com ja s'havia observat a la Fig. 4.19b del capítol anterior. Així, les nano-emulsions amb una mida de gota més petita s'aconsegueixen a baixes proporcions de Lutrol F 68 però a elevades concentracions de Cremophor EL. Les dues variables representades corresponen a funcions lineals del diàmetre de gota ja que no s'ha considerat la interacció entre ambdós factors (els resultats de l'ANOVA esmentats anteriorment van evidenciar que la interacció entre aquestes variables no era estadísticament significativa en relació a la mida de gota).

Finalment, quan es manté constant la concentració de tensioactiu (Fig. 4.23c) també s'observa una relació lineal entre la proporció de Lutrol F 68 i el diàmetre de gota de les nano-emulsions obtingudes. Malgrat que no s'ha tingut en compte la interacció entre concentració de Lutrol i aigua ( $p > 0,05$ ), la relació entre aquesta variable i la mida de gota no és del tot lineal ja que intervé el terme quadràtic (concentració d'aigua)<sup>2</sup>. Tot i això, una disminució de la concentració d'aigua suposa un augment considerable del diàmetre de gota. Per tant, les nano-emulsions amb una mida de gota més petita es formarien a baixes concentracions de Lutrol F 68 i elevades concentracions d'aigua.

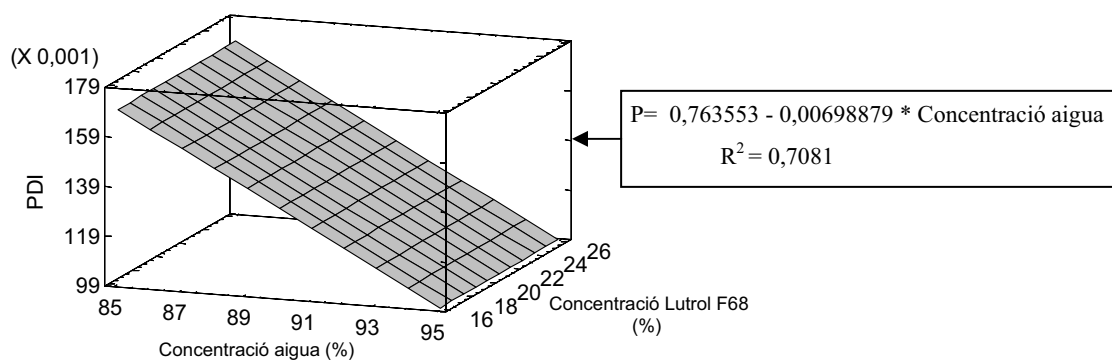
Aquestes efectes corroboren els estudis realitzats als apartats anteriors (veure pàg. 149 i pàg. 152) on ja es va observar un efecte important de les variables concentració d'aigua, concentració de Lutrol F68 i relació O/T en la mida de gota.

Després d'estudiar l'efecte de les diferents variables de composició en el diàmetre de gota es va procedir a analitzar la influència d'aquestes en l'índex de polidispersitat. A continuació es mostren els resultats obtinguts:



**Fig. 4.24:** Diagrama de Pareto obtingut per al disseny central compost detallat a la taula XII.

L'anàlisi de la variància va posar de manifest que únicament la concentració d'aigua té una influència estadísticament significativa en la polidispersitat del sistema amb un nivell de confiança del 95%. En el diagrama de Pareto de la Fig 4.24 s'observa que aquesta variable té un efecte negatiu en la polidispersitat, és a dir, quan s'incrementa la concentració d'aigua disminueix la polidispersió. Per tant, existeix una relació inversament proporcional entre el factor resposta i la variable independent. Si la polidispersitat depèn únicament d'un factor, la variabilitat dels resultats es podria explicar a partir de l'equació d'una recta:



**Fig. 4.25:** Gràfica de superfície de resposta per a la polidispersitat en funció de la concentració d'aigua (%) i de Lutrol F68 (%).

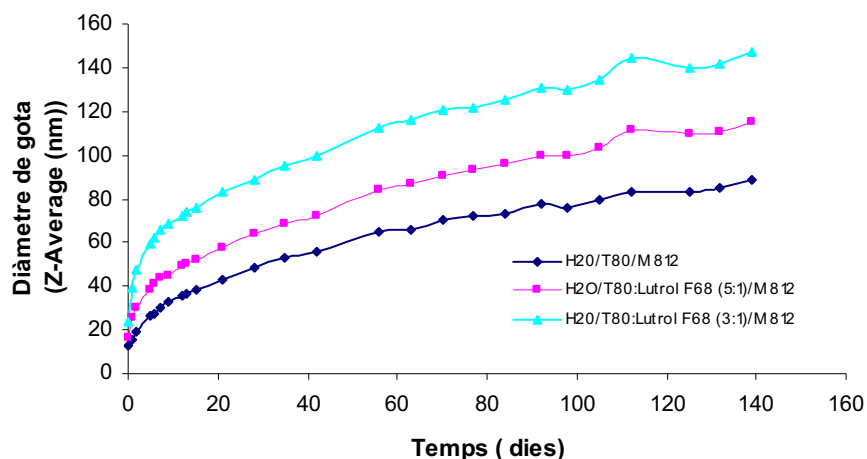
Malgrat els resultats obtinguts, el valor de  $R^2$  s'allunya força de la unitat, indicant que amb aquest model únicament s'explicaria un 70,81% de la variabilitat. De fet, al capítol anterior (veure pàg. 155) on es va dur a terme un disseny factorial en el qual totes les mesclures es van preparar a una concentració fixa d'aigua (90% en pes), es va observar

que la polidispersitat també depenia de les variables de composició concentració de tensioactiu i concentració de co-tensioactiu. Tot i això, es pot observar una clara tendència a obtenir-se valors de polidispersitat més baixos quan s'incrementa la concentració d'aigua (Fig 4.25). Cal destacar que els valors de la polidispersitat van ser inferiors a 0,200 per a totes les mecles preparades en el disseny indicant que les nano-emulsions obtingudes presenten una estreta distribució del diàmetre de partícula.

#### 4.1.4. Estudis d'estabilitat

S'ha estudiat l'estabilitat de diferents nano-emulsions O/W amb una elevada concentració en pes d'aigua (90%) amb la finalitat de seleccionar les composicions amb una estabilitat cinètica adequada per a la posterior elaboració de nanopartícules. Les mescles es van preparar amb la mínima concentració de tensioactiu i/o co-tensioactiu i amb la màxima concentració de component oliós (Miglyol 812) amb la que s'obtenien fàcilment nano-emulsions de baixa polidispersitat amb un diàmetre de gota inferior a 50 nm, d'acord amb els estudis previs de comportament fàsic i de caracterització. El procés d'emulsificació va consistir en addicionar a una temperatura de 70°C, el component aquós lenta i successivament a la mescla oli/tensioactiu prèviament homogeneïtzada. Els estudis d'estabilitat s'han realitzat a 25°C determinant la mida de gota de les nano-emulsions per DLS en funció del temps.

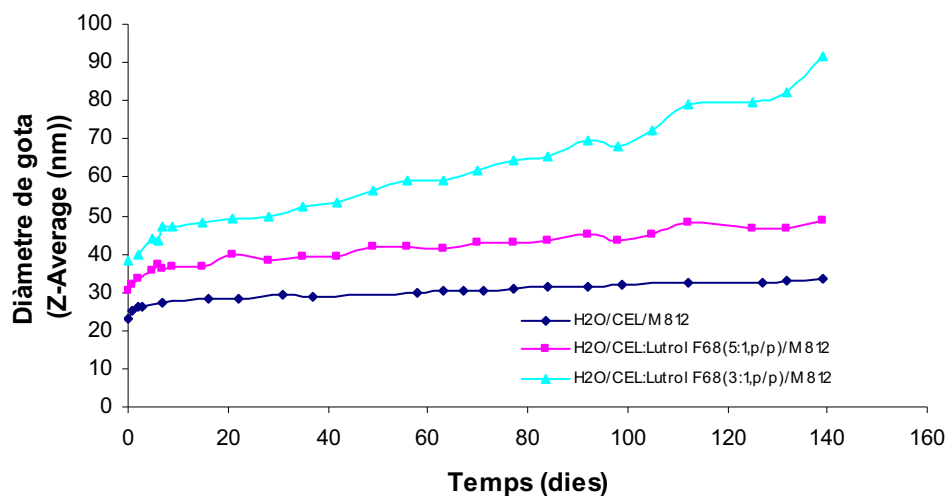
A la figura 4.26 es troben representats els resultats de variació del diàmetre de les gotes de la fase interna de la nano-emulsió en funció del temps a 25°C per a composicions amb un 90% en pes d'aigua i una relació oli/tensioactiu de 10/90. Aquestes formulacions pertanyen a diferents sistemes (aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812).



**Fig. 4.26:** Diàmetre en nanòmetres en funció del temps de nano-emulsions amb un 90% d'aigua i una relació oli/ tensioactiu 10/90 dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 81 i aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812.

Com es pot observar a la representació gràfica (Fig 4.26) la mida de les gotes de les composicions estudiades es va incrementant progressivament amb el temps. S'ha determinat l'estabilitat de les nano-emulsions en un període de 4 mesos i mig. Per a la mateixa relació oli/tensioactiu i la mateixa concentració d'aigua les nano-emulsions amb una mida de gota més petita i les més estables són les que corresponen a composicions sense el co-tensioactiu polimèric i les que presenten un diàmetre més gran són aquelles que contenen una concentració de co-tensioactiu més elevada (relació en pes tensioactiu/co-tensioactiu de 3/1). A diferència del que s'hauria esperat, la incorporació del co-tensioactiu al sistema ternari, no implica una millora de l'estabilitat sino que tindria un efecte negatiu sobre aquesta, observant-se un creixement de gota en 48 hores de 16,37 nm a 25,20 nm (relació Tween 80/ Lutrol F68: 5/1) i de 23,88 nm a 39,03 nm (relació 3/1). Aquest increment de la mida de gota és molt menys pronunciat en el sistema sense co-tensioactiu (de 12,74 nm a 15,76 nm en 48 hores). Malgrat aquest fet, els perfils de les corbes d'estabilitat són molt similars.

S'han preparat nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua amb Cremophor EL com a tensioactiu i Lutrol F68 com a co-tensioactiu i s'ha estudiat la seva estabilitat amb el temps determinant les variacions en el diàmetre de gota. Per tal de poder establir comparacions entre els diferents sistemes es va seleccionar una relació O/T de 20/80 per a totes les composicions. Els resultats obtinguts es troben representats a la figura 4.27.

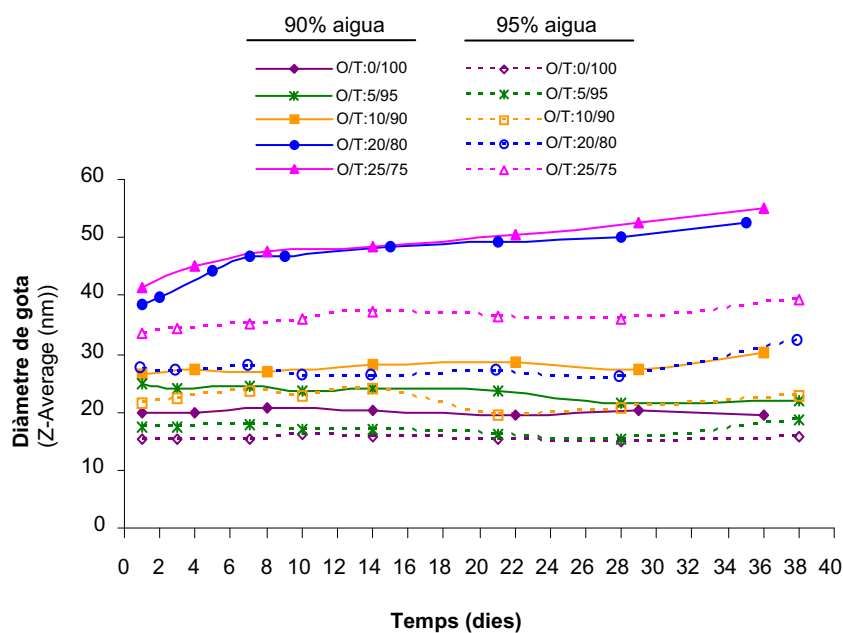


**Fig. 4.27:** Diàmetre en nanòmetres en funció del temps de nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua i una relació O/T de 20/80 dels sistemes aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812, aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

Com a la gràfica anterior també s'observa un increment del diàmetre de les gotes de les nano-emulsions amb el temps però aquest és molt menys pronunciat suggerint que les nano-emulsions amb Cremophor EL presenten una estabilitat cinètica superior a les formulades amb Tween 80. L'addició del co-tensioactiu polimèric en aquest cas, no influiria en l'estabilitat del sistema.

La nano-emulsió més estable correspon al sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 produint-se un increment aproximat de 10 nm en 4 mesos i la més inestable (augment de 100 nm) s'ha obtingut per al sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

S'ha determinat també l'estabilitat en funció de la relació oli/tensioactiu de diferents composicions amb una concentració d'aigua del 90 i 95% en pes del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. Les determinacions s'han realitzat per espectroscòpia de correlació fòtonica en un període de temps de 40 dies. Els resultats es mostren a la figura 4.28.



**Fig. 4.28:** Diàmetre en nanòmetres en funció del temps i de la relació O/T de composicions amb un 90 o un 95% en pes d'aigua del sistema aqua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

La mida de les gotes de la fase dispersa s'incrementa lleugerament amb el temps i amb la relació oli/tensioactiu. Per algunes composicions es pot observar fins i tot que la mida de les gotes roman pràcticament constant durant el període de temps estudiat. Les nano-emulsions de mida més petita i les més estables des del punt de vista cinètic corresponen, per a totes les relacions O/T estudiades, a les composicions que presenten un major percentatge en pes d'aigua (95%). S'han aconseguit preparar nano-emulsions amb una elevada estabilitat cinètica i una mida de gota pràcticament de l'ordre de les solucions micel·lars per a la relació O/T 5/95. Les composicions que han experimentat un creixement superior i per tant presenten una menor estabilitat cinètica, són les que corresponen a les relacions O/T de 20/80 i 25/75 i una concentració d'aigua del 90% en pes.

Com ja s'ha explicat anteriorment, l'extremadament petita mida de gota de les nano-emulsions les fa estables enfront els processos de sedimentació i cremat, de tal manera que els principals mecanismes de desestabilització per a les nano-emulsions són la coalescència i la maduració d'Ostwald (veure capítol 1.1.3.2). Un dels models que permet explicar el fenomen de coalescència en nano-emulsions concentrades és el

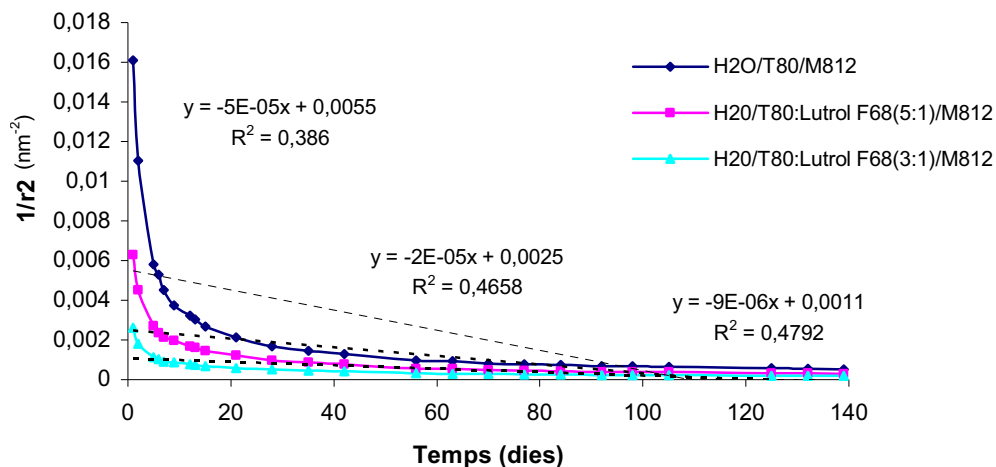


proposat per Deminiere (Deminiere et al., 1998) que es pot explicar per l'equació (capítol 1.1.3.1):

$$1/r^2 = 1/r_0^2 - 8\pi/3 \cdot \omega t$$

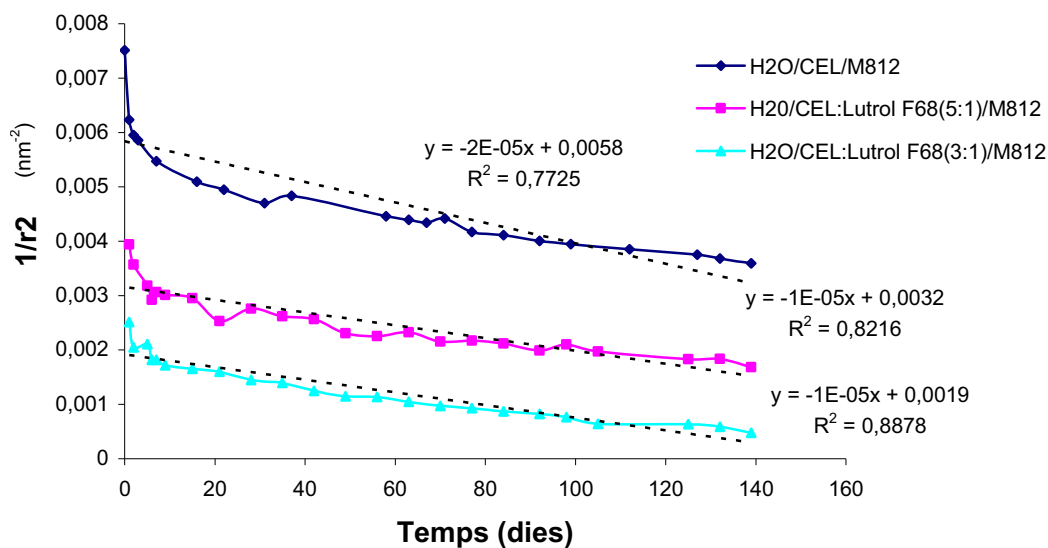
Per tant, si es representa la inversa del radi de les gotes al quadrat en funció del temps s'hauria d'obtenir una regressió lineal si el mecanisme principal és la coalescència.

A les figures 4.29 i 4.30 s'ha representat l' $1/r^2$  respecte al temps d'algunes de les nano-emulsions amb les quals s'han dut a terme els estudis d'estabilitat. La figura 4.29 correspon a les composicions de sistemes que presenten com a tensioactiu el Tween 80 i la figura 4.30 a les composicions formulades amb Cremophor EL.



**Fig. 4.29:** Representació gràfica de l'invers del radi de les gotes al quadrat ( $1/r^2$ ) en funció del temps per a nano-emulsions amb un 90 % en pes d'aigua i una relació oli/ tensioactiu 10/90 dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

La representació gràfica (Fig. 4.29) és clarament no lineal i els valors dels residuals s'allunyen molt de 1, per tant el mecanisme de coalescència no estaria implicat en l'estabilitat d'aquestes nano-emulsions.



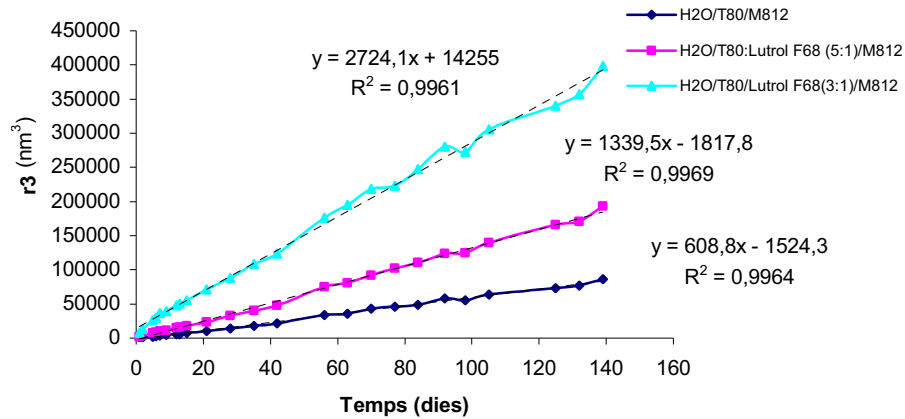
**Fig. 4.30:** Representació gràfica de l'invers del radi de les gotes al quadrat ( $1/r^2$ ) en funció del temps per a nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua i una relació O/T de 20/80 dels sistemes aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812, aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

Els resultats representats a la Fig. 4.30, malgrat no haver-se obtingut un bon valor del coeficient de correlació, no són excloents per a descartar el procés de coalescència en la desestabilització de les composicions estudiades i és necessari comparar les gràfiques obtingudes per ambdós mecanismes possibles (Fig.4.30 i 4.32).

El procés de maduració d'Ostwald es pot explicar per l'equació de Lifshitz, Slyozov i Wagner (Lifshitz, 1961; Wagner, 1962) que prediu una relació lineal entre el  $r^3$  (on  $r$  es el radi de les gotes) i el temps (veure capítol 1.1.3.2):

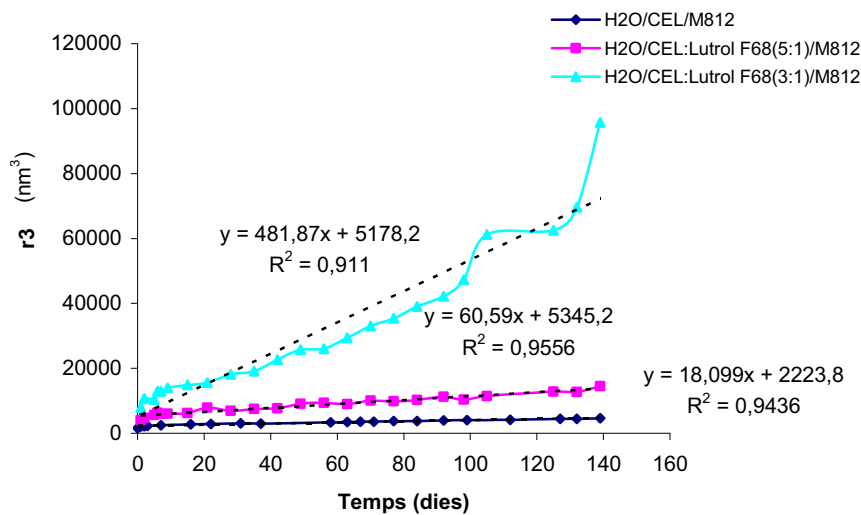
$$\omega = \frac{dr^3}{dt} = \frac{8 C(\infty) \gamma \cdot V_m \cdot D}{9 \rho \cdot R \cdot T}$$

A les figures 4.31 i 4.32 s'ha representat el radi al cub en funció del temps de nano-emulsions de sistemes que presenten Tween 80 o Cremophor EL com a component tensioactiu respectivament.



**Fig. 4.31:** Representació gràfica del radi de les gotes al cub ( $r^3$ ) en funció del temps per a nano-emulsions amb un 90% d'aigua i una relació oli/ tensioactiu 10/90 dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

Per a les composicions en les quals s'ha utilitzat Tween 80 (Fig. 4.31) com a tensioactiu, en representar el radi de les gotes al cub ( $r^3$ ) en funció del temps s'obtenen regressions lineals que indueixen a pensar en la maduració d'Ostwald com a mecanisme responsable de la inestabilitat.



**Fig. 4.32:** Representació gràfica del radi de les gotes al cub ( $r^3$ ) en funció del temps per a nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua i una relació O/T 20/80 dels sistemes aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812, aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812.

A diferència de les composicions preparades amb Tween 80 (Fig 4.31), no es va observar una relació lineal entre el radi al cub de les gotes de nano-emulsió i el temps en

les dispersions que contenien Cremophor EL com a tensioactiu (Fig 4.32). No obstant, per a aquestes nano-emulsions es va obtenir un valor del residual al quadrat al voltant de 0,9 que suggereix una certa implicació del mecanisme de maduració d'Ostwald en la desestabilització dels sistemes.

Si s'observen les gràfiques de les figures 4.29, 4.30, 4.31 i 4.32 es pot deduir que les nano-emulsions dels sistemes aigua/ tensioactiu/ Miglyol 812 i aigua/Tween 80: Lutrol F68 (relacions 5:1 i 3:1)/ Miglyol 812 s'inestabilitzen per maduració d'Ostwald ja que la representació gràfica del  $r^3$  en funció del temps és lineal mentre que la de l'  $1/r^2$  respecte al temps no s'ajusta al model d'una recta. Per contra, en el cas de nano-emulsions O/W dels sistemes amb Cremophor EL no s'ha pogut determinar el mecanisme principal i l'inestabilitat podria ser deguda a una combinació d'ambdós processos.

#### **4.1.5. Incorporació de ketoprofèn en nano-emulsions**

Una de les finalitats d'estudiar sistemes col·loïdals amb tensioactius és aprofitar la seva gran capacitat de solubilització de molècules de diferent naturalesa en formar agregats en solució o en mescles de líquids immiscibles entre si facilitant així la incorporació en formulacions de principis actius insolubles.

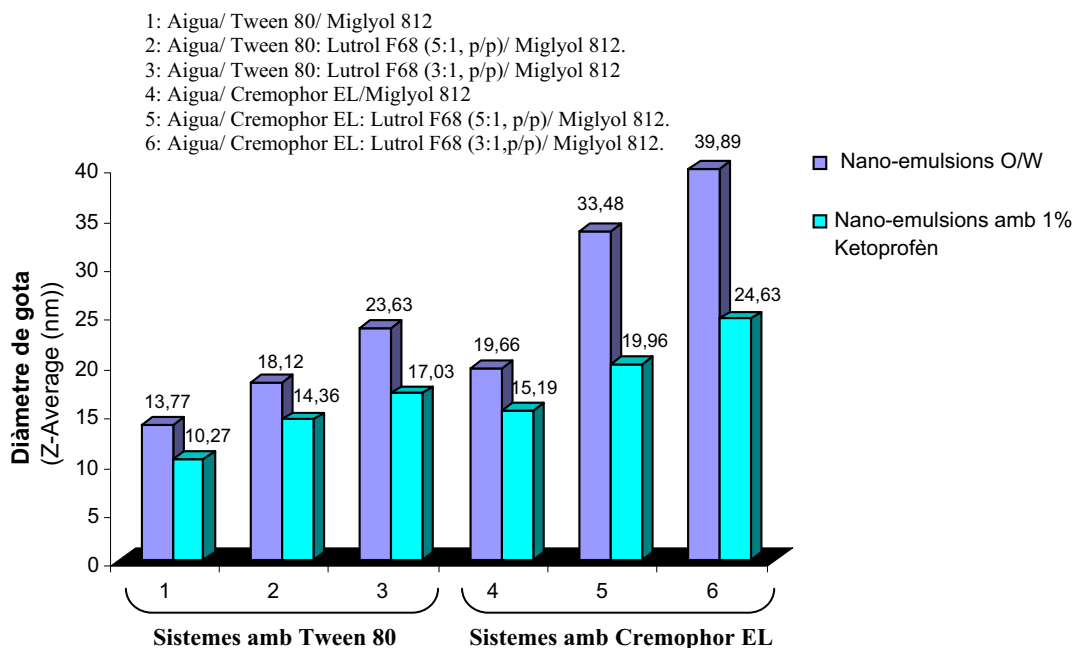
S'han seleccionat nano-emulsions O/W amb un 90% en pes d'aigua de diferents sistemes aigua/ tensioactiu: co-tensioactiu/ component oliós dels quals s'havia estudiat prèviament el comportament fàsic a 25°C i s'havien realitzat estudis d'estabilitat. Les nano-emulsions s'han preparat pel mètode d'emulsificació amb el qual s'obtenia un diàmetre de gota més petit i un índex de polidispersitat més baix. Un cop preparades s'ha procedit a la solubilització d'un principi actiu (ketoprofèn) per addició successiva de petites quantitats de fàrmac fins assolir la concentració màxima. Les concentracions màximes solubilitzades es van quantificar per HPLC (veure capítol 3.3.7). A la taula XIII es mostren les concentracions màximes de ketoprofèn solubilitzades en diferents nano-emulsions O/W. El ketoprofèn és un fàrmac molt insoluble en aigua (solubilitat inferior al 0,1%).

**Taula XIII:** Solubilitat màxima (expressada en % en pes) de ketoprofèn en nano-emulsions preparades amb un 90% en pes d'aigua.

Sistema aigua/ tensioactiu no iònic/ oli	Formulació	Composició de nano-emulsions seleccionades		Concentració màxima de ketoprofèn solubilitzada (%)
		Aigua (%)	Relació O/T	
Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812	E1	90	10/90	1,23
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	F'1	90	10/90	1,22
Aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	H'1	90	10/90	1,27
Aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812	J1	90	10/90	1,67
	J2		20/80	1,28
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812	N1	90	10/90	1,59
	N2		20/80	1,42
Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812	M1	90	10/90	1,32
	M2		20/80	1,24

Com es pot observar a la taula XIII s'ha aconseguit solubilitzar ketoprofèn en nano-emulsions O/W fins a concentracions compreses entre l'1 i l'1,7% en pes. La quantitat més elevada de ketoprofèn solubilitzat s'ha aconseguit en nano-emulsions que presentaven Cremophor EL com a tensioactiu. Tenint en compte que el fàrmac utilitzat és pràcticament insoluble en aigua (solubilitat de 0,014 % en pes determinada experimentalment), s'ha aconseguit millorar notablement la solubilitat en composicions amb un elevat contingut d'aigua (90%).

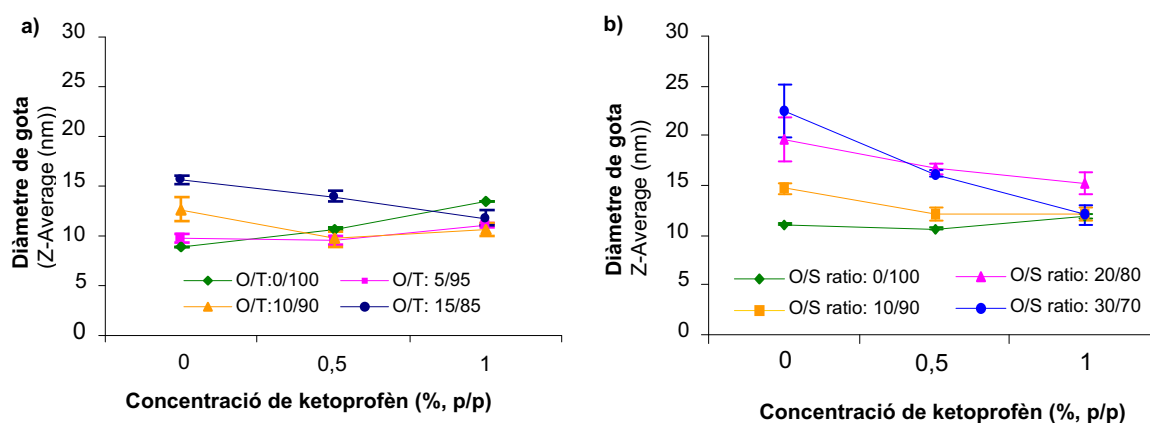
S'han caracteritzar mitjançant DLS les nano-emulsions sense principi actiu i amb una concentració de l'1% en pes de ketoprofèn solubilitzat just després de ser preparades. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.33.



**Fig. 4.33:** Diàmetre de les gotes en nm de nano- emulsions (90% en pes d'aigua, relació O/T de 10/90 en sistemes amb Tween 80 i de 20/80 en sistemes amb Cremophor EL) amb un 1% de ketoprofèn solubilitzat i nano-emulsions preparades sense fàrmac de diferents sistemes aigua/tensioactiu/oli i aigua/tensioactiu:co-tensioactiu/oli.

Els índex de polidispersitat per a totes les composicions estudiades van ser inferiors a 0,200 i per tant, corresponents a sistemes de baixa polidispersitat. La solubilització de ketoprofèn en les nano-emulsions O/W seleccionades implica una disminució important del diàmetre de les gotes de la fase interna que podria suggerir que el fàrmac es localitzaria preferentment a la interfície de les gotes enlloc de trobar-se solubilitzat al seu interior i actuaria augmentant el radi de curvatura i afavorint la seva estabilització. La disminució en la mida de les gotes sembla ser més acusada en incorporar el co-tensioactiu polimèric, esdevenint més important per a les nano-emulsions amb una concentració més elevada de Lutrol F68 (relació en pes tensioactiu: co-tensioactiu 3:1). No s'han observat variacions significatives en els valors de polidispersió en solubilitzar el fàrmac. La disminució del diàmetre s'atribuiria per tant, a que el principi actiu es comportaria com un co-tensioactiu ja que presenta propietats amfifíliques i formaria gotes mixtes amb el tensioactiu i el co-tensioactiu polimèric amb les conseqüents interaccions. En els estudis de Podlogar et al. (2005) ja es va observar que el ketoprofèn podia incorporar-se en la pel·lícula interfacial actuant com a co-tensioactiu en la formació de microemulsions bicontínues i de tipus O/W en el sistema aigua/Tween 40/Imwitor 308/ Miristat d'isopropil.

Per a estudiar la influència del ketoprofèn en el diàmetre de gota, es van seleccionar nano-emulsions amb diferents relacions O/T i un 90% en pes d'aigua dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812. Les nano-emulsions es van preparar amb i sense principi actiu emprant-se concentracions de ketoprofèn de 0,5 i de l'1% en pes. El mètode de preparació va consistir en solubilitzar prèviament el fàrmac en la mescla oli/ tensioactiu i posteriorment es va incorporar l'aigua per addicions successives a 70°C (veure capítol 3.3.7). El ketoprofèn no experimenta cap alteració a aquesta temperatura ja que la seva temperatura de fusió és de 95,93°C (determinada experimentalment per DSC). Les composicions es van caracteritzar per DLS a 25°C. A la figura 4.34 es troben representats els resultats obtinguts.



**Fig. 4.34 :** Diàmetre de les gotes en funció de la concentració de ketoprofèn solubilitzada i de la relació O/T en composicions amb un 90% d'aigua dels sistemes a) aigua/Tween 80/ Miglyol 812 i b) aigua/Cremophor EL/ Miglyol 812.

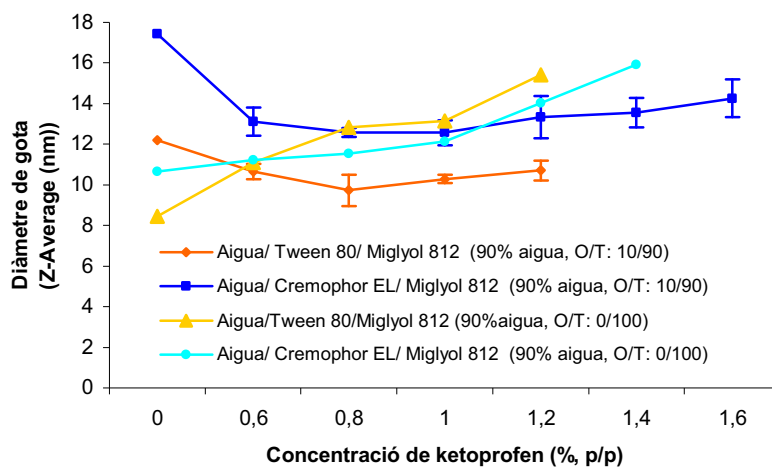
En el sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 la solubilització d'un 1% de ketoprofèn suposa un augment del diàmetre de les micel·les de 9 nm (sense fàrmac) fins a 14 nm (amb 1% de ketoprofèn). Per a la relació O/T de 5/95 la mida de les gotes pràcticament no es modifica en presència del fàrmac mentre que per a les relacions O/T de 10/90 i de 15/85 s'observa una disminució considerable del diàmetre de les gotes de la fase interna en solubilitzar ketoprofèn; aquesta disminució és més pronunciada en el cas de la relació O/T de 15/85 on la mida de gota es redueix de  $15,61 \pm 0,39$  nm a  $11,63 \pm 0,72$  nm. En totes les composicions estudiades en absència de fàrmac el diàmetre de les gotes augmenta amb la relació O/T (veure Fig. 4.17).

En el sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 les composicions presenten una tendència similar, el diàmetre de les gotes augmenta lleugerament amb la concentració de fàrmac en la solució micel·lar i disminueix en les nano-emulsions O/W. La variació de diàmetre més important s'observa per a la relació O/T de 30/70, on la mida de gota es redueix de  $22,50 \pm 2,62$  nm (composició sense ketoprofèn) a  $12,06 \pm 1,05$  nm (composició amb un 1% en pes de ketoprofèn).

D'acord amb els resultats obtinguts, en les solucions micel·lars el ketoprofèn es situaria a l'interior del microambient apolar originat per les cues lipòfiles del tensioactiu i això comportaria un augment de la mida de les micel·les.

En el cas de les nano-emulsions, el ketoprofèn es dipositaria preferentment a la interfície oli/aigua ja que l'interior de les gotes es troba el Miglyol 812 i la solubilitat en el component oliós és molt inferior a la solubilitat en els tensioactius (4,18% en pes per al Miglyol 812 i  $> 30\%$ , p/p per al Tween 80 i per al Cremophor EL). El principi actiu actuaria doncs com a co-tensioactiu, com ja s'ha explicat anteriorment, i en conseqüència el diàmetre de les gotes disminuiria.

Entre les diferents composicions estudiades es van seleccionar les solucions micel·lars i les nano-emulsions amb una relació O/T: 10/90 i un 90% en pes d'aigua dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812. Aquestes formulacions es van preparar amb quantitats creixents de fàrmac (incrementant la concentració de ketoprofèn en un 0,2% en pes) fins assolir la concentració màxima solubilitzada i es van caracteritzar per DLS a 25°C (veure Fig. 4.35).



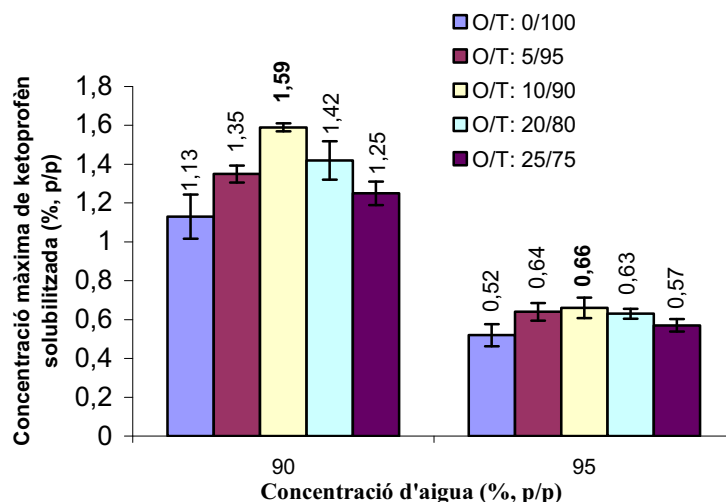
**Fig. 4.35:** Variació del diàmetre de la fase interna caracteritzat per DLS en funció de la concentració de ketoprofèn de solucions micel·lars i nano-emulsions amb un 90% en pes d'aigua i una relació O/T 10/90 dels sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812.



Com es pot observar a la figura 4.35, en les solucions micel·lars, la mida de les micel·les s'incrementa a mesura que es solubilitza ketoprofèn fins a un valor de diàmetre de 16 nm per a les composicions amb Cremophor EL i de 15 nm en les composicions amb Tween 80. Aquests valors de diàmetre s'obtenen quan es solubilitzen concentracions de fàrmac de l'1,4% i l'1,2% respectivament. Per a la mateixa relació O/T s'aconsegueix solubilitzar més concentració de fàrmac en les composicions que presenten Cremophor EL com a tensioactiu.

Quan s'estudien les nano-emulsions s'observa un descens màxim del diàmetre de gota en assolir-se concentracions de ketoprofèn del 0,8% en pes; per a concentracions superiors de fàrmac la mida de les gotes pràcticament no es modifica. D'acord amb aquest fenomen sembla existir una concentració màxima de ketoprofèn a partir de la qual el fàrmac ja no es situaria a la interfície i començaria a solubilitzar-se en el component oliós.

S'ha estudiat també la solubilitat màxima de ketoprofèn en funció de la relació O/T i la concentració d'aigua en composicions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. S'han preparat triplicats de les formulacions amb un 90 i un 95% d'aigua mitjançant el mètode d'emulsificació que permetia obtenir un diàmetre de gota de la fase interna més petit i una polidispersió més baixa (mètode E). Una vegada preparades les mostres s'han deixat en repòs a 25°C. Posteriorment s'han addicionat quantitats progressives i controlades de principi actiu cada 24 hores amb la finalitat d'observar possibles canvis en les composicions indicatius d'haver assolit la màxima concentració de solubilització. Les quantitats màximes de fàrmac solubilitzades s'han determinat per HPLC tal com s'explica al capítol 3.3.7. Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.36.



**Fig. 4.36:** Concentració màxima de ketoprofèn solubilitzada en composicions amb una concentració d'aigua del 90 i 95% en pes en funció de la relació O/T, determinada per HPLC del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

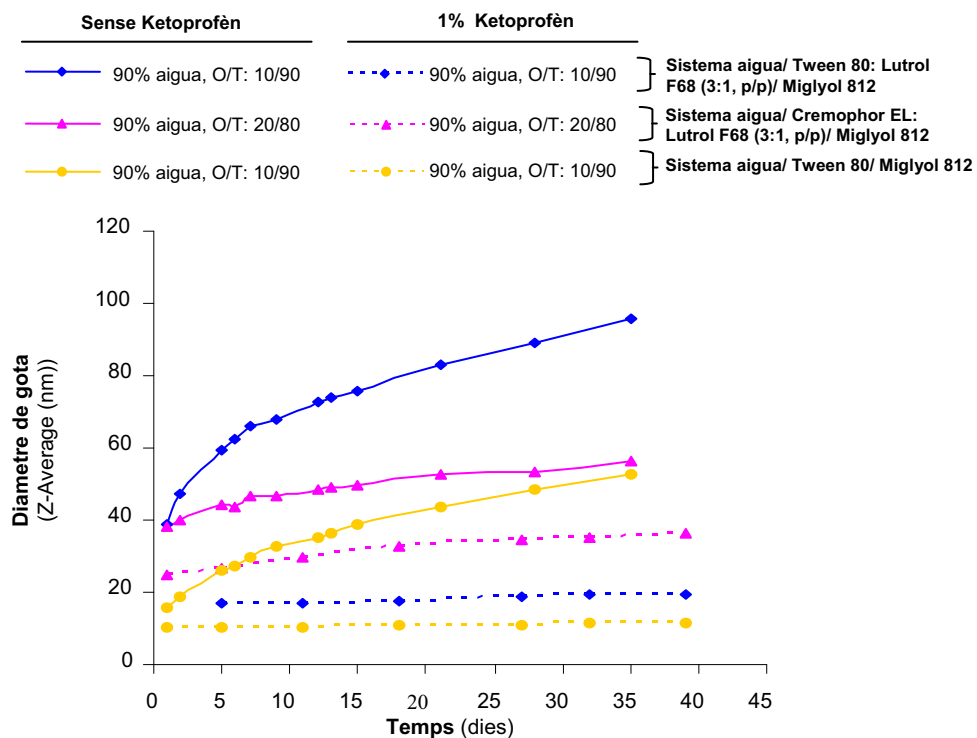
En concordança amb la baixa solubilitat del ketoprofèn en aigua, s'han solubilitzat concentracions de fàrmac més elevades en les composicions amb un 90% en pes d'aigua que en les composicions amb un 95% de component aquós. La màxima concentració de fàrmac solubilitzat correspon a la relació O/T 10/90 per ambdues concentracions d'aigua estudiades. S'ha aconseguit incorporar un màxim d'un 1,59 % en pes de ketoprofèn en la nano-emulsió amb un 90% d'aigua i una relació O/T 10/90. En les composicions preparades amb un 95% en pes d'aigua aquest màxim és del 0,66 %. El percentatge en pes de ketoprofèn solubilitzat ha sigut superior en les formulacions corresponents a nano-emulsions que en les solucions micel·lars. En les solucions micel·lars, en incorporar concentracions de fàrmac superiors a la concentració màxima de solubilització del ketoprofèn, es van observar canvis importants en l'aspecte macroscòpic de les composicions que indicaven una desestabilització del sistema. En aquest cas es va considerar com a valor màxim la concentració de fàrmac immediatament anterior.

En les nano-emulsions, la concentració màxima de ketoprofèn solubilitzada tendeix a disminuir amb la relació O/T tot i que aquesta condició no es compleix per a la relació O/T de 5/95. Per a aquesta relació, la concentració de tensioactiu és molt elevada mentre que la de component oliós és molt baixa, amb la qual cosa s'afavoriria la coexistència de micel·les i gotes de nano-emulsió dins la mateixa formulació (Weiss, 1996; Izquierdo, 2002) i la capacitat de solubilització del sistema disminuiria. Per tant, per a aquest

sistema existiria una concentració oli/tensioactiu òptima (10/90) per a la solubilització del ketoprofèn.

#### 4.1.5.1. Estudis d'estabilitat en composicions amb el principi actiu incorporat

S'ha estudiat l'estabilitat de nano-emulsions dels sistemes aigua/Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1,p/p)/ Miglyol 812 amb una concentració d'aigua del 90% en pes i una relació O/T de 10/90 o de 20/80, determinant com es modifica la mida de gota de la fase interna en funció del temps mitjançant DLS. S'han preparat composicions amb un 1 % en pes de ketoprofèn solubilitzat i composicions sense fàrmac. Els estudis s'han realitzat durant un període de temps de 30 dies durant el qual les formulacions no experimentaven separació en fases. Les composicions amb el principi actiu s'han preparat a 70°C solubilitzant el ketoprofèn en la mescla O/T i posteriorment addicionant quantitats successives d'aigua. A la figura 4.37 es mostren els resultats corresponents als diàmetres de gota en funció del temps determinats per DLS a 25°C.



**Fig. 4.37:** Variació del diàmetre de gota en funció del temps en nano-emulsions sense fàrmac i amb un 1% de principi actiu solubilitzat de diferents sistemes aigua/ tensioactiu no iònic: co-tensioactiu/ component oliós.

Les nano-emulsions que contenen ketoprofèn presenten una elevada estabilitat cinètica, ja que pràcticament no es modifica la mida de la gota de la fase interna durant el temps en el que s'ha realitzat l'estudi. En comparar-se les mateixes nano-emulsions en presència i en absència de fàrmac es pot observar que la solubilització de ketoprofèn afavoreix considerablement l'estabilitat de les composicions. En les nano-emulsions sense principi actiu el diàmetre de les gotes s'incrementa amb el temps entre uns 20-50 nm, depenent de la formulació, mentre que en les composicions amb el ketoprofèn incorporat el diàmetre de gota roman pràcticament constant. Aquest fet corrobora la disposició del ketoprofèn en la interfície, ja que el radi de curvatura augmentaria i per tant s'afavoriria l'estabilització de les gotes de la fase interna. La nano-emulsió amb un diàmetre de gota més petit (10 nm) correspon a la relació O/T 10/90 del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 que conté un 1% de ketoprofèn solubilitzat. Els estudis d'estabilitat realitzats també posen de manifest la disminució del diàmetre de gota en presència de fàrmac. Les diferències en la mida de gota entre les nano-emulsions preparades amb i sense ketoprofèn s'intensifiquen amb el temps degut a la desestabilització per colascència i/o maduració d'Ostwald que té lloc en les composicions sense fàrmac (veure apartat 4.1.4).

### **4.1.6. Estudi de l'aplicació de nano-emulsions O/W com a sistemes d'administració de fàrmacs per via cutània i transdèrmica**

S'han estudiat les nano-emulsions de fase externa aquosa com a possibles vehicles d'administració de fàrmacs poc solubles o insolubles en aigua per a la seva aplicació per via cutània i transdèrmica. En una primera fase s'ha realitzat un estudi de l'efecte d'aquestes nano-emulsions en ser aplicades sobre la pell de voluntaris sans per detectar si alguns dels components de les formulacions poden alterar la funció barrera de la pell que duu a terme principalment la capa còrnia. En segon lloc, s'han realitzat estudis de permeació cutània mitjançant assaigs *ex vivo* d'un principi actiu (ketoprofèn) solubilitzat en les nano-emulsions O/W.

#### 4.1.6.1. Efecte de les nano-emulsions sobre la pell *in vivo*

Per a estudiar la innocuïtat de les nano-emulsions O/W en ser aplicades sobre la pell s'ha determinat amb un evaporímetre la pèrdua d'aigua transepidermica (TEWL), com a paràmetre indicatiu de l'estat de la capa còrnia de la pell, i s'han realitzat mesures de la coloració de la pell amb un espectrofotòmetre per a valorar l'aparició d'eritema. A continuació s'expliquen amb detall cadascun d'aquests estudis.

##### *Estudi de l'efecte de les nano-emulsions sobre l'estructura de la capa còrnia de la pell*

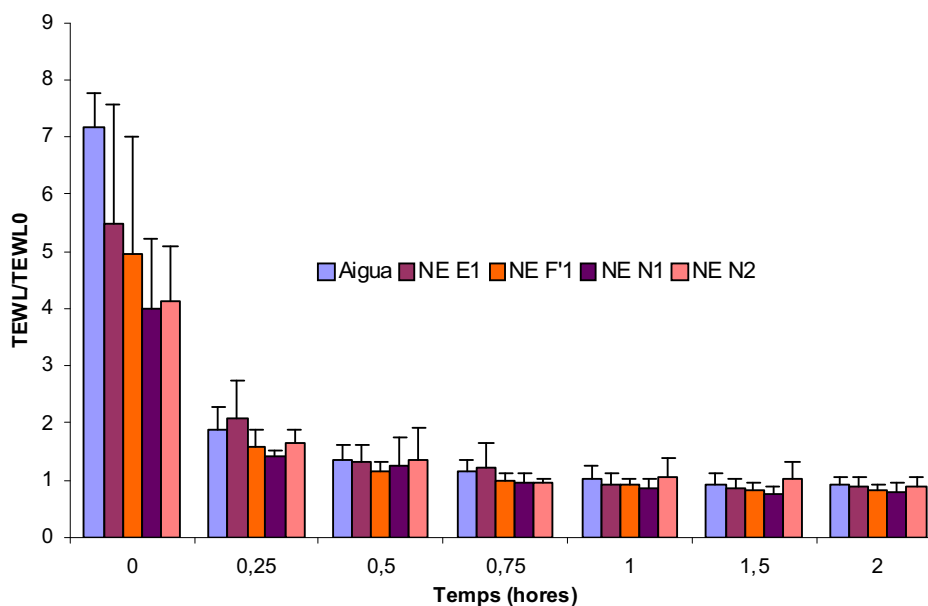
La possible toxicitat sobre la pell dels components de les nano-emulsions s'ha estudiat a partir de la realització d'assaigs *in vivo* mitjançant la determinació del paràmetre TEWL (pèrdua transepidermica d'aigua). Aquest paràmetre s'ha utilitzat en estudis anteriors com a mesura eficaç de la tolerància de formulacions administrades per via tòpica (Roskos, 1989; Pinnagoda, 1995; Kalia, 1996; Delgado-Charro, 1997; Lehmann, 2001; Levin, 2005).

Els assaigs *in vivo* per a estudiar si les nano-emulsions seleccionades alteren l'estructura de la capa còrnia de la pell s'han dut a terme amb 4 voluntaris d'edats compreses entre els 23 i els 28 anys. El procediment emprat es troba descrit al capítol 3.3.10. Les nano-emulsions seleccionades presenten una concentració d'aigua del 90% i pertanyen als sistemes aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80: Lutrol F 68 (3:1, p/p) i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p), Miglyol 812. D'aquest últim sistema s'han seleccionat dues formulacions que varien en la relació oli/tensioactiu. Com a control s'ha utilitzat aigua milliQ. La composició de cadascuna de les nano-emulsions estudiades es detalla a la taula XIV.

**Taula XIV:** Composició de les nano-emulsions seleccionades.

Nano-emulsió	Aigua (%)	Components Tensioactius		Components oliosos	
		Tensioactius	Concentració (%)	Oli	Concentració (%)
E1	90	Tween 80	9,00	Miglyol 812	1,0
F'1	90	Tween 80	6,75	Miglyol 812	1,0
		Lutrol F68	2,25		
N1	90	Cremophor EL	6,75	Miglyol 812	1,0
		Lutrol F68	2,25		
N2	90	Cremophor EL	6,00	Miglyol 812	2,0
		Lutrol F68	2,00		

A la figura 4.38 es mostren els resultats obtinguts. S'ha representat gràficament el valor de TEWL normalitzat (relació entre el valor de TEWL obtingut/ TEWL basal) respecte a un període de temps de 2 hores. Les determinacions es van realitzar abans (TEWL basal) i després d'aplicar les formulacions (TEWL obtingut). Així, les mesures obtingudes (TEWL obtingut) corresponen als valors de TEWL després de l'aplicació oclusiva de les formulacions durant 2 hores.



**Figura 4.38:** TEWL normalitzat en funció del temps per a les composicions seleccionades.

Com es pot observar en el moment de retirar per complet la formulació ( $t=0$ ) els valors de TEWL tant per les nano-emulsions com per la formulació control (aigua) són elevats però disminueixen ràpidament, recuperant-se els nivells basals en el transcurs d'1 hora aproximadament. El fet d'assolir de nou els valors inicials en un temps tan curt és indicatiu de la innocuïtat dels excipients utilitzats en les nano-emulsions ja que no alteren el paràmetre indicatiu de la funció barrera de la pell. L'obtenció de valors elevats a temps inicial i la ràpida disminució que s'observa podria suggerir que les nano-emulsions aplicades no ofereixen resistència a la difusió de l'aigua, com ja van postular Curdy et al. (2004), i indueixen una lleugera hidratació transitòria de la pell conseqüència de l'aplicació oclusiva de les formulacions (Delgado-Charro,1997). En el moment immediat després de retirar la formulació els valor de TEWL més alts, s'obtenen per la fórmula control i per les nano-emulsions que presenten Tween 80 com a

tensioactiu, per tant aquesta hidratació transitòria és més important que per a les composicions amb Cremophor EL.

En comparar aquests resultats amb altres estudis publicats (Delgado-Charro, 1997) on s'estudia l'efecte de microemulsions aplicades per via dèrmica s'han obtingut resultats similars. La recuperació dels nivells basals en aquest estudis es produïa com a màxim a les 3 hores després de l'aplicació.

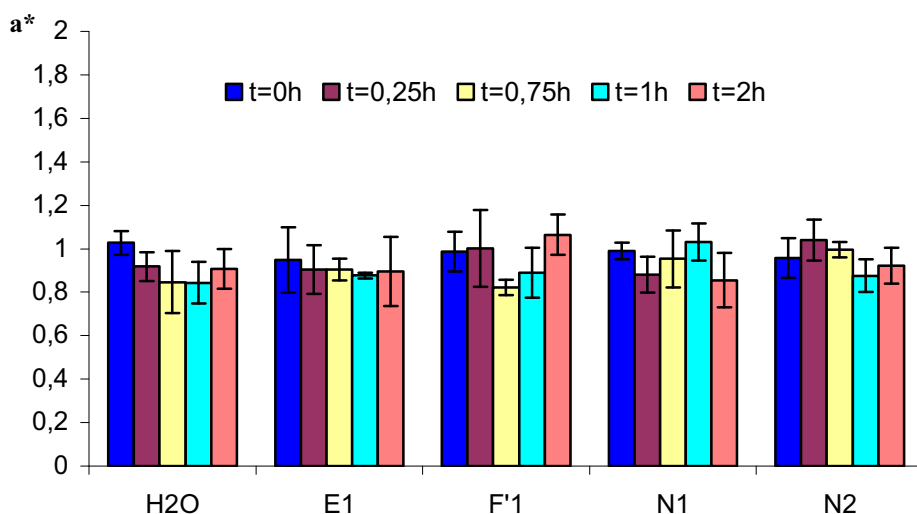
Uson et al. (Tesi doctoral, 2003) van determinar el paràmetre TEWL després de 2 hores d'aplicació oclusiva de nano-emulsions de tipus O/W i W/O dels sistemes aigua/ Cremophor EL: Cremophor WO7 (3:1, p/p)/ Miristat d'isopropil i aigua/ Cremophor EL: Cremophor WO7 (1:7, p/p)/ Miristat d'isopropil respectivament. En aquests estudis també es van obtenir valors de TEWL propers a la unitat (el TEWL mesurat correspon al valor inicial abans d'aplicar la formulació) en transcórrer 2-3 hores.

En el treball d'investigació de Sadurní et al. (Tesi doctoral, 2006) es va estudiar la idoneïtat de nano-emulsions O/W dels sistemes aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 i aigua/ Solutol HS-15/ Miglyol 812 com a vehicles d'administració d'un anestèsic local, per via tòpica (cutània o transdèrmica). En aquest cas els nivells basals es van recuperar als 45 minuts després d'haver retirat la formulació.

### ***Estudi de la possible irritació cutània de nano-emulsions determinant l'aparició d'eritema***

Paral·lelament a la determinació del paràmetre TEWL, s'han realitzat mesures amb un espectrofotòmetre (Konika Minolta model CM-2600d) per valorar si es produeix alguna alteració en la coloració de la pell de l'avantbraç com per exemple un envermelliment que podria ser indicatiu d'una lleugera irritació cutània. Les nano-emulsions es van aplicar sobre la pell de manera oclusiva, transcorregudes 2 hores es van retirar les formulacions i es va procedir a realitzar les determinacions. Els estudis es van dur a terme en 4 voluntaris sans entre els 23 i els 28 anys d'edat. S'ha utilitzat aigua MilliQ com a control. S'han determinat els paràmetres  $L^*$  (brillantor),  $a^*$  i  $b^*$  (cromaticitat). El paràmetre responsable de la coloració vermella i per tant de l'aparició d'eritema és  $a^*$  (veure capítol 3.3.10). Diversos autors (Serup, 1990; Benfelt, 1999; Wu, 2001; Fang, 2002, 2003) han posat de manifest l'existència d'una bona correlació entre la coordenada cromàtica  $a^*$  i l'aparició d'eritema com a conseqüència d'una reacció inflamatòria sobre la pell. A la figura 4.39 s'han representat els valors d' $a^*$  normalitzats

(relació entre les mesures determinades i els valors obtingut abans de l'aplicació de les formulacions) per a cada composició estudiada en funció del temps.



**Figura 4.39:** Valors de la coordenada cromàtica  $a^*$  per a la formulació control (H<sub>2</sub>O) i per a les nano-emulsions seleccionades en funció del temps.

Per a totes les composicions estudiades (H<sub>2</sub>O, E1, F'1, N1, N2) els valors d' $a^*$  romanen constants amb el temps, i es mantenen molt propers a la unitat (valor basal normalitzat). Els valors de la coordenada cromàtica  $a^*$  corresponents a nano-emulsions són molts similars als obtinguts amb la formulació control (aigua). Per tant, les nano-emulsions seleccionades no produeixen alteracions en el color de la pell que indiquin l'aparició d'eritema corroborant així, la innocüitat de les formulacions seleccionades que contenen concentracions de tensioactiu no iònic compreses entre el 7,5 i el 9% i de component oliós entre l'1 i el 2,5% dependent de la formulació. No s'han pogut establir diferències en relació al valor d' $a^*$  ni entre les nano-emulsions pertanyents al mateix sistema (composicions N1 i N2) ni entre les nano-emulsions amb la mateixa relació O/T seleccionades de sistemes diferents (E1, F'1 i N1).

#### 4.1.6.2. Permeació cutània *ex vivo*

S'han realitzat estudis de permeació cutània amb diferents nano-emulsions O/W amb una concentració d'aigua del 90% amb ketoprofèn solubilitzat fins a concentració màxima, amb la finalitat de potenciar tant com fos possible la permeabilitat del principi



actiu a través de la pell (Moser, 2001). D'acord amb els estudis de Moser et al., una de les estratègies per a potenciar al màxim la permeació d'un principi actiu a través de la pell és preparar les composicions a concentració de saturació de fàrmac per tal d'assolir una activitat termodinàmica en la formulació igual a la unitat. Així, es van seleccionar composicions del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 que variaven en la relació O/T amb la finalitat de conèixer si aquest paràmetre influeix en la permeació del fàrmac a través de la pell. Per altra banda, per a determinar l'efecte del tensioactiu i co-tensioactiu en la velocitat de permeació, es van dissenyar assaigs amb composicions amb una concentració O/T fixa corresponents a diferents sistemes aigua/ tensioactiu/Miglyol 812 i aigua/tensioactiu/co-tensioactiu/Miglyol 812. Concretament es van estudiar els següents sistemes:

1. Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 (E1).
2. Aigua/Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 (F'1).
3. Aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 (J2).
4. Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1 p/p)/ Miglyol 812 (N1 i N2).

Els resultats obtinguts es van comparar amb un preparat farmacèutic ja comercialitzat i d'aplicació per via tòpica que conté un 2,5% en pes de ketoprofèn. La quantificació dels resultats es va dur a terme per HPLC mitjançant un mètode prèviament validat.

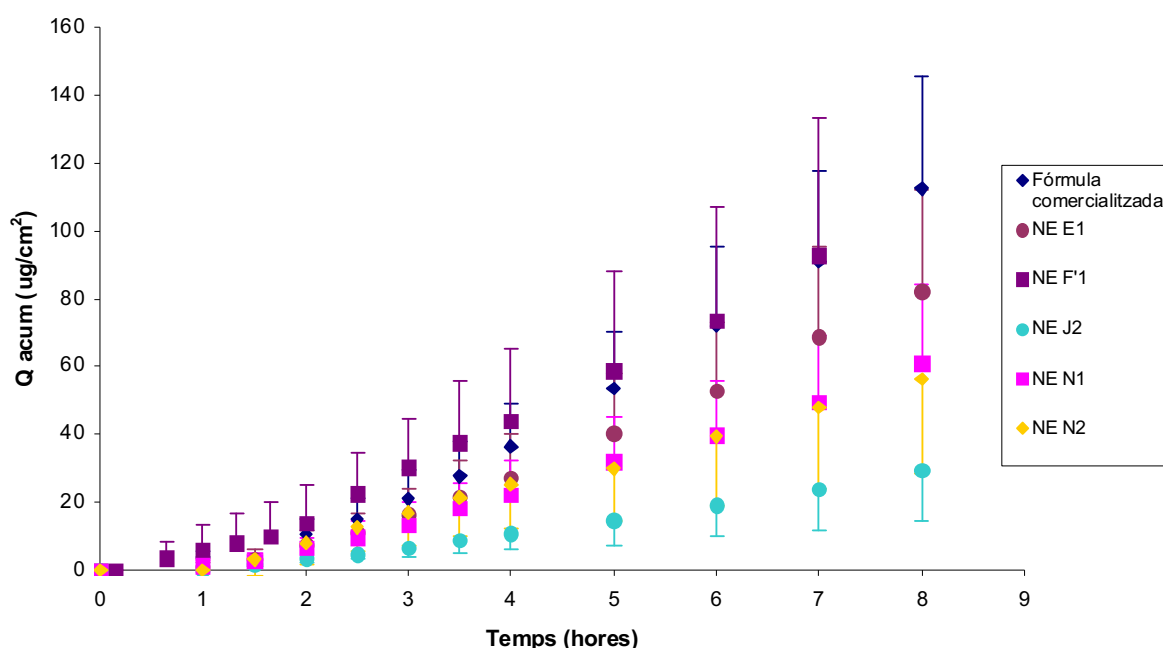
L'assaig de permeació cutània amb cel·les de difusió de Franz es va realitzar a 37°C durant un període de temps de 8 hores degut a que es podien detectar en temps relativament curts quantitats de principi actiu que havien difós a través de la pell. Per a realitzar els estudis de permeació les formulacions havien de ser estables a 37°C durant com a mínim 8 hores. Totes les nano-emulsions seleccionades complien les condicions de desenvolupament de l'assaig de difusió ja que no presentaven alteracions en el seu aspecte ni separació en fases durant 8 hores a 37°C. El procediment emprat per dur a terme aquests estudis es troba descrit al capítol 3.3.11. Les composicions seleccionades i la quantitat de fàrmac solubilitzat fins a saturació es detalla a la taula XV.

**Taula XV:** Nano-emulsions seleccionades per a l'estudi de permeació cutània *ex vivo*. La composició d'aquestes nano-emulsions es troba descrita a la taula XIV excepte la corresponent a la nano-emulsió J2 (90% d'aigua, 8% de Cremophor EL i 2% de Miglyol 812).

Nano-emulsió seleccionada	Concentració de Ketoprofèn a saturació (%)
E1	1,23
F'1	1,22
J2*	1,28
N1	1,59
N2	1,42

\* Els estudis de Sadurní (Sadurní, Tesi doctoral, 2006) van posar de manifest que la composició J2 corresponent al sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812 no comporta alteracions en el paràmetre TEWL ni l'aparició d'eritema en ser aplicada sobre la pell. Es va considerar rellevant estudiar aquesta composició per tal de poder establir comparacions amb el sistema aigua/Cremophor EL:Lutrol F68 (3:1, p/p)/Miglyol 812 i valorar la funció del tensioactiu Cremophor EL com a agent potenciador de la permeació cutània del ketoprofèn.

A la figura 4.40 es mostren els resultats corresponents als estudis de difusió. Es van utilitzar com a mínim 4 replicats per cada formulació i s'ha representat la mitjana i la desviació estàndard de les quantitats de ketoprofèn acumulades a la solució receptora en funció del temps per a les 6 composicions estudiades.



**Fig. 4.40:** Quantitats acumulades de ketoprofèn a la solució receptora en funció del temps per a les diferents formulacions estudiades.

Com es pot observar a la gràfica les quantitats inicials de principi actiu, expressades en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , presents en el compartiment receptor són baixes i es van incrementant progressivament amb el temps. Tot i els elevats valors de les desviacions estàndards, aquests són del mateix ordre que els obtinguts en estudis similars (Delgado-Charro, 1997). Els valors més elevats de fàrmac acumulat corresponen a la fórmula comercial i a la composició F'1 que conté Tween 80 com a tensioactiu i Lutrol F68 com a co-tensioactiu. Per a aquestes composicions les quantitats acumulades de ketoprofèn a la solució receptora en transcórrer 7 hores han sigut de  $91,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  i de  $92,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  respectivament. S'ha de tenir en compte que la fórmula comercialitzada és un gel de carbòmer que conté etanol, el qual incrementaria notablement la permeació cutània del ketoprofèn (Goto, 1993; Okaba, 1994; Cho, 1998; Huang, 2007), mentre que l'efecte dels tensioactius no iònics com a potenciadors del pas de fàrmacs a través de la pell, és molt irregular i depèn principalment del model de membrana seleccionat (Williams, 2004).

En comparar les composicions E1 i F'1 que es diferencien únicament en la presència de co-tensioactiu (Lutrol F68 en la formulació F'1), la quantitat de ketoprofèn que ha permeat a través de la pell en funció del temps és superior per a la nano-emulsió que conté el co-tensioactiu polimèric. Aquest fet suggereix que el Lutrol F68 podria actuar com un agent potenciador de la permeació (Cappel, 1991). Es van obtenir resultats similars en comparar les composicions J2 i N2 preparades amb Cremophor EL, ja que per a la formulació N2 que conté el co-tensioactiu la quantitat de fàrmac acumulada en 8 hores a la solució receptora va ser de  $56,35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  enfront els  $29,54 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  corresponents a la nano-emulsió J2 (sense Lutrol F68). Per a aquesta última es van obtenir els valors més baixos de quantitat de fàrmac permeat.

Per altra banda, les composicions preparades amb Tween 80 presenten quantitats de ketoprofèn acumulades superiors a les obtingudes amb les formulacions amb Cremophor EL com a tensioactiu (veure composicions F'1 i N1). Així, a les 7 hores d'assaig, la quantitat de fàrmac que ha permeat a través de la pell per a la nano-emulsió F'1 (amb Tween 80) ha sigut de  $92,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  mentre que per a la composició N1 (amb Cremophor EL) la quantitat acumulada correspon a  $60,98 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Ambdues formulacions contenen Lutrol F68 per tant les diferències s'atribuirien a un efecte inductor de la permeació per part del Tween 80.

Cappel i Kreuter (1991) van estudiar l'efecte dels polisorbats en l'alliberació transdèrmica de substàncies hidròfiles i lipòfiles i van observar que el Tween 80

incrementava lleugerament la permeabilitat del metanol mentre que disminuïa la de l'octanol en emprar-se a concentracions elevades (per sobre de la c.m.c). Aquest efecte el van atribuir a una disminució de d'octanol lliure com a conseqüència de la solubilització micel·lar.

Shahi i Zatz (1979) van observar que el Tween 80 augmentava la velocitat de permeació de la hidrocortisona a través de la pell de ratolí en mescles d'isopropanol i aigua. Sarpotdar i Zatz (1986) van obtenir resultats similars en la permeació de lidocaïna vehiculitzada en mescles de propilenglicol i Tween 80. Estudis més recents també han posat de manifest un efecte potenciador de la permeació de diazepam i lorazepam en pell de rata induït pel Tween 80 (Shokri, 2001; Nokhodchi, 2003).

Hoeller et al. (2009) van estudiar la permeació a través de la pell de l'abdomen de porc de l'acetat de fludrocortisona i el pivalat de flumetasona solubilitzats en nano-emulsions que contenen lecitina i Tween 80 com a tensioactius. En ambdós casos es va observar un increment de la velocitat de permeació atribuït al Tween 80 en relació a la formulació control.

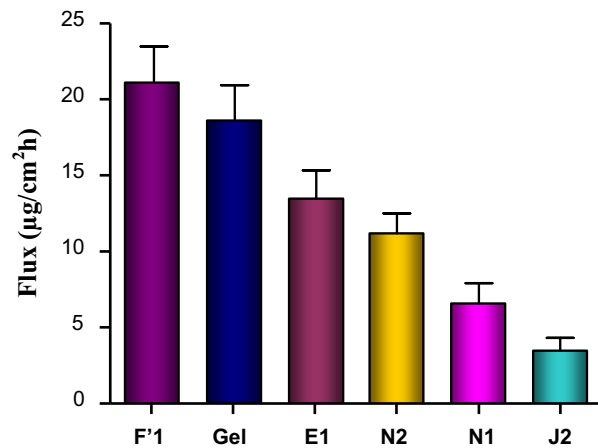
En canvi, en els els estudis de Legen et al (2006), la utilització de Cremophor EL no va suposar cap modificació en la permeabilitat de l'amoxicil·lina a través de l'epiteli intestinal de rata.

L'efecte del Tween 80 com a potenciador de la permeació podria explicar-se a partir de dos mecanismes en els que intervenen tant els dominis moleculars hidròfobs com els hidròfils del tensioactiu (Nokhodchi, 2003; Hoeller, 2009). En primer lloc, les molècules del tensioactiu podrien penetrar en les regions intercel·lulars de l'estrat corni, provocant modificacions en l'empaquetament dels lípids que constitueixen la bicapa lipídica. Aquest efecte comportaria un increment de la fluïdesa de la bicapa, seguit d'un procés de solubilització i extracció de components lipídics que afavoriria notablement el procés de permeació. Per altra banda el Tween 80, en penetrar en la matriu intracel·lular, podria interaccionar amb els filaments de queratina i en unir-se a aquestes proteïnes, modificar l'estructura dels corneòcits afavorint novament els processos de difusió de fàrmacs (Nokhodchi, 2003; Hoeller, 2009).

Finalment, en les nano-emulsions N1 i N2 del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 preparades amb diferents relacions O/T no s'han observat diferències importants en la quantitat de ketoprofèn acumulada entre ambdues composicions, essent les quantitats permeades en 8 hores d'assaig de 60,98 i 56,35  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  per a les composicions N1 i N2 respectivament. En relació a la permeació, no es

van considerar importants les diferències en el diàmetre de gota entre les nano-emulsions estudiades ja que totes les composicions presentaven una mida de gota inferior als 100 nm.

Malgrat obtenir-se diferències en la quantitat de ketoprofèn acumulada en funció del temps entre les diverses formulacions, s'ha de tenir present que la concentració de fàrmac solubilitzat no va ser la mateixa per a totes les composicions. Per tant, és important conèixer els paràmetres de permeació: flux i temps de latència. Aquests paràmetres s'han calculat a partir de la primera llei de difusió de Fick, aplicant el model de dosi infinita explicat anteriorment al capítol 3.3.10. L'anàlisi estadística emprada va ser l'ANOVA univariant aplicant el test de comparació múltiple de Newman-Keuls. Els resultats es poden observar a la Fig. 4.41 i a la taula XVI.



**Fig. 4.41:** Velocitat de permeació del ketoprofèn solubilitzat en nano-emulsions O/W seleccionades i en la formulació comercialitzada.

**Taula XVI:** Velocitat de permeació i temps de latència del ketoprofèn solubilitzat en nano-emulsions i en un preparat farmacèutic comercialitzat.

Composició	Paràmetres de permeació	
	Temps de latència (h)	J (µg/ cm <sup>2</sup> h) <sup>†</sup>
Fórmula comercialitzada	2,07 ± 0,43	18,621 ± 2,30
F'1	1,62 ± 0,86	21,12 ± 2,38
E1	2,09 ± 0,50	13,48 ± 1,87
N1	0,73 ± 0,30	6,59 ± 1,35
N2	1,67 ± 0,36	11,21 ± 1,31
J2	1,35 ± 0,37	3,48 ± 0,84

<sup>†</sup>J: Velocitat de permeació

La velocitat de permeació del ketoprofèn a través de la pell ha sigut de 18,62  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  per al preparat farmacèutic comercialitzat; 21,12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  per a la nano-emulsió F'1; 13,48, 11,21 i 6,59  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  per a les nano-emulsions E1, N2 i N1 respectivament i finalment 3,48  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$  per a la composició J2. Els temps de latència en totes les formulacions estudiades fluctuen entre 1 i 2,5 hores aproximadament. Aquests valors de flux de permeació i de temps de latència són de l'ordre dels obtinguts en la literatura amb formulacions similars (Rhee, 2001; Paolino, 2002).

Si es comparen les nano-emulsions N1 i F'1 que presenten la mateixa concentració d'aigua i la mateixa relació oli/ tensioactiu, diferenciant-se només en el tensioactiu utilitzat, es pot observar que el valor de flux és més elevat per a la composició amb Tween 80 (F'1) que per a la composició amb Cremophor EL (N1). Les diferències en la velocitat de permeació entre les nano-emulsions N1 i F'1 són estadísticament significatives amb una  $p < 0,0001$ . Aquest resultat corrobora l'efecte del Tween 80 com a potenciador de la permeació del ketoprofèn a través de la pell que ja s'havia observat a la Fig. 4.40.

En relació a la influència del co-tensioactiu (Lutrol F68) present en les nano-emulsions N1, N2 i F'1 s'observa, en comparar N2 amb J2 i F'1 amb E1 (N2 i E1 presenten la mateixa composició que J2 i F'1 respectivament però no contenen co-tensioactiu), que els valors de flux són més elevats que les formulacions contenen Lutrol F68. Es van obtenir novament diferències estadísticament significatives entre E1 i F'1 ( $p < 0,01$ ) i entre N2 i J2 ( $p < 0,05$ ), per tant el Lutrol F68 també actuaria incrementant la permeació del ketoprofèn però en menor grau que el Tween 80. Si s'observen les formulacions E1 i N1 preparades amb Tween 80 i amb Cremophor EL/Lutrol F68 respectivament, la velocitat de permeació és superior per a la composició E1 tot i que la concentració de fàrmac és més elevada en la nano-emulsió N1 (1,59 % en pes enfront 1,23%). Les diferències també han sigut estadísticament significatives amb una  $p < 0,01$ .

No s'han detectat variacions significatives en els valors de flux obtingut en augmentar la concentració oli/tensioactiu en el sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 (nano-emulsions N1 i N2).

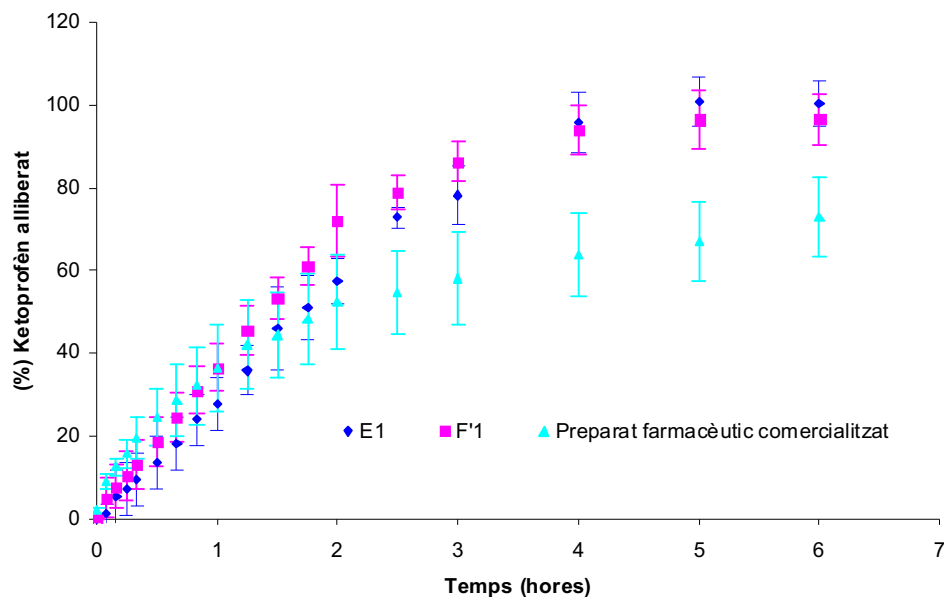
Les velocitats de permeació més elevades s'han obtingut amb la nano-emulsió F'1 (21,12  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) i amb el gel comercialitzat (18,62  $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ). Les diferències no van ser estadísticament significatives. Malgrat que la concentració de principi actiu és molt superior en la formulació comercialitzada (2,5% en pes enfront 1,22%) s'han aconseguit

paràmetres de permeació molts similars en ambdues composicions. En la nano-emulsió F'1 podria produir-se un sinergisme entre el Lutrol F68 i el Tween 80 que es manifestaria amb un increment important de la permeació del Ketoprofèn a través de la pell.

#### 4.1.6.3. Estudis de cessió del ketoprofèn

Després d'estudiar la permeació cutània del ketoprofèn incorporat en diferents composicions a través de la pell d'orella de porc i observar diferències estadísticament significatives en la velocitat de permeació del fàrmac entre algunes de les nano-emulsions, es van realitzar estudis de cessió del ketoprofèn. Aquest assaigs de cessió es van realitzar per tal de corroborar que el fàrmac podia difondre fàcilment des de les gotes de la nano-emulsió cap a una solució receptora a pH fisiològic (pH 7,4). Com a nano-emulsions model es van seleccionar les composicions que contenien Tween com a tensioactiu, ja que s'havien observat diferències importants en els paràmetres de permeació entre aquestes composicions. Per altra banda, tenint en consideració les diferències estructurals entre les nano-emulsions i la fórmula comercialitzada (hidrogel de ketoprofèn) no es van detectar diferències apreciables en els paràmetres de permeació en comparar l'hidrogel amb la nano-emulsió F'1 (veure capítol 4.1.6.2).

Així, s'ha estudiat l'alliberació del ketoprofèn des de les formulacions E1 i F'1 (composició detallada a la taula XIV) preparades a concentració màxima de fàrmac (1,34 i 1,29% respectivament) i des d'una fórmula comercialitzada que conté un 2,5% en pes de principi actiu. Per a aquestes concentracions es compleixen les condicions *sink* en la solució receptora (solució reguladora de fosfats a pH 7,4). La composició d'aquesta solució es troba detallada al capítol 3.1.5.1. Els assaigs s'han dut a terme amb 5 replicats per a cada formulació, a una temperatura de 37°C i extraient-se al·líquotes durant un temps de 6 hores. Les condicions de l'assaig d'alliberació es descriuen en el capítol 3.3.9. La quantificació de les mostres s'ha realitzat per HPLC. A la figura 4.42 s'han representat els valors promig de ketoprofèn alliberat expressats en percentatge en funció del temps i la desviació estàndard per a cada composició estudiada.



**Fig. 4.42:** Perfils d'alliberació del ketoprofèn en funció del temps corresponents a les composicions E1, F'1 i a una formulació comercialitzada.

D'acord amb els resultats que es mostren a la Fig. 4.42, el ketoprofèn difon més lentament cap a la solució receptora en la formulació comercial que en les nano-emulsions estudiades, alliberant-se a les 6 hores un 70% del ketoprofèn incorporat mentre que en les nano-emulsions a les 4 hores ja s'ha alliberat pràcticament la totalitat del fàrmac solubilitzat. Els resultats obtinguts són els esperats tenint en consideració que la concentració de ketoprofèn en la formulació comercialitzada és molt superior a la de les nano-emulsions (2,5% enfront 1,34 i 1,29% en pes de ketoprofèn solubilitzat). En relació a les dues nano-emulsions O/W, pràcticament no s'observen diferències entre ambdues composicions. En transcórrer 3 hores s'ha alliberat un 75% de ketoprofèn de la nano-emulsió E1 mentre que el percentatge de ketoprofèn present a la solució receptora per a la formulació F'1 és del 85% en el mateix període de temps.

S'han aplicat els models de cessió d'ordre zero, primer ordre i Higuchi per a cadascun dels replicats. A la taula XVII es detallen els valors promigs de les constants cinètiques d'alliberació i del coeficient de correlació al quadrat ( $r^2$ ) per a cada composició estudiada.



**Taula XVII:** Aplicació de l'equació matemàtica de diferents models cinètics als perfils d'alliberació obtinguts per a cada formulació estudiada.

Models de cessió	Fórmula E1	Fórmula F'1	Formulació comercialitzada	
Ordre zero	$K_0$ (%·h <sup>-1</sup> )	27,846±2,889	33,489±2,136	20,097±5,029
	$r^2$	0,9983	0,9977	0,9673
Primer ordre	$K_1$ (h <sup>-1</sup> )	1,285±0,521	1,400±0,404	0,619±0,310
	$r^2$	0,7470	0,8710	0,8270
Higuchi	$K_H$ (%·h <sup>-1/2</sup> )	55,893±5,601	56,985±3,742	32,668±5,059
	$r^2$	0,9640	0,9726	0,9967

Els perfils d'alliberació de les formulacions E1 i F'1, tenint en compte el valor dels coeficients de correlació al quadrat, correspondrien a un model cinètic d'ordre zero, obtenint-se un valor lleugerament més elevat de la  $k_0$  per a la composició F'1. En el cas de la formulació comercialitzada, en tractar-se d'un gel, el model que millor s'ajusta al perfil d'alliberació obtingut és el de Higuchi. Aquests resultats concorden amb els estudis realitzats per diferents autors amb formulacions similars (Podlogar, 2005; Tettley Amlalo, Tesi doctoral, 2005).

#### 4.1.7. Resum de la formació i caracterització de nano-emulsions

- **Comportament fàsic:**

En tots els sistemes estudiats s'ha obtingut una regió I de composicions líquides, transparents i isòtropes.

En la majoria dels sistemes amb Tween 80 aquesta regió es forma fins assolir una relació O/T màxima de 15/85. En els sistemes amb Cremophor WO7 i Epikuron 170 com a tensioactiu aquesta regió es va obtenir per a relacions O/T fins la 40/60.

En relació als sistemes amb Cremophor EL, la regió I és significativament més gran que quan s'empra Tween 80 com a tensioactiu, formant-se composicions líquides i isòtropes com a mínim fins la relació O/T 25/75. Per a alguns sistemes aquestes composicions es

van obtenir fins i tot per a relacions O/T de 35/65 i per al sistema amb Epikuron 170 fins la relació O/T 60/40.

- **Formació de nano-emulsions:**

S'han identificat nano-emulsions amb un elevat contingut d'aigua (90%) i components utilitzats per a la preparació de nanopartícules en sistemes ternaris del tipus aigua/tensioactiu no iònic/component oliós i sistemes pseudoternaris constituïts per aigua/tensioactiu/ co-tensioactiu/ component oliós. Aquestes nano-emulsions O/W presenten una mida de gota compresa entre 13 i 42 nm i una baixa polidispersitat que les fa apropiades per a l'elaboració de nanopartícules polimèriques.

Els mètodes de preparació que han donat lloc a les nano-emulsions amb una mida de gota més petita (inferior a 70 nm) i un índex de polidispersitat més baix han consistit en addicionar petites quantitats d'aigua a les mescles O/T a una temperatura superior o igual a 50°C.

La utilització de mètodes d'alta energia en els quals predominen els fenòmens de trencament i col·lisió en la formació de les gotes de nano-emulsió donen lloc a composicions amb un diàmetre de gota i polidispersitat superiors.

Les composicions corresponents als sistemes amb Lutrol F127 com a co-tensioactiu van presentar índex de polidispersitat superiors a 0,200 i per tant no es van seleccionar per a la posterior formació de nanopartícules.

Les composicions del sistema aigua/Tween 80/Cremophor WO7/Miglyol 812 malgrat presentar una mida de gota inferior a 70 nm i una  $P < 0,100$  no es van utilitzar en la preparació de nanopartícules degut a la seva baixa estabilitat cinètica.

La combinació d'un mètode de baixa energia i un mètode d'alta energia (ultrasons) millora notablement l'aspecte macroscòpic i la polidispersitat de les composicions preparades amb Epikuron 170 com a co-tensioactiu.

Les composicions preparades amb Tween 80 presenten una mida de gota més petita que aquelles que contenen Cremophor EL com a component tensioactiu degut a les diferències en la seva estructura química, ja que el Cremophor EL té un pes molecular força superior al del Tween 80 (2560 enfront 1310 g/mol).

La presència de co-tensioactiu (Lutrol F68) en les composicions actua incrementant notablement el diàmetre de les gotes de les nano-emulsions degut a la disposició que adopta aquest tensioactiu polimèric en la interfície oli/aigua.

La mida de gota de les nano-emulsions del sistema aigua/Cremophor EL/Lutrol F68/Miglyol 812 disminueix considerablement en augmentar la concentració d'aigua, reduint-se pràcticament a la meitat quan es comparen concentracions d'un 85% i un 95% en pes d'aigua. Aquest fet s'explicaria per un menor nombre de gotes i una major formació de micel·les com a conseqüència de la difusió de molècules de Lutrol F 68 des de les gotes cap a la fase externa (Alexandritis, 1995; Rapoport, 1999; Li, 2008).

La disminució del diàmetre de les gotes es produeix conjuntament amb una reducció de l'índex de polidispersitat.

El diàmetre de gota augmenta amb la concentració oli/tensioactiu formant-se cada vegada un menor nombre de gotes i de mida més gran. La polidispersitat del sistema també tendeix a incrementar-se amb la relació oli/tensioactiu en els sistemes sense co-tensioactiu polimèric.

Les mescles amb un diàmetre més petit es van obtenir en el sistema amb Tween 80 com a tensioactiu (8,91 nm per a la solució micel·lar i 15, 61 nm de diàmetre per a la nano-emulsió amb una relació O/T de 15/85).

Els dissenys factorials han posat de manifest la influència de les diferents variables de composició (concentració de tensioactiu, concentració de co-tensioactiu Lutrol F68 i concentració d'aigua) així com també de les seves possibles interaccions en el diàmetre de gota de les nano-emulsions i en l'índex de polidispersitat determinats per DLS.

S'ha detectat l'existència d'una dependència lineal entre la concentració de tensioactiu i el diàmetre de gota. Així, l'increment de la concentració de tensioactiu comporta una disminució de la mida de gota.

Pel que fa al tipus de tensioactiu, les composicions amb Tween 80 presenten una mida de gota més petita que les preparades amb Cremophor EL però en canvi els valors dels índex de polidispersitat obtinguts són superiors amb Tween 80.

També s'ha observat una dependència pràcticament lineal entre la concentració de Lutrol F 68 i el diàmetre de gota, a major proporció de co-tensioactiu s'obtenen nano-emulsions amb una mida de gota superior. La interacció (concentració tensioactiu)\*

(concentració Lutrol F68) té un efecte negatiu estadísticament significatiu en el diàmetre de gota, indicant que la mida obtinguda dependrà d'ambdós factors conjuntament.

En relació a la polidispersitat del sistema, aquesta dependrà del tipus de tensioactiu emprat, concentració de Lutrol i concentració de tensioactiu. Tot i això els valors obtinguts estan íntimament relacionats amb la composició del sistema, existint unes concentracions de tensioactiu i co-tensioactiu òptimes.

Per a les composicions del sistema aigua/Cremophor EL/ LutrolF68/ Miglyol 812, la concentració de tensioactiu i aigua tenen un efecte negatiu en el diàmetre de gota (disminució del Z-Average) mentre que la proporció de Lutrol F 68 té una influència positiva que es manifesta amb un increment de la mida de gota. Per altra banda, el resultat de la interacció (% Cremophor EL)\* (% aigua) té una influència estadísticament significativa en la mida de gota, indicant que hi ha una concentració òptima d'aigua dependent de la relació O/T per a la qual s'obtenen els diàmetres de gota més petits. Pel que fa a la polidispersitat únicament s'ha observat que l'increment de la concentració d'aigua comporta una reducció d'aquesta.

- **Estabilitat de les nano-emulsions:**

Les nano-emulsions O/W obtingudes presenten una elevada estabilitat cinètica i no experimenten separació de fases en el període de temps estudiat (140 dies).

En els sistemes amb Tween 80, la incorporació del co-tensioactiu polimèric (Lutrol F68) no implica una millora de l'estabilitat. En les composicions amb Lutrol F68 es produeix un creixement molt pronunciat del diàmetre de gota (de 23 a 39 nm per a la composició amb una relació Tween 80/ Lutrol F68 de 3/1 i de 16 a 25 nm en la nano-emulsió preparada amb una relació Tween 80/ Lutrol F68 de 5/1) en un període de temps de 48 hores indicant una baixa estabilitat cinètica a curt termini.

S'han obtingut nano-emulsions amb una estabilitat cinètica més elevada quan s'ha emprat Cremophor EL com a component tensioactiu. La nano-emulsió més estable des del punt de vista cinètic correspon al sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 produint-se un increment aproximat del diàmetre promig de les gotes de 10 nm en 4 mesos.

En el sistema aigua/ Cremophor EL:Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 les nano-emulsions amb una mida de gota més petita i amb major estabilitat cinètica corresponen a les composicions preparades amb un 95% en pes d'aigua. En aquest sistema s'ha aconseguit la formació de nano-emulsions amb una elevada estabilitat cinètica, mantenint-se el diàmetre de gota pràcticament constant durant un període de temps de 40 dies.

La nano-emulsió amb una mida de gota més petita s'ha obtingut amb la relació O/T de 5/95, essent pràcticament de l'ordre de la solució micel·lar.

Les nano-emulsions amb menor estabilitat cinètica es van formar amb les relacions O/T de 20/80 i de 25/75 per a la concentració d'aigua de 90% en pes.

El mecanisme principal d'instabilitat per a nano-emulsions del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812, aigua/ Tween 80:Lutrol F68(5:1, p/p)/ Miglyol 812 i aigua /Tween 80/ Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812 sembla ser la maduració d'Ostwald, mentre que per a aquelles que corresponen a les composicions aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812, aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p) Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68(3:1, p/p)/ Miglyol 812 ambdós processos, maduració d'Ostwald i coalescència, poden ser la causa d'instabilitat.

- **Incorporació de ketoprofèn en nano-emulsions O/W:**

S'ha aconseguit incrementar notablement la solubilitat del ketoprofèn en nano-emulsions amb una elevada concentració d'aigua. Les concentracions màximes de ketoprofèn solubilitzades en aquestes composicions es troben compreses entre 1,22% i 1,67% en pes.

S'han solubilitzat concentracions de fàrmac superiors en aquelles composicions preparades amb Cremophor EL com a component tensioactiu. Les nano-emulsions corresponents als sistemes amb Tween 80 presenten una menor capacitat de solubilització.

El diàmetre de gota de les nano-emulsions disminueix en solubilitzar el principi actiu suggerint que el ketoprofèn es situa a la interfície de les gotes enlloc d'estar solubilitzat al seu interior. Aquest efecte s'incrementa en presència del tensioactiu polimèric (Lutrol F68).

En les solucions micel·lars el diàmetre de les micel·les augmenta en solubilitzar-se el ketoprofèn.

En les nano-emulsions corresponents als sistemes ternaris aigua/Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/Cremophor EL/ Miglyol 812 el diàmetre de gota experimenta un descens màxim quan es solubilitzen concentracions de ketoprofèn del 0,8% en pes.

En el sistema **aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812** s'ha aconseguit solubilitzar un màxim d'1,59% en pes de ketoprofèn en composicions amb una concentració d'aigua del 90% i un 0,66% en pes de ketoprofèn en nano-emulsions preparades amb un 95% d'aigua.

S'ha aconseguit incrementar la solubilitat del fàrmac en relació a les solucions micel·lars en les quals s'ha solubilitzat una concentració màxima de ketoprofèn d'1,13% i de 0,52% en pes en composicions preparades amb una concentració d'aigua de 90% i de 95% respectivament.

La solubilització del ketoprofèn disminueix en incrementar-se la concentració O/T a partir d'una relació òptima que és la 10/90.

S'ha determinat una concentració òptima O/T de 10/90 per a la solubilització de ketoprofèn en el sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812.

La incorporació de ketoprofèn en les nano-emulsions afavoreix l'estabilitat del sistema. Aquest fet es pot atribuir a la localització del fàrmac a nivell interfacial ja que actuaria augmentant el radi de curvatura de les gotes de la fase interna i per tant, disminuiria el diàmetre d'aquestes.

El diàmetre de gota de les nano-emulsions amb un 1% en pes de ketoprofèn solubilitzat roman pràcticament constant durant com a mínim un període de temps d'1 mes.

Les nano-emulsions amb una mida de gota més petita (10 nm) es van obtenir amb la relació O/T de 10/90 en el sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812.

- **Estudis d'alliberació i permeació cutània del ketoprofèn:**

Els estudis preliminars sense principi actiu han posat de manifest que les nano-emulsions estudiades no alteren la pèrdua transepidèrmica d'aigua en ser aplicades sobre la pell, i que són ben tolerades.

Les nano-emulsions estudiades no produeixen alteracions en el color de la pell que indiquin l'aparició d'eritema malgrat les concentracions de tensioactiu emprades. Ambdós estudis (TEWL i determinació de la cromaticitat) corroboren la preservació de la funció barrera de la pell després d'aplicar les formulacions.

Les quantitats més elevades de ketoprofèn permeat durant 7 hores es van obtenir en la nano-emulsió preparada amb Tween 80 i Lutrol F68 ( $92,67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) i en la fórmula comercialitzada ( $91,14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ).

Es van aconseguir nivells de ketoprofèn acumulat en la solució receptora similars als obtinguts en un gel comercialitzat que conté concentracions elevades d'etanol.

Els tensioactius Tween 80 i Lutrol F68 podrien afavorir la permeació de ketoprofèn a través de la pell ja que s'han obtingut quantitats de fàrmac acumulades més elevades en les composicions que els contenen.

El Tween 80 i el Lutrol F68 podrien presentar un efecte sinèrgic com agents potenciadors de la permeació de ketoprofèn.

Les velocitats de permeació més elevades s'han obtingut amb la nano-emulsió F'1 ( $21,12 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ) i amb el gel comercialitzat ( $18,62 \mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ). Malgrat la variabilitat en la concentració de principi actiu (1,22% enfront 2,5% respectivament) les diferències no van ser estadísticament significatives.

S'ha aconseguit alliberar la totalitat del ketoprofèn incorporat en les nano-emulsions en transcórrer un temps de 4 hores. No es van observar diferències importants en els perfils de les corbes d'alliberació de les nano-emulsions estudiades.

En el gel comercialitzat es va alliberar únicament fins un 70% del ketoprofèn solubilitzat en un període de temps de 6 hores.

El model cinètic que millor s'ajusta a l'alliberació del ketoprofèn en nano-emulsions correspon a un ordre zero mentre que el gel comercialitzat segueix una cinètica de Higuchi.

## 4.2. NANOPARTÍCULES A PARTIR DE NANO-EMULSIONS

Les nanopartícules polimèriques per a l'administració de fàrmacs s'obtenen per diverses metodologies (Pinto-Reis, 2006; Fattal, 2007; Anton, 2008; Vauthier, 2009; Mora-Huertas, 2010). Els processos de polimerització interfacial, policondensació interfacial i formació d'emulsions (Vauthier, 2003; Anton, 2008; Wu, 2009) tenen gran interès en la preparació de nanopartícules ja que en produir-se la polimerització "in situ" permeten l'obtenció de sistemes amb un petit diàmetre i una superfície funcionalitzada adequats per a la vectorització selectiva de principis actius.

Un dels principals interessos de l'obtenció de nanopartícules a partir de nano-emulsions consisteix en el fet que la polimerització es pot produir a les gotes de la nano-emulsió sense que aquestes perdin la seva identitat (El-Asser, 1997). El procés de polimerització pot tenir lloc tant a l'interior de les gotes de la nano-emulsió, de manera que cadascuna de les gotes es comportaria com un nanoreactor (Antonietti, 2002; Landfester, 2003), com a la interfície oli/aigua (Al Khoury-Fallouh, 1986; Vauthier, 2003), depenent del monòmer i del mecanisme de polimerització implicat (veure capítol 1.2.2.2). La utilització de nano-emulsions de tipus oli en aigua per a la formació de nanopartícules és d'especial interès ja que permet vehiculitzar principis actius lipòfils amb una baixa solubilitat en aigua amb una elevada eficiència d'encapsulació. Les nanopartícules així obtingudes, en funció dels excipients utilitzats es podrien administrar ja sigui per via oral, parenteral o tòpica .

Per a la preparació de nanopartícules a partir de nano-emulsions, en aquest treball d'investigació s'han seleccionat nano-emulsions amb un elevat contingut d'aigua (90% en pes) i amb la mínima concentració de tensioactiu no iònic i la màxima concentració de component oliós que presentaven un diàmetre de gota inferior a 50 nm i un baix índex de polidispersitat. Les dispersions han de mantenir-se estables a 25°C (sense produir-se canvis importants dels paràmetres morfomètrics) durant un mínim de temps de 24 hores. En alguns sistemes es van estudiar també altres composicions amb relacions O/T inferiors. Tenint en consideració els estudis de formació, caracterització i estabilitat de nano-emulsions realitzats en aquest treball d'investigació i exposats als apartats anteriors, s'han seleccionat nano-emulsions corresponents als següents sistemes:

- Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812
- Aigua/Tween 80: Lutrol F68 (3:1; p/p)/ Miglyol 812



- Aigua/Tween 80: Lutrol F68 (5:1; p/p)/ Miglyol 812
- Aigua/ Cremophor EL / Miglyol 812
- Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812
- Aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812

#### **4.2.1. Estudis preliminars : Nanopartícules de poli-alquilcianoacrilat (PACA)**

Inicialment es van seleccionar com a monòmers els alquilcianoacrilats (butilcianoacrilat (BCA) i isobutilcianoacrilat (*i*BCA)) ja que amb aquests components s'ha descrit la formació de nanopartícules biodegradables i biocompatibles adequades per a la seva utilització com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs (Watnasirichaikul, 2000; Soppimath, 2001; Vauthier, 2003; Sullivan, 2004). La formació de nanopartícules de poli-alquilcianoacrilat (PACA) per polimerització interfacial ha sigut àmpliament estudiada en microemulsions i nano-emulsions W/O en els darrers anys (Gasco, 1986; Lambert, 2000; Pitaksuteepon, 2002; Watnasirichaikul, 2002; Krauel, 2005; Liang, 2008; Graf, 2008) però en canvi s'han trobat relativament pocs treball en els quals s'hagin emprat dispersions O/W com a medi de polimerització (Huang, 2007; Wu, 2009; Graf, 2008, 2009). En aquests últims, les nano-emulsions O/W prèvies a la polimerització es van obtenir per mètodes d'alta energia.

Els estudis es van iniciar utilitzant *i*BCA com a monòmer, a una concentració de 10 µl/ml de nano-emulsió (Gallardo, 1993; Peracchia, 1997; Lambert, 2000). Dels sistemes anteriorment mencionats, es van seleccionar aquells que contenien Lutrol F68 com a co-tensioactiu, ja que s'ha descrit la formació de nanopartícules de PACA biodegradables i biocompatibles amb aquest tensioactiu polimèric (Fresta, 1996; Fontana, 1997; Hans, 2002). Així, les nano-emulsions O/W seleccionades per a la preparació de nanopartícules van ser:

- F'1: 90% en pes d'aigua; relació O/T: 10/90; sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812
- H'1: 90% en pes d'aigua; relació O/T: 10/90; sistema aigua/ Tween 80: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812
- N2: 90% en pes d'aigua; relació O/T: 20/80; sistema aigua/Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812

- M2: 90% en pes d'aigua; relació O/T: 20/80; sistema aigua/Cremophor EL: Lutrol F68 (5:1, p/p)/ Miglyol 812.

Les nano-emulsions es van preparar a 70°C a partir de l'addició lenta i successiva de petites quantitats d'aigua a la mescla oli/tensioactiu/co-tensioactiu. Amb cada nova addició del component aquós, la barreja resultant es va homogeneïtzar mitjançant agitació mecànica (veure mètode E, capítol 4.1.3). Les nano-emulsions un cop preparades es van deixar refredar a 25°C en un bany termostat. Per a cadascuna de les composicions es va determinar el diàmetre de gota, l'índex de polidispersitat i el valor del pH (taula XVIII). Les nanopartícules es van elaborar addicionant el monòmer (*i*BCA) de manera lenta i continuada sobre la nano-emulsió en agitació magnètica (veure apartat 3.3.3.1). Inmediatament després d'incorporar el monòmer es va observar com disminuïa la transparència i les composicions adquirien un aspecte lletós indicant que s'havia produït la polimerització. L'agitació es va mantenir a 900 rpm durant 4 hores per tal d'assegurar la correcta formació de les nanopartícules. Les nanopartícules es van caracteritzar per DLS a 25°C després de filtrar les mostres. A la taula XVIII es mostren els resultats obtinguts.

**Taula XVIII:** Caracterització de les nano-emulsions prèvies i de les nanopartícules de poli-isobutilcianoacrilat obtingudes a partir de les nano-emulsions O/W.

Nano-emulsions						Nanopartícules		
Composició nano-emulsió			pH	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Monòmer: <i>i</i> BCA		
Aigua (% p/p)	Relació O/T					Concentració (µl/ml)	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
F'1	90	10/90	6,20	21,39	0,185	10	322,97 ± 4,45	0,191
H'1	90	10/90	6,26	16,78	0,175	10	286,55 ± 3,04	0,206
N2	90	20/80	6,97	38,53	0,152	10	305,43 ± 3,85	0,192
M2	90	20/80	6,95	29,54	0,126	10	266,25 ± 3,35	0,205

Es van obtenir nanopartícules amb una mida compresa entre 260 i 325 nm independentment de les característiques de la nano-emulsió inicial emprada com a medi de polimerització. El diàmetre de les nanopartícules de poli-isobutilcianoacrilat és considerablement més gran que el de la nano-emulsió corresponent. Tot i això, les nanopartícules obtingudes presenten diàmetres de l'ordre dels obtinguts en la bibliografia en composicions similars (Al Khouri-Fallouh, 1986; Zhang, 2008; Graf, 2009). La gran diferència de mida existent entre la formulació inicial i les nanopartícules resultants suggereix que la polimerització es produeix independentment de les gotes de

la nano-emulsió. Tenint en compte la reactivitat dels alquilcianoacrilats descrita al capítol 1.2.3, la reacció de polimerització es desencadenaria en el precís moment en que el monòmer entrés en contacte amb les molècules d'aigua de la fase externa de tal manera que no podria difondre a través d'aquesta fins arribar a les gotes d'oli. Les nanopartícules formades quedarien estabilitzades per molècules de tensioactiu presents en el medi de polimerització. En relació a la polidispersió, les nano-emulsions estarien constituïdes per gotes de mida força uniforme, especialment les composicions N2 i M2, ja que tots els valors de P han sigut  $< 0,200$ . L'índex de polidispersitat tendeix a incrementar-se quan es formen les nanopartícules, obtenint-se valors molt propers a 0,200 per a totes les composicions estudiades.

Els paràmetres crítics que podrien influir en les característiques fisicoquímiques de les nanopartícules obtingudes per polimerització d'alquilcianoacrilats són principalment la concentració de monòmer, el pH de la fase aquosa i el solvent orgànic en cas d'utilitzar-se. A continuació s'estudien cadascun d'aquests factors.

#### *Influència de la concentració de monòmer*

Un dels factors a tenir en consideració en l'elaboració de nanopartícules de polialquilcianoacrilat és la concentració de monòmer. Per a estudiar la influència d'aquest factor es van preparar nanopartícules amb una concentració d'alquilcianoacrilat compresa entre 10 i 100  $\mu\text{l/ml}$ . La nano-emulsió utilitzada com a medi de polimerització correspon a la composició N2 (90% d'aigua; relació O/T: 20/80; sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F 68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812). Com a monòmers es van emprar BCA i iBCA. El mètode de preparació de les nanopartícules va consistir en addicionar lentament i en agitació magnètica (900 rpm) la corresponent concentració de monòmer a la nano-emulsió prèviament preparada (mètode E). Els estudis es van realitzar per duplicat. Una vegada addicionat el monòmer la composició inicialment transparent - blavosa va esdevenir blanca i opaca. L'agitació es va mantenir durant 4 hores a 900 rpm per tal d'assegurar que tota la concentració de monòmer hagi polimeritzat.

La nano-emulsió es va caracteritzar immediatament abans d'addicionar l'alquilcianoacrilat determinant el pH, el diàmetre de gota i l'índex de polidispersitat. Per a aquesta composició, el pH va ser de 6,83, la mida de gota de  $38,55 \pm 1,11$  nm i la polidispersió de 0,139. Tant la mida de gota com l'índex de polidispersitat es van determinar per DLS a 25°C.

Les nanopartícules resultants també es van caracteritzar per DLS a 25°C. A la taula XIX es detallen els valors del diàmetre de partícula i de polidispersió per a cada concentració de monòmer estudiada.

**Taula XIX:** Diàmetre de gota i índex de polidispersitat en funció de la concentració de monòmer de nanopartícules de poli-butilcianoacrilat i de poli-isobutilcianoacrilat.

Monòmer: BCA			Monòmer: iBCA		
Concentració (µl/ml)	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P	Concentració (µl/ml)	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
5	299,50 ± 4,15	0,198	5	278,00 ± 5,69	0,216
10	337,12 ± 1,39	0,181	10	308,72 ± 3,83	0,190
25	341,17 ± 3,03	0,157	25	325,77 ± 3,65	0,167
50	346,35 ± 3,93	0,158	50	331,80 ± 4,74	0,163
80	370,20 ± 3,11	0,169	80	346,90 ± 4,81	0,179
100	367,70 ± 3,70	0,179	—	—	—

Tant les nanopartícules de poli-butilcianoacrilat (PBCA) com les de poli-isobutilcianoacrilat (PiBCA) presenten un diàmetre de partícula molt elevat quan es comparen amb la mida de gota de la nano-emulsió, 38,55 nm enfront 278-367 nm. En totes les composicions es va observar la formació de precipitat que indicaria un excés de monòmer en la formulació. Els valors d'índex de polidispersitat obtinguts corresponen en general a sistemes de baixa polidispersió ( $P < 0,200$ ), tot i que per a la concentració de monòmer de 5 µl/ml es va observar una major variació del diàmetre de partícula i fins i tot es va detectar la presència de gotes de nano-emulsió en les mescles. Malgrat aquest aspecte, la polidispersió de cadascun dels sistemes de nanopartícules va ser força superior a la de la nano-emulsió prèvia. Com era d'esperar s'ha observat una tendència general a incrementar-se el diàmetre de partícula en augmentar la concentració de monòmer. Tot i això, les diferències en la mida de partícula entre la concentració més baixa i la més elevada estudiades van ser relativament reduïdes tenint en compte que es van utilitzar concentracions fins a 15-20 vegades superiors a la mínima assajada (5µl/ml). Això es reflexaria en el fet que tan sols s'ha produït un creixement de diàmetre de com a màxim 70 nm.

Les nanopartícules d'alquilcianoacrilat van presentar una mida més petita quan es va utilitzar iBCA com a monòmer. Malgrat això, els valors de polidispersió van ser lleugerament superiors als observats amb les nanopartícules de PBCA.

### *Influència del pH*

S'ha estudiat la influència del pH en la formació de nanopartícules de PBCA a partir de nano-emulsions O/W i solucions micel·lars directes corresponents al sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3:1, p/p)/ Miglyol 812. Les composicions es van preparar amb un 90% en pes d'aigua i una relació O/T de 0/100 per a la solució micel·lar i de 20/80 per a la nano-emulsió. Després de deixar-les reposar a 25°C en un bany termostatat, les mescles es van acidificar amb àcid ortofosfòric al 85% (p/v) ja que diferents autors han suggerit un pH entre 2,5 i 3,5 per tal de disminuir la velocitat del procés de polimerització i així obtenir nanopartícules de PACA de mida petita i uniforme (Douglas, 1984; Behan, 2001). En aquest treball s'han estudiat valors de pH compresos entre 2 i 7. Les composicions ja acidificades es van caracteritzar per DLS a 25°C. L'addició d'àcid ortofosfòric a les mecles no va suposar en cap cas una modificació important de la mida de gota ni de la polidispersió del sistema. El diàmetre de les gotes de la nano-emulsió va oscil·lar entre 37,16 nm i 42,40 nm i la polidispersió entre 0,127 i 0,153. En el cas de la solució micel·lar la mida va ser de  $20,11 \pm 0,43$  nm i la polidispersió de 0,165.

Per a la preparació de les nanopartícules de PBCA es van emprar aquelles concentracions de monòmer amb les quals es van formar les nanopartícules de mida més petita d'acord amb els resultats obtinguts en el capítol anterior. Aquestes concentracions corresponen a 5 µl/ml i 10 ul/ml. El mètode d'elaboració va ser novament el proposat per Couvreur et al. (1979). La velocitat d'agitació de les mescles va ser de 900 rpm. L'agitació es va mantenir durant 24 hores ja que en disminuir el pH el procés de polimerització podria alentir-se considerablement (Douglas, 1984; Behan, 2001). A les taules XX i XXI es mostren respectivament els resultats corresponents als paràmetres morfomètrics (diàmetre de partícula i índex de polidispersitat) determinats per DLS a 25°C després d'incorporar el monòmer en la solució micel·lar o en la nano-emulsió O/W.

**Taula XX:** Diàmetre i índex de polidispersitat determinats per DLS a 25°C de nanopartícules de PBCA obtingudes a partir d'una solució micel·lar.

Nanopartícules PBCA				
pH	5 µl/ml		10 µl/ml	
	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
2,46	23,16	0,223	29,16	>0,300
5,91*	340,00	0,155	354,00	0,160

\*pH corresponent a la solució micel·lar sense acidificar

**Taula XXI:** Diàmetre i índex de polidispersitat determinats per DLS a 25°C de nanopartícules de PBCA obtingudes a partir d'una nano-emulsió.

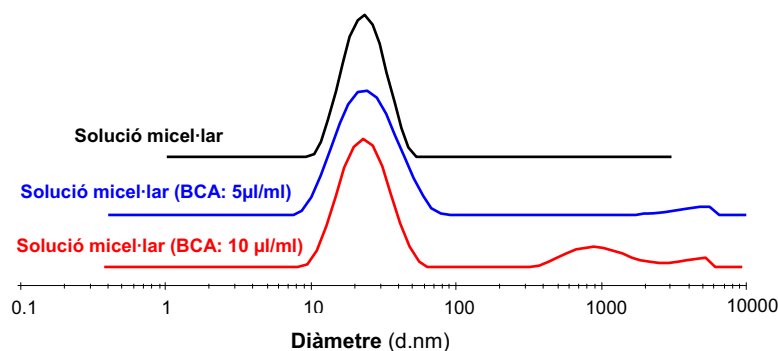
Nanopartícules PBCA				
pH	5 µl/ml		10 µl/ml	
	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
2,46	43,90	0,193	48,45	0,206
3,00	243,20	>0,300	270,30	>0,300
5,64	288,00	0,260	311,80	0,244
6,83*	299,50	0,198	337,12	0,181

\*pH corresponent a la nano-emulsió N2 sense acidificar

Quan s'utilitza una solució micel·lar com a medi de polimerització per alquilcianoacrilats, la formació de les nanopartícules es desencadena com a conseqüència de la reacció entre les molècules d'aigua i el monòmer (polimerització aniónica). El procés de polimerització es produeix espontàniament i les molècules de tensioactiu presents en el medi que es trobarien inicialment formant micel·les actuarien estabilitzant les nanopartícules (Couvreur, 1991). Així, a pH 5,91, a partir de la solució micel·lar es van obtenir nanopartícules de PBCA amb una mida compresa entre 340 i 354 nm, depenent de la concentració de monòmer, estabilitzades amb Cremophor EL i Lutrol F68. Els índex de polidispersitat van ser de l'ordre dels obtinguts prèvia incorporació de l'alquilcianoacrilat (0,140-0,165).

A pH 2,46, les determinacions de diàmetre pràcticament es van correspondre amb la mida de les micel·les (20 nm) per a la concentració de 5 µl/ml. Quan es va emprar una concentració més elevada (10 µl/ml) el diàmetre va incrementar-se lleugerament,

obtenint-se un Z-Average de 29 nm. Malgrat aquest fet, s'ha de tenir en compte que l'índex de polidispersitat va ser força superior a 0,300 per a aquesta concentració i per tant el valor de diàmetre expressat com a Z-Average no es pot considerar com a fiable. A la Fig. 4.43 es mostren els perfils de les corbes de distribució de mida de partícula en intensitat obtinguts per DLS a 25°C de la solució micel·lar inicial i de les composicions resultants una vegada incorporat el monòmer.



**Fig. 4.43:** Corbes de distribució del diàmetre de partícula en intensitat determinades per DLS a 25°C de la solució micel·lar prèvia a pH 2,46 i de les composicions resultants després d'addicionar una concentració de monòmer de 5µl/ml i de 10 µl/ml.

Tal i com es pot observar a la Fig. 4.43, els pics màxims de les corbes de distribució de mida en intensitat obtingudes per a les formulacions que contenen BCA incorporat, coincideixen pràcticament amb el màxim corresponent a la solució micel·lar (24,30 nm). Per tant, a pH 2,46, el procés de polimerització es trobaria inhibit i no es formarien nanopartícules de PBCA. A més, després d'incorporar el monòmer no es van observar canvis en l'aspecte macroscòpic de la solució micel·lar que indiquessin la formació de nanopartícules. D'acord amb el caràcter lipòfil del monòmer, l'augment de la polidispersitat del sistema podria ser conseqüència de la formació d'una petita població de gotes de BCA detectades per DLS dins del rang micromètric.

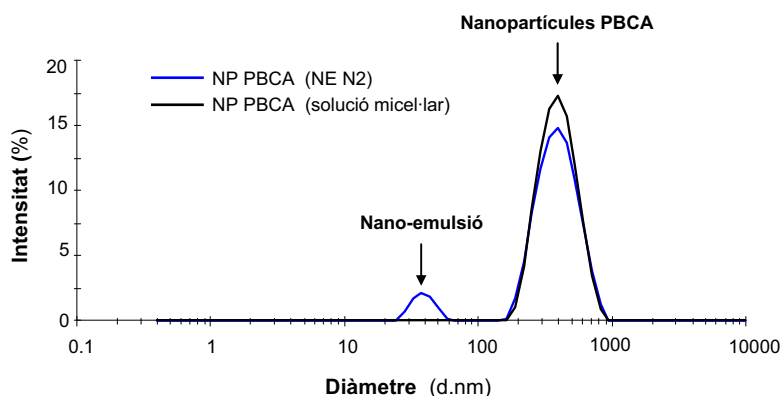
La formació de les nanopartícules de PACA es troba doncs fortament condicionada pel pH del medi de polimerització. Així, una acidificació de la fase externa implica un alentiment i fins i tot una inhibició del procés de polimerització que es reflexa en una disminució de la mida de partícula determinada per DLS. De fet, per a valors de  $\text{pH} \geq 3$ , immediatament després d'addicionar el BCA es van obtenir dispersions lletoses tant amb la nano-emulsió com amb la solució micel·lar que contrastaven amb l'aspecte macroscòpic de les composicions preparades a  $\text{pH} < 3$  (dispersions transparent-blavoses).

En aquestes últimes, tampoc es va observar una modificació important de l'aspecte en relació a les mescles inicials en finalitzar l'assaig (24 hores en agitació magnètica).

Quan es va emprar la nano-emulsió N2 com a medi de polimerització, a pH 3,00 i 5,64, tot i que es van formar nanopartícules de PBCA, els índex de polidispersitat van ser molt elevats indicant tant la presència de gotes de nano-emulsió com l'obtenció d'una població de nanopartícules poc uniforme en quant al seu diàmetre. En aquest cas, el valor del Z-Average tampoc s'ha pogut considerar com a fiable. Les nanopartícules presentarien un diàmetre de l'ordre dels 400 nm tenint en compte el valor del pic màxim de la corba de distribució de mida de partícula.

Únicament es van obtenir polidispersions inferiors a 0,200 per a les formulacions en les que es va mantenir el pH inicial de la nano-emulsió (6,83). El diàmetre de les nanopartícules de PBCA en aquestes condicions va ser molt elevat en relació a la mida de les gotes de nano-emulsió (300-337 nm enfront 38 nm). Pel que fa a la polidispersió, es va observar un lleuger augment fins a valors propers a 0,200 amb l'addició de monòmer.

A la figura 4.44 es poden observar les corbes de distribució de mida en intensitat determinades per DLS a 25°C de les nanopartícules obtingudes a partir de la solució micel·lar i la nano-emulsió O/W per a la concentració de 5 µl/ml de BCA.



**Fig. 4.44:** Corbes de distribució del diàmetre de partícula en intensitat determinades per DLS a 25°C de nanopartícules obtingudes a partir de la nano-emulsió O/W i la solució micel·lar sense acidificar quan s'empra una concentració de BCA de 5 µl/ml.

Les determinacions realitzades amb DLS mostren una distribució bimodal de la mida de partícula. La població detectada entre 25 i 60 nm es correspon amb la mida de les gotes de la nano-emulsió mentre que la població que apareix per a diàmetres superiors als 100



nm correspondria a la formació de nanopartícules de PBCA. Com es pot observar a la Fig. 4.44, les nanopartícules obtingudes van ser exactament del mateix ordre que les preparades en solució micel·lar. Per tant, quan s'empra la nano-emulsió com a medi de polimerització, les nanopartícules de PBCA es formen independentment de la presència de les gotes de nano-emulsió. La difusió del BCA a través de la fase aquosa està dificultada ja que la reacció de polimerització entre el monòmer i les molècules d'aigua és extremadament ràpida. L'increment de la polidispersió es justificaria per la coexistència de gotes i nanopartícules en la mateixa formulació. Per a la concentració de 10 µl/ml no es va detectar el pic de nano-emulsió per DLS degut a que es van formar un major nombre de nanopartícules de PBCA.

A pH 2,46, amb la incorporació de monòmer es va observar el mateix efecte que en la solució micel·lar, és a dir, un petit increment del Z-Average acompanyat d'un augment considerable de la polidispersitat del sistema en relació als valors inicials dels paràmetres morfomètrics determinats per DLS prèvia addició de BCA. En els estudis corresponents a la solució micel·lar ja es va posar de manifest que per a aquest valor de pH no té lloc la reacció de polimerització. Per tant, l'augment conjunt del Z-Average i de la polidispersió podria ser degut a la formació de gotes mixtes de Miglyol 812 i de BCA ja que el monòmer és soluble en el component oliós a les concentracions emprades. Amb la concentració de 10 µl/ml de BCA, també es va detectar una petita població de gotes de mida micromètrica.

### *Influència del solvent orgànic*

Com ja s'ha constatat al capítol anterior, la reacció de polimerització aniònica que dona lloc a la formació de nanopartícules de PACA s'esdevé en el precís moment en que el monòmer es posa en contacte amb la formulació. Aquesta reacció es produeix entre el monòmer i les molècules d'aigua sense que intervinguin les gotes de la nano-emulsió. Amb la finalitat d'afavorir la difusió de l'alquilcianoacrilat a través de la fase aquosa i promoure un procés de polimerització interfacial, es van emprar solvents orgànics parcialment miscibles en aigua tals com l'acetona (solvent polar apròtic) i el cloroform (solvent apolar). La utilització de solvents orgànics en l'elaboració de nanopartícules de PACA és una pràctica molt extesa sobretot per a la preparació de nanocàpsules (Gallardo, 1993; Fresta, 1996; Santos-Magalhães, 2000; Pitaksuteepong, 2002). Diferents autors han considerat una relació entre fase orgànica (mescla

solvent/monòmer) i fase aquosa de 1:2 v/v com a idònia per a l'obtenció d'aquest tipus de nanocàpsules (Puglisi, 1995; Fresta, 1996; Aboubakar, 1999).

Per a estudiar la influència del solvent orgànic en la formació de nanopartícules a partir de nano-emulsions es van seleccionar com a monòmers BCA i *i*BCA a una concentració de 5 µl/ml. Ambdós cianoacrilats són solubles tant en acetona com en cloroform a aquesta concentració. La nano-emulsió N2 es va preparar amb diferents concentracions de cadascun dels solvents a estudiar amb la finalitat de determinar la màxima proporció entre fase orgànica i fase aquosa a partir de la qual la composició es desestabilitzaria (separació en fases). Aquestes proporcions van ser de 1:5 en pes per a l'acetona i de 1:9 per al cloroform. Una vegada evaporat el solvent es va determinar el diàmetre de gota de la nano-emulsió. No es van observar diferències importants en quant a mida de gota en relació a la formulació no tractada ( $40,30 \pm 1,86$  nm enfront  $38,87 \pm 0,86$  nm), però en canvi l'índex de polidispersitat va augmentar lleugerament (0,160 enfront a 0,142).

La polimerització en presència de solvent orgànic es va estudiar a dos valors de pH diferents, 6,83 (pH corresponent a la nano-emulsió) i 2,50 (pH resultant de l'acidificació amb àcid ortofosfòric al 85% (p/v)). Es van emprar diverses proporcions solvent:nano-emulsió. El procés de polimerització va consistir en addicionar lentament i en agitació contínua la fase orgànica (monòmer solubilitzat en acetona o en cloroform) sobre la nano-emulsió prèviament preparada (veure capítol 3.3.3.1). L'agitació magnètica es va mantenir a 900 rpm durant 24 hores, per tal d'aconseguir una completa evaporació del solvent orgànic emprat. Transcorregut aquest temps, les mesclures es van filtrar i caracteritzar per DLS a 25°C. A les taules XXII i XXIII es detallen respectivament els resultats obtinguts quan s'utilitza BCA o *i*BCA. Degut a que es van obtenir elevats índex de polidispersitat, s'ha considerat oportú mostrar els valors dels màxims observats en les corbes de distribució de mida de partícula determinades en intensitat.

**Taula XXII:** Caracterització per DLS a 25°C de nanopartícules de PBCA preparades a pH àcid (2,50) i a pH pràcticament neutre (6,83) per addició directa de l'alquilcianoacrilat o bé del monòmer solubilitzat en acetona o cloroform en proporció solvent:nano-emulsió 1:5 i 1:9 respectivament.

BCA	pH: 2,50				pH: 6,83			
	Z-Av. (nm)	P	Pic màxim (nm) <sup>1</sup>		Z-Av. (nm)	P	Pic màxim (nm) <sup>1</sup>	
<b>Sense solvent</b>	43,90	0,193	53,20	—	299,50	0,198	400,10	39,96
<b>Acetona</b>	58,10	>0,300	53,83	432,33	314,00	0,297	408,00	51,20
<b>Cloroform</b> <sup>2</sup>	—	—	—	—	201,00	>0,300	418,50	50,85

<sup>1</sup>: Pic o pics màxims de les corbes de distribució de mida de partícula determinades en intensitat per DLS a 25°C. Únicament s'han detallat els pics corresponents a la nano-emulsió i les nanopartícules. El que es troba en primer lloc correspon al pic majoritari.

<sup>2</sup>: Les composicions preparades a pH 2,5 no es van poder caracteritzar per DLS ja que van presentar separació en fases en finalitzar l'assaig.

**Taula XXIII:** Caracterització per DLS a 25°C de nanopartícules de PiBCA preparades a pH àcid (2,50) i a pH pràcticament neutre (6,83) per addició directa de l'alquilcianoacrilat o bé del monòmer solubilitzat en acetona o cloroform en proporció solvent:nano-emulsió 1:5 i 1:9 respectivament.

iBCA	pH: 2,50				pH: 6,83			
	Z-Av. (nm)	P	Pic màxim (nm) <sup>1</sup>		Z-Av. (nm)	P	Pic màxim (nm) <sup>1</sup>	
<b>Sense solvent</b>	42,56	0,236	48,56	—	275,16	0,216	378,40	44,55
<b>Acetona</b>	73,36	>0,300	269,33	45,70	188,33	0,274	255,66	33,90
<b>Cloroform</b>	169,00	>0,300	273,00	43,90	196,66	0,251	262,66	34,16

<sup>1</sup>: Pic o pics màxims de les corbes de distribució de mida de partícula determinades en intensitat per DLS a 25°C. Únicament s'han detallat els pics corresponents a la nano-emulsió i les nanopartícules. El que es troba en primer lloc correspon al pic majoritari.

Quan les composicions es preparen a pH àcid (2,50) per addició directa de l'alquilcianoacrilat (BCA o iBCA) sobre la nano-emulsió, s'observa un augment considerable de la polidispersió de la mescla final en relació a la nano-emulsió prèvia però, en canvi, el diàmetre de gota pràcticament no es modifica. Aquest fet indicaria que per a aquest valor de pH no es formarien nanopartícules com ja es va constatar al capítol anterior. Tot i que en les corbes de distribució de mida en intensitat obtingudes per DLS es van detectar pics dins del rang micromètric, no s'ha detallat el valor d'aquests pics a les taules ja que correspondrien a gotes de monòmer sense polimeritzar.

En canvi, a pH 6,83, el procés de polimerització es produeix molt ràpidament formant-se nanopartícules de PACA amb un diàmetre molt elevat (Z-Average: 275-300 nm). La reacció química s'inicia independentment de les gotes de la nano-emulsió a partir de l'atac nucleòfil de l'oxigen de les molècules d'aigua sobre el carboni electròfil del grup

cianoacrilat. Aquest fet queda reflexat en les taules XXII i XXIII en els valors dels màxims observats, corresponent-se un dels pics a la nano-emulsió inicial (39,96-44,55 nm). Així, l'augment de la polidispersió seria conseqüència de la presència simultània de gotes de nano-emulsió i nanopartícules.

El solvent orgànic podria actuar afavorint la polimerització ja que s'ha observat la formació de nanopartícules de PACA fins i tot a pH àcid (2,5). L'obtenció de partícules en presència de solvent a aquests valors de pH podria ser deguda a que el pH de la composició es va acidificar abans d'incorporar el solvent. L'addició de petites quantitats del solvent orgànic a la dispersió podria induir una petita modificació del pH del medi (augment) i d'aquesta manera afavorir el procés de polimerització. En el cas de les nanopartícules de PBCA no es va poder emprar cloroform com a solvent ja que les formulacions obtingudes eren molt inestables i es va produir una ràpida separació en fases. L'addició en la nano-emulsió de BCA solubilitzat en acetona va donar lloc a la formació d'una petita població de nanopartícules amb un diàmetre de 432 nm. Quan el monòmer és *i*BCA s'obtenen resultats pràcticament idèntics tant amb acetona com amb cloroform, és a dir, mescles de nanopartícules i gotes amb un diàmetre aproximat de 270 i de 45 nm respectivament. El diàmetre de les nanopartícules de PiBCA va ser inferior al que es va obtenir per addició directa del monòmer a pH 6,83 (378 nm). Malgrat que es va aconseguir la formació de nanopartícules, aquestes presenten una mida molt gran en comparació amb les gotes de la nano-emulsió. Els índex de polidispersitat també van ser molt elevats ( $>0,300$ ).

A pH 6,83, per a totes les composicions estudiades es va observar la presència conjunta de nanopartícules i gotes de nano-emulsió. Els índex de polidispersitat van ser lleugerament inferiors als obtinguts a pH 2,5 però corresponien a sistemes polidispersos. Quan es va emprar BCA no es van observar diferències rellevants en el diàmetre de partícula en relació a les formulacions preparades únicament amb el monòmer (400-418 nm). En canvi, les nanopartícules de PiBCA preparades amb solvent orgànic tenen una mida més petita que les que s'obtenen per addició directa d'*i*BCA (255-262 nm enfront 378 nm). Tot i això, els valors de polidispersitat per aquestes composicions són més elevats.

En concordança amb els resultats obtinguts, el fet d'utilitzar un solvent orgànic no comportaria cap avantatge en el procés de polimerització ja que aquesta es produeix al marge de les gotes de la nano-emulsió.

*Preparació de nanopartícules de PACA per mètodes alternatius*

Un dels principals problemes en la preparació de nanopartícules de PACA a partir de nano-emulsions O/W va ser la ràpida reacció que es produïa entre els monòmers i les molècules d'aigua de la fase externa. Les nanopartícules obtingudes pel mètode convencional (Couvreur, 1979; Al-Khoury Fallouh, 1986) presentaven un diàmetre elevat ( $>200$  nm) i la polimerització tenia lloc independentment de les gotes de la nano-emulsió. Per tal de disminuir la velocitat de la reacció, es va provar a solubilitzar diferents concentracions de monòmer compreses entre 5 i 25  $\mu\text{l/ml}$  en la mescla oli/tensioactiu prèvia elaboració de la nano-emulsió. Els monòmers BCA i iBCA són solubles en el component oliós (Miglyol 812) però en presència del tensioactiu (Cremophor EL) reaccionaven ràpidament originant polímers insolubles fins i tot a la concentració més baixa estudiada (5  $\mu\text{l/ml}$ ). Per tant, no es van poder preparar les composicions per aquest mètode.

Les nanopartícules de PBCA també es van preparar a 50°C per addició de l'alquilcianoacrilat solubilitzat en l'oli sobre la mescla aigua/tensioactiu/co-tensioactiu mitjanant l'aplicació d'ultrasons (veure capítol 3.3.3.1). Per a dur a terme aquest estudi es van emprar concentracions de monòmer de 5 i 10  $\mu\text{l/ml}$ . Els ultrasons es van mantenir durant 5 hores per tal de promoure tant el procés d'emulsificació com el de polimerització. Prèviament, es va estudiar la formació de la nano-emulsió (composició N2) utilitzant aquest mètode. En aquestes condicions es formen gotes de nano-emulsió amb un diàmetre de 39,95 nm. Tot i això, els valors de polidispersió van ser propers a 0,200. A partir d'aquest procediment, es va aconseguir la formació d'una petita població de nanopartícules de PBCA amb un diàmetre de partícula comprès entre 200 i 240 nm (valor del pic màxim). Malgrat que es van obtenir nanopartícules de mida més petita que les preparades pel mètode convencional, el diàmetre d'aquestes va ser força gran en relació a la mida de les nano-emulsions. A més, la polidispersió de les composicions va ser molt elevada ( $>0,300$ ), fet que es va manifestar amb la coexistència de nanopartícules i nano-emulsió en les formulacions finals.

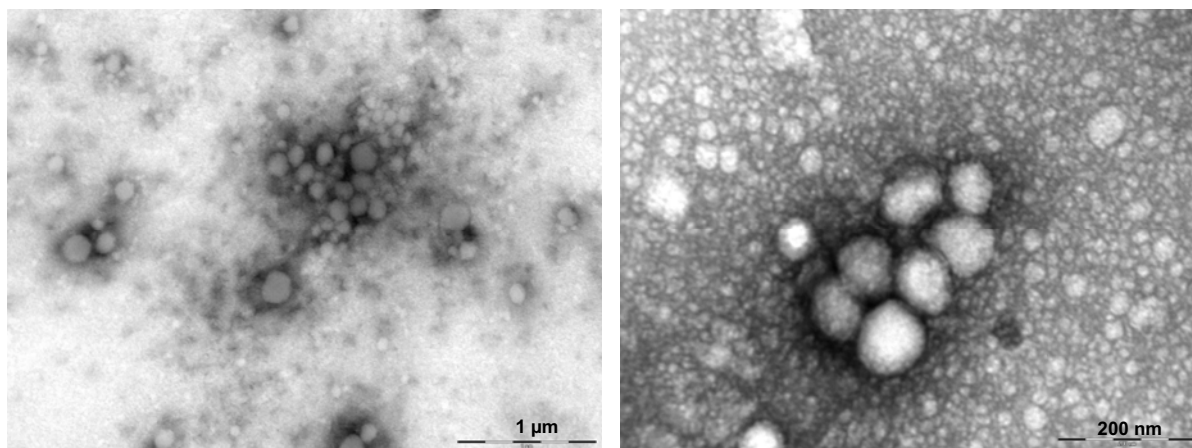
Finalment, es va estudiar la formació de nanopartícules de PACA a partir del mètode proposat per Couvreur et al. (1979) però sotmetent la nano-emulsió O/W a una temperatura de 4°C en el moment d'addicionar el monòmer (BCA). La nano-emulsió no va experimentar canvis en el seu aspecte macroscòpic en disminuir la temperatura (24 hores a 4°C). Les concentracions de BCA utilitzades van ser 10  $\mu\text{l/ml}$  i 25  $\mu\text{l/ml}$ . Malgrat

que el procés de polimerització hauria de transcórrer més lentament a 4°C (Behan, 2001), immediatament després d'incorporar el monòmer es van obtenir dispersions d'aspecte lletós. La velocitat i temps d'agitació van ser de 900 rpm i de 4 hores respectivament. Els paràmetres morfomètrics (diàmetre de partícula i polidispersió) determinats per DLS a 25°C van ser similars als obtinguts en els capítols anteriors, és a dir, mida de partícula de l'ordre dels 300-400 nm i polidispersions superiors a 0,200.

### *Caracterització de les nanopartícules de PACA per TEM*

La caracterització per Microscòpia Electrònica de Transmissió va permetre observar la morfologia de les nanopartícules de PACA i va posar de manifest l'elevada heterogenicitat en relació a la mida de partícula que ja s'havia constatat en les determinacions realitzades per DLS. Les mostres es van preparar per tinció negativa amb acetat d'uranil a l'1% (veure capítol 3.3.5.2). A continuació es mostren algunes de les imatges corresponents a les nanopartícules de PBCA preparades pel mètode convencional a pH 6,83 i a pH 2,46 i mitjançant ultrasons.

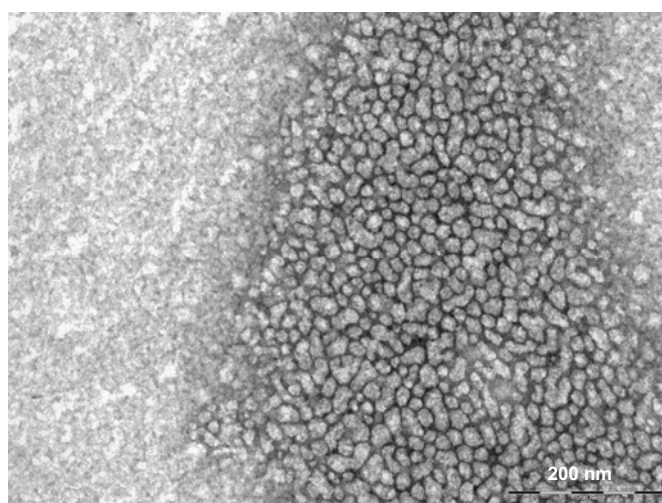
La Fig. 4.45 correspon a nanopartícules de PBCA preparades a pH 6,83 a partir de la nano-emulsió N2 emprant una concentració de 5 µl/ml de BCA.



**Fig 4.45:** Micrografies obtingudes per TEM de nanopartícules de PBCA preparades a pH 6,83 a partir de nano-emulsions O/W (90% en pes d'aigua, rel. O/T: 20/80; sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3.1, p/p)/ Miglyol 812) amb una concentració de 5 µl/ml de BCA.

A les imatges de TEM es poden observar nanopartícules de PBCA de forma més o menys arrodonida però amb una àmplia diversitat en quant a diàmetre de partícula. Així,

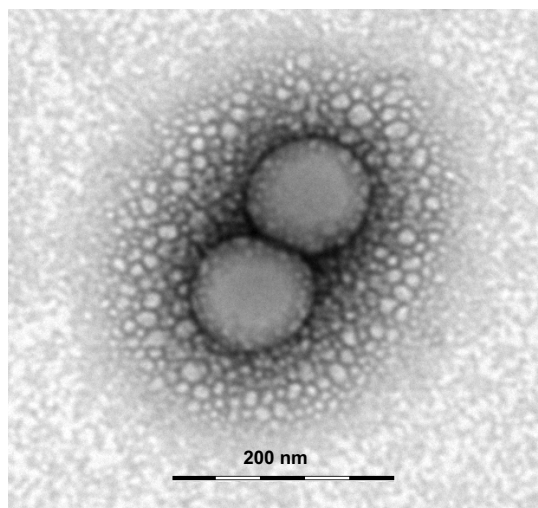
la mida de les nanopartícules obtingudes va oscil·lar entre 100 i 300 nm (recompte de 30 partícules). A la micrografia obtinguda a un major nombre d'augment (imatge situada a la dreta de la figura) es pot observar també la presència de gotes de nano-emulsió superposades unes sobre les altres degut a un efecte de la tinció negativa. Aquests resultats concorden amb les determinacions realitzades amb DLS en les quals ja es va observar una elevada polidispersió fruit tant de la presència conjunta de nanopartícules de PBCA i gotes de nano-emulsió com de la variabilitat en el diàmetre de les partícules. A la Fig. 4.46 es mostra la imatge obtinguda per TEM de la composició N2 a pH 2,46 després d'incorporar una concentració de BCA de 5  $\mu\text{l/ml}$ .



**Fig. 4.46:** Micrografia electrònica de la composició amb un 90% en pes d'aigua i una rel. O/T: 20/80 del sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3.1, p/p)/ Miglyol 812 després d'addicionar una concentració de monòmer de 5  $\mu\text{l/ml}$ .

Com ja s'ha explicat al capítol on s'ha estudiat la influència del pH (pàg.209), a pH 2,46, el procés de polimerització es trobaria inhibit i per tant no es formarien nanopartícules de PBCA. Per tant, la imatge correspondria a les gotes de la nano-emulsió O/W. Aquestes gotes enlloc de ser isodiamètriques tal i com s'hauria esperat, presenten una morfologia polièdrica. La pèrdua d'esfericitat podria ser deguda tant a l'aparició de fenòmens de desestabilització del sistema (coalescència i maduració d'Ostwald) com al processament i posterior observació de la nano-emulsió que inclou un dessecament de la preparació (veure capítol 3.3.5.2).

La Fig. 4.47 correspon a nanopartícules de PBCA preparades amb una concentració d'alquilcianoacrilat de 5  $\mu\text{l/ml}$  a partir d'un procediment alternatiu consistent en l'aplicació d'ultrasons a una temperatura de 50°C.



**Fig 4.47:** Imatge obtinguda per TEM de nanopartícules de PBCA elaborades a partir de l'aplicació d'ultrasons emprant una concentració de monòmer de 5  $\mu\text{l/ml}$  de BCA. La composició seleccionada com a medi de polimerització està constituïda per un 90% en pes d'aigua i una rel. O/T: 20/80 (sistema aigua/ Cremophor EL: Lutrol F68 (3.1, p/p)/ Miglyol 812)

A la micrografia electrònica s'observa tant la presència de nanopartícules de PBCA (nanopartícules de morfologia arrodonida, isodiamètriques, amb una mida de partícula aproximada de 130 nm i amb un embolcall polimèric definit) com de gotes de nano-emulsió (envoltant les nanopartícules). Les gotes de nano-emulsió tenen un diàmetre molt reduït (10-30 nm) en comparació amb les nanopartícules de PBCA i apareixen en major proporció, pràcticament no es van observar nanopartícules al llarg de la mostra. Els resultats obtinguts corroboren les determinacions realitzades amb DLS on ja es va constatar la coexistència d'ambdues poblacions i la predominància de les gotes de nano-emulsió sobre les partícules.



## **Resum de la formació i caracterització de nanopartícules de poli-alquilcianoacrilat:**

S'han obtingut nanopartícules de PiBCA i PBCA amb un diàmetre comprès entre 260 i 370 nm emprant nano-emulsions O/W com a medi de polimerització. Aquestes mides són de l'ordre de les obtingudes en la literatura.

El procés de polimerització per a la formació de nanopartícules de PACA es produeix com a conseqüència de la reacció amb els grups hidroxil de l'aigua de la fase externa i és independent de les gotes de la nano-emulsió.

El diàmetre de les nanopartícules de PACA s'incrementa amb la concentració de monòmer produint-se una diferència màxima de 70 nm en la mida de partícula entre la concentració més baixa i la més elevada estudiades.

Les nanopartícules de PiBCA són lleugerament més petites que les nanopartícules de PBCA per a la mateixa concentració de monòmer.

La formació de nanopartícules de PACA és dependent del pH del medi de polimerització. Una disminució del pH implica un alentiment del procés de polimerització.

El procés de polimerització es troba inhibit a pH 2,46, detectant-se per DLS una població micel·lar o de gotes de nano-emulsió (dependent del medi emprat) i la presència de gotes de monòmer dins del rang micromètric. Aquesta població es forma en major proporció en augmentar la concentració de monòmer.

La formació de nanopartícules és produïda independentment de les gotes de nano-emulsió observant-se per DLS dues poblacions diferenciades (nano-emulsió i nanopartícules).

S'ha aconseguit la formació de nanopartícules amb una baixa polidispersitat ( $P < 0,150$ ) de PBCA amb un diàmetre de partícula comprès entre 340 i 354 nm estabilitzades per dos tensioactius no iònics (Cremophor EL i Lutrol F68) a pH 5,91 a partir d'una solució micel·lar. El mecanisme de formació consisteix en una polimerització aniònica.

La utilització d'un solvent orgànic parcialment miscible en aigua permet la formació de nanopartícules de PACA fins i tot a pH àcid. No obstant, la mida de partícula determinada per DLS és molt superior a la de les gotes de la nano-emulsió inicial.

No es va poder emprar cloroform per a la formació de nanopartícules de PBCA a pH àcid ja que les composicions van ser inestables.

Els resultats obtinguts per DLS posen de manifest l'existència simultània de nanopartícules de PACA i gotes de nano-emulsió en les formulacions, independentment del mètode de preparació emprat (addició directa del monòmer, solubilització en solvent orgànic, disminució de la temperatura, ultrasons).

Les imatges obtingudes per TEM evidencien la coexistència de nanopartícules i nano-emulsions en les composicions i corroboren els resultats obtinguts per DLS. La població de nanopartícules presenta una morfologia relativament esfèrica i és força heterogènia en relació al diàmetre de partícula.

#### 4.2.2. Nanopartícules de poliuretà (PU) i poliurea (PUR)

La formació de partícules d'alquilcianoacrilats a partir de nano-emulsions va presentar nombrosos problemes, per les dificultats en el control de la velocitat de la reacció de polimerització fins i tot a baixes temperatures (4°C) i amb la modificació del pH (2,5-3,5). Es van obtenir nanopartícules de característiques similars en formulacions amb diferent nanoestructura, ja que el procés de polimerització es produïa independentment de la presència de les gotes de la nano-emulsió, com ja van posar de manifest Krauel et al. (2005) en estudiar la formació de nanopartícules de polialquilcianoacrilats utilitzant com a medi de polimerització microemulsions O/W, microemulsions bicontínues i solucions micel·lars. Per aquestes dificultats, es va seleccionar un altre tipus de monòmer de la família dels diisocianats per a la preparació de les nanopartícules.

Els diisocianats són molècules altament reactives que en presència de grups hidroxil o grups amino donen lloc a la formació de poliuretans i poliurees respectivament (Vermette, 2001; Ionescu, 2005; Król, 2008), tal com s'ha detallat al capítol 1.2.4. Ambdós polímers estan considerats com a biodegradables i biocompatibles (Chandra, 1998; Vermette, 2001; Howard, 2002; Gunatillake, 2003; Santerre, 2005;) i la reacció de polimerització es pot produir a la interfície de les gotes de les emulsions com en el cas dels alquilcianoacrilats per donar lloc a les nanopartícules (Bouchemal, 2004; Torini, 2005; Bouchemal, 2006; Zanetti- Ramos, 2006).

D'acord amb els estudis desenvolupats per Tiarks et al. (2001), per a que la reacció de polimerització en emulsió sigui possible s'han de complir els següents requeriments:

- 1- Els monòmers responsables de la reacció de polimerització han de presentar una baixa solubilitat en aigua.
- 2- La reacció de polimerització entre el diisocianat i els grups hidroxil o amino ha de transcórrer més lentament que el procés d'emulsificació.
- 3- La reacció secundària que té lloc com a conseqüència de la difusió del diisocianat cap a la fase aquosa ha de ser més lenta que la reacció responsable de la formació de poliuretans o poliurees. La difusió del diisocianat cap a la fase aquosa dona lloc a urea disubstituída.

Considerant aquests requeriments, es va seleccionar com a monòmer el diisocianat d'isoforona, ja que durant la síntesi de poliuretans reacciona més lentament amb l'aigua que altres diisocianats (Torini, 2005) i en ser un diisocianat de tipus alifàtic presenta un nivell de toxicitat inferior al dels diisocianats aromàtics (Guntillake, 2003; Guan, 2005).

Es van seleccionar diversos excipients i biomaterials que presenten grups hidroxil o grups amina a la seva estructura química, per a poder reaccionar amb el diisocianat d'isoforona. Els excipients amb grups OH seleccionats van ser els polietilenglicols (PEG 200 i PEG 400) i els biomaterials amb grups  $\text{NH}_2$  van ser, la lisina, la biotina i l'estreptavidina. L'elecció d'aquests components és especialment important ja que en l'elaboració de nanopartícules com a sistemes d'alliberació de fàrmacs, el fet que la superfície de les nanopartícules estigui recoberta amb molècules de caràcter hidròfil o neutre pot prevenir l'opsonització i el consegüent reconeixement de les cèl·lules del sistema reticuloendotelial, evitant així, l'eliminació de les nanopartícules de la circulació sanguínia (Gref, 1995; Fontana, 2001; Vonarbourg, 2006, Kumari, 2010).

### **4.2.2.1. Mecanisme de polimerització proposat i partícules obtingudes**

Abans d'iniciar-se el procés de polimerització, es van preparar les nano-emulsions a 25°C per mètodes de baixa energia mitjançant addicions successives de la fase aquosa sobre la mescla Miglyol 812/Tween 80/IPDI homogeneïtzant després de cada addició amb agitació mecànica, com s'especifica a l'apartat corresponent d'experimental (3.3.2). Seguint aquest procediment es van obtenir composicions isòtropes, líquides, de baixa polidispersitat i completament transparents amb una mida de partícula compresa entre 7 i 14 nm que corresponen a nano-emulsions.

Les nano-emulsions sense la isoforona incorporada es van sotmetre a les condicions experimentals requerides per a la formació de nanopartícules, per comprovar si es mantenia la integritat de les gotes. Es va determinar la mida de gota a 25°C, a 70°C i novament a 25°C després de refredar-les en un bany termostatat. Tant la composició de les formulacions com la seva caracterització per DLS es troba detallada a la taula XXIV. A 70°C es va observar un lleuger increment (5-8 nm) del diàmetre de gota respecte als valors obtinguts a 25°C. El diàmetre de gota de les nano-emulsions a 25°C, després d'haver-les escalfat fins a 70°C i refredat posteriorment, va ser el mateix que abans d'efectuar el tractament.

**Taula XXIV:** Composició, diàmetre de les gotes i índex de polidispersitat (p) de nano-emulsions amb un 90% p/p d'aigua, determinats a 25°C i a 70°C per Dynamic Light Scattering.

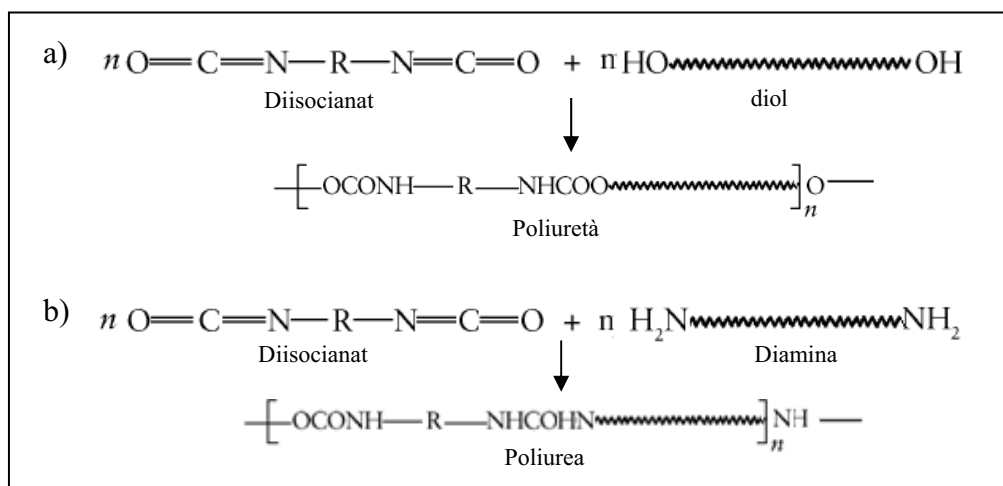
Composició nano-emulsions <sup>1</sup>		Determinació per Dynamic Light Scattering <sup>2</sup>			
Relació O/T	Biomaterials (% p/p)	25°C		70°C	
		Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	p	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	p
10/90	—	13,64	0,145	18,10	0,195
10/90	PEG 400 (0,80)	12,00	0,167	16,70	0,130
10/90	Lys (0,30)*	7,48*	0,212*	8,14*	0,111*
10/90	Biotina (0,12)	11,20	0,177	19,30	0,202
10/90	Estreptavidina (1,20*10 <sup>-3</sup> )	11,30	0,164	16,00	0,177

<sup>1</sup>: Totes les nano-emulsions estudiades corresponen al sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812.

<sup>2</sup>: Les determinacions es van realitzar el mateix dia de preparació de les formulacions.

\*: Els valors obtinguts per a la composició amb lisina no es poden considerar del tot fiables ja que la composició es trobava pràcticament al límit de detecció de l'equip. Els valors indicats no corresponen al Z-Average sino al pic màxim.

La reacció química de polimerització per a la formació dels poliuretans i poliurees consisteix en l'atac nucleòfil de l'oxigen dels grups hidroxils (polietilenglicols i tensioactius) o el nitrogen dels grups amino (lisina, biotina i estreptavidina) sobre el carboni dels grups  $-N=C=O$  del diisocianat d'isoforona per formar els polímers corresponents, com es pot observar a les reaccions generals de la figura 4.48 (Ionescu, 2005, Vermette, 2001).



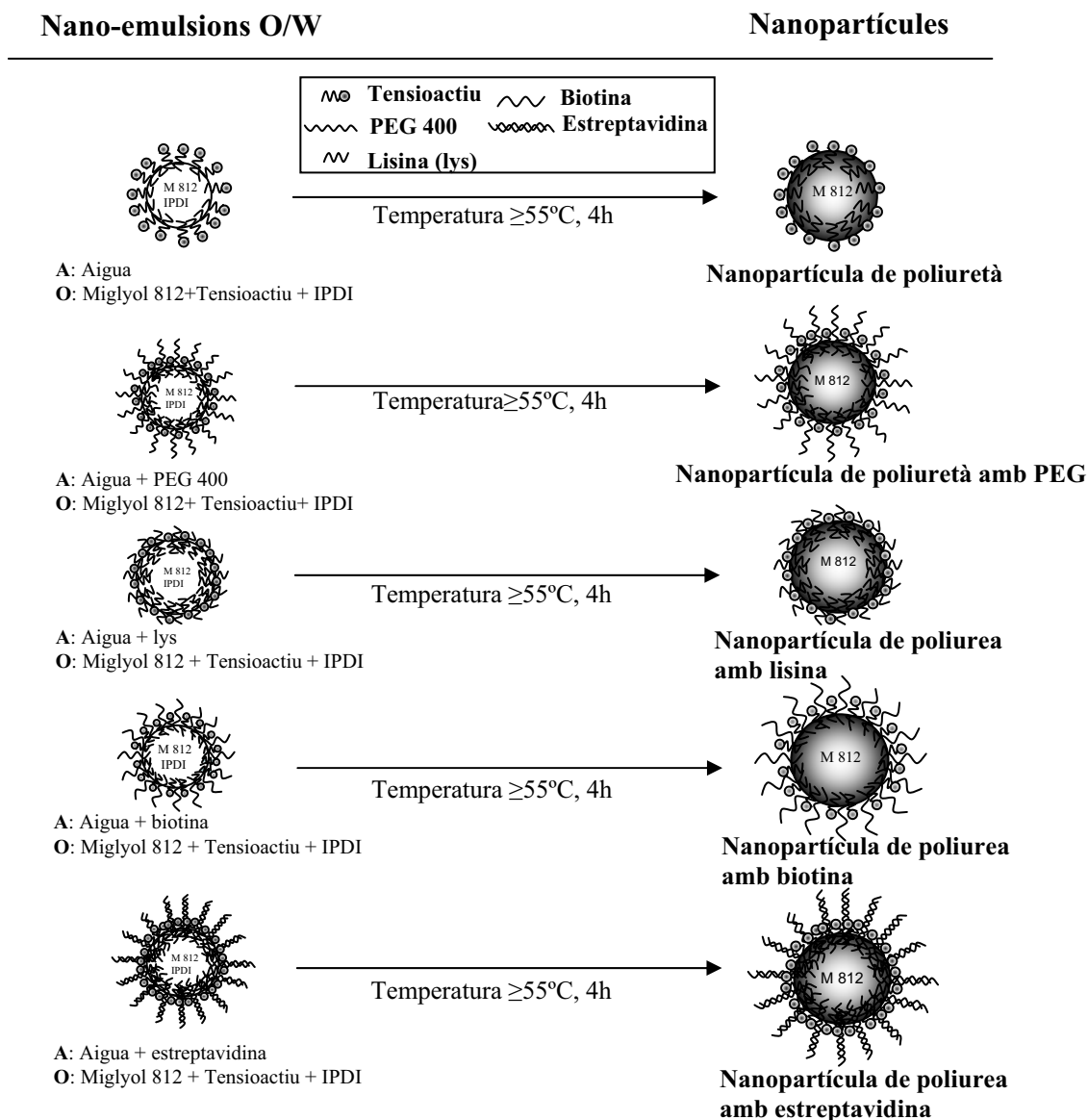
**Fig. 4.48:** Esquema de la síntesi de (a) poliuretà i (b) poliurea a partir de diisocianat i diol i de diisocianat i diamina respectivament.

En les nano-emulsions O/W seleccionades per a la preparació de nanopartícules, el diisocianat es troba solubilitzat preferentment a l'interior de les gotes de Miglyol 812 ja que s'ha comprovat experimentalment que el diisocianat d'isoforona és miscible en

aquest oli a la concentració utilitzada i és pràcticament insoluble en aigua (Johnsen, 2007; Merck, 2010).

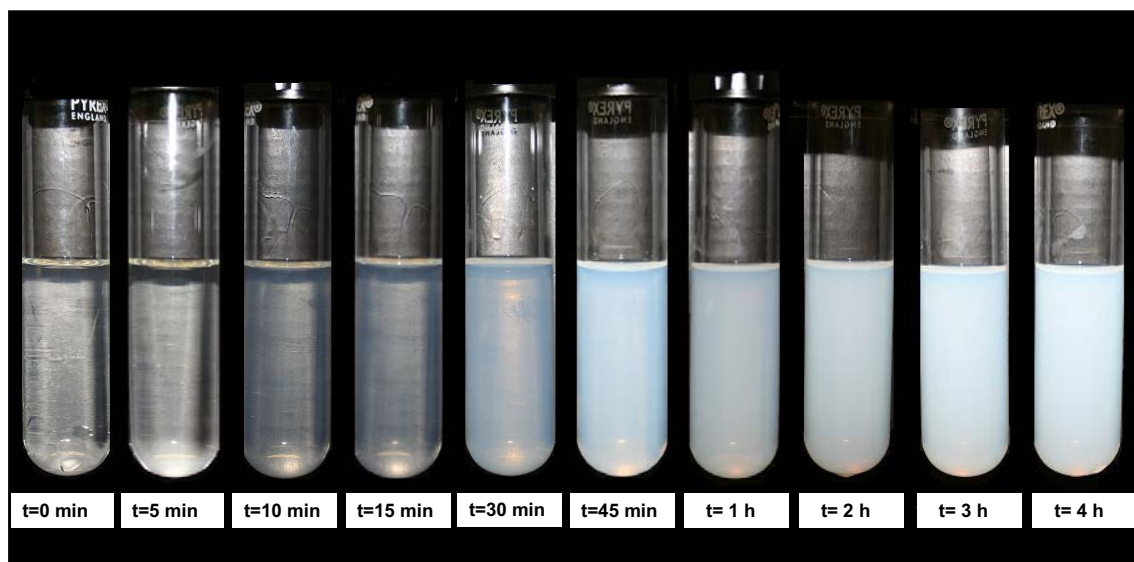
En estar el diisocianat dintre de les gotes d'oli, reaccionarà més fàcilment amb l'oli i amb els compostos de la interfície i la difusió cap a l'aigua serà lenta, evitant la formació de productes secundaris tals com la urea disubstituïda, que es forma per reacció de l'isocianat amb aigua tal com s'indica a la figura 1.15. D'acord amb els estudis de Barrère et al. (2003) per a obtenir un embolcall polímeric ben definit constituït per polímers o co-polímers d'elevat pes molecular, és molt important reduir aquesta reacció secundària amb l'aigua.

En la policondensació interfacial, el diisocianat d'isoforona solubilitzat a la fase oliosa com a conseqüència de l'increment de temperatura, tendeix a difondre cap a la fase aquosa per un mecanisme de difusió passiva (Frère, 1998; Tiarks, 2001; Bouchemal, 2004). Com el diisocianat està localitzat preferentment a l'interior de les gotes de Miglyol, l'increment de temperatura afavoreix aquesta difusió cap a l'aigua i per tant la polimerització interfacial. Com ja s'ha explicat, els diisocianats també poden reaccionar amb l'aigua donant lloc a l'urea disubstituïda, estant les dues reaccions en competència (Jabbari, 2000; Tiarks, 2001; Barrère, 2003; Bouchemal, 2004). Per tant, existirà una temperatura òptima que s'haurà d'assolir per a què la difusió cap a l'aigua tingui lloc i no sigui massa ràpida, de manera que la reacció que predomini sigui la policondensació interfacial. Quan es sotmet el sistema a aquesta temperatura ideal s'afavoreix que el diisocianat pugui reaccionar amb les molècules localitzades a la interfície a través dels grups hidroxil presents en el tensioactiu (Tween 80 o Cremophor EL) i en el PEG 400, o amb els grups amino de la lisina, la biotina o l'estreptavidina, depenent de la composició de les gotes de nano-emulsió emprades com a nanoreactors. Així, s'aconsegueix la formació de nanopartícules amb diferents estructures: poliuretans i poliurees (Hong, 1999; Bouchemal, 2004; Durrieu, 2004; Zanetti-Ramos, 2006) que es troben representades a la figura 4.48.



**Fig. 4.48:** Esquema de la formació de nanopartícules a partir de nano-emulsions O/W amb diferents components. A: Fase aquosa, O: Fase oliosa.

El procés de polimerització s'inicia sense la necessitat d'emprar cap catalitzador quan la temperatura supera els  $55^{\circ}\text{C}$ . Durant el procés de polimerització es va observar com anava disminuint la transparència inicial de les composicions durant aproximadament la primera hora fins esdevenir translúcides i romandre finalment amb un aspecte blau-blanquinós (Fig 4.49). Després de 2-3 hores gairebé no s'observaven canvis d'aspecte, però la temperatura seleccionada es va mantenir durant un període de 4 hores per assegurar la correcta formació de l'embolcall polimèric de les nanopartícules ja formades d'acord amb els estudis de diversos autors (Landfester, 2000; Tiarks, 2001; Barrère, 2003; Torini, 2005; Zanetti-Ramos, 2006).



**Figura 4.49:** Estudi de l'evolució de la polimerització en funció del temps a una temperatura de 70°C. La imatge a temps 0 correspon a la nano-emulsió O/W.

Barrère i Landfester (2003) van proposar com a paràmeters crítics per a la preparació de nanopartícules de poliuretà i poliurea a partir de nano-emulsions: la temperatura, la naturalesa de la interfície de les gotes (dependrà de les característiques del tensioactiu), el component oliós seleccionat per a solubilitzar el diisocianat; la concentració de tensioactiu i la concentració del diisocianat i dels biomaterials que participen en la reacció de polimerització.

Per tant, els factors que poden influir en el procés de polimerització per a la formació de nanopartícules de poliuretà i poliurea per policondensació interfacial en nano-emulsions O/W són principalment:

- Tipus i concentració de tensioactiu.
- Presència, tipus i concentració de biomaterial (PEG, lys, biotina, estreptavidina).
- Concentració del monòmer (IPDI).
- Temperatura de polimerització.

La influència d'aquests factors s'ha estudiat en la formació de nanopartícules de poliuretà i poliurea, tal com es detalla en els següents apartats.



#### 4.2.2.2. Preparació de nanopartícules de poliuretà (PU)

Es va estudiar la formació de nanopartícules de PU en les nano-emulsions constituïdes per aigua/ tensioactiu (Tween 80 o Cremophor EL)/ component oliós que contenen diisocianat d'isoforona solubilitzat. La reacció entre l'IPDI i el tensioactiu no havia estat considerada en les fonts bibliogràfiques consultades (Landfester, 2000; Tiarks, 2001; Barrère, 2003; Torini, 2005; Zanetti-Ramos, 2006, 2008), ja que els components utilitzats per la reacció de polimerització (diols o diamines) presentaven una elevada hidrofobicitat i la polimerització tenia lloc a l'interior de les gotes de la nano-emulsió. En aquests estudis el tensioactiu únicament exercia una funció estabilitzant de les nanopartícules obtingudes. En el present estudi, s'ha considerat oportú estudiar la possible formació de nanopartícules de PU per la reacció de l'IPDI i els grups hidroxil del tensioactiu.

Com a sistemes per a la preparació de nanopartícules de PU a partir de nano-emulsions de fase externa aquosa es van seleccionar els següents :

- Aigua/ Tween 80/ Miglyol 812
- Aigua/ Cremophor EL / Miglyol 812

Per a la preparació de nanopartícules de PU, no es van considerar els sistemes amb Lutrol F68 com a co-tensioactiu degut a les dificultats que suposava la formació de les nano-emulsions amb aquest co-tensioactiu, que és sòlid a temperatura ambient, a 25°C i a temperatures inferiors.

D'acord amb els resultats obtinguts per diversos autors (Landfester, 2000; Tiarks, 2001; Barrère, 2003; Torini, 2005; Zanetti-Ramos, 2006; Crespy, 2007; Johnsen, 2007; Gaudin, 2008), per a que la reacció de polimerització entre els grups hidroxils (en aquest cas dels tensioactius) i el grup diisocianat (IPDI) es produeixi sense la necessitat d'addicionar un catalitzador, les formulacions s'han de sotmetre a una temperatura compresa entre 40°C i 70°C. La temperatura de polimerització seleccionada inicialment va ser de 70°C per a facilitar la difusió del diisocianat a través de la interfície de les gotes i la correcta formació de les nanopartícules.

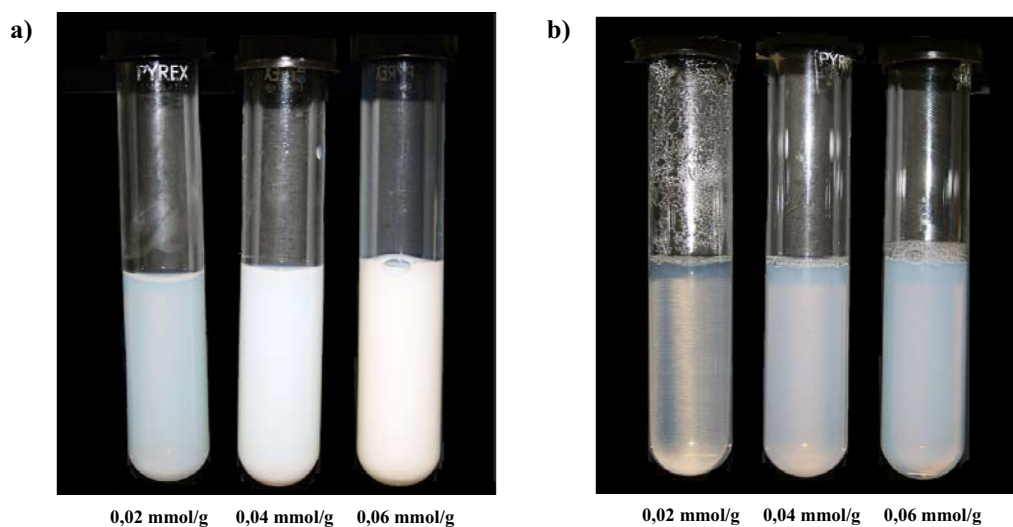
La composició de les nano-emulsions seleccionades per a la preparació de les nanopartícules es troba detallada a la taula XXV.

**Taula XXV:** Composició de les nano-emulsions seleccionades per la preparació de nanopartícules de PU.

Aigua (%, p/p)	Tensioactiu	Component oliós	Relació O/T
90	Tween 80	Miglyol 812	10/90
90	Cremophor EL	Miglyol 812	10/90
90	Cremophor EL	Miglyol 812	20/80
90	Cremophor EL	Miglyol 812	30/70

Les nano-emulsions es preparen a una temperatura  $\leq 25^{\circ}\text{C}$  per a evitar que el diisocianat incorporat a la fase oliosa pugui reaccionar amb el tensioactiu i que la polimerització es produeixi abans del procés d'emulsificació (Landfester, 2000; Tiarks, 2001; Zanetti-Ramos, 2006).

Les nano-emulsions detallades a la taula XXV es van preparar a  $25^{\circ}\text{C}$  amb diferents concentracions de diisocianat d'isoforona compreses entre 0,02 mmol/g i 0,1 mmol/g pel procediment explicat al capítol 3.3.3.2. A la Fig.4.50 es mostra l'aspecte d'algunes de les composicions obtingudes amb la relació O/T: 10/90 dels sistemes amb Tween 80 (a) i amb Cremophor EL (b) després de 4 hores de polimerització.



**Figura 4.50:** a) Composicions amb una concentració d'IPDI de 0,02 mmol/g, 0,04 mmol/g i 0,06 mmol/g i una relació O/T: 10/90 del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812 i b) Composicions amb una concentració d'IPDI de 0,02 mmol/g, 0,04 mmol/g i 0,06 mmol/g i una relació O/T: 10/90 del sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812.

Com es pot observar a la Fig 4.50, les composicions obtingudes amb Tween i amb Cremophor EL després de la polimerització presenten diferències en el seu aspecte. Les composicions amb Cremophor EL a 25°C són líquides, transparents o translúcides i blavoses mentre que amb Tween 80 varien des de translúcides i blavoses fins a blanques i opaques. Aquestes diferències es van confirmar determinant el diàmetre de partícula a 25°C per DLS.

A la taula XXVI es mostren els diàmetres de partícula obtinguts després de la polimerització (70°C durant 4h).

**Taula XXVI:** Diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats a 25°C per DLS, de nanopartícules preparades amb Tween 80 o amb Cremophor EL amb una concentració creixent de diisocianat d'isoforona.

Concentració IPDI	Sistema amb Tween 80		Sistema amb Cremophor EL					
	O/T: 10/90		O/T: 10/90		O/T: 20/80		O/T:30/70	
	Z-Average (nm)	p	Z-Average (nm)	p	Z-Average (nm)	p	Z- Average (nm)	p
0,02 mmol/g	83,0	0,148	32,8	0,244	25,1	0,170	—	—
0,04 mmol/g	93,4	0,075	50,4	0,240	37,4	0,224	31,4	0,148
0,06 mmol/g	152	0,028	51,1	0,130	38,7	0,143	34,2	0,137
0,08 mmol/g	187	0,070	52,8	0,119	38,3	0,108	—	—
0,10 mmol/g	—	—	50,0	0,085	39,0	0,109	—	—

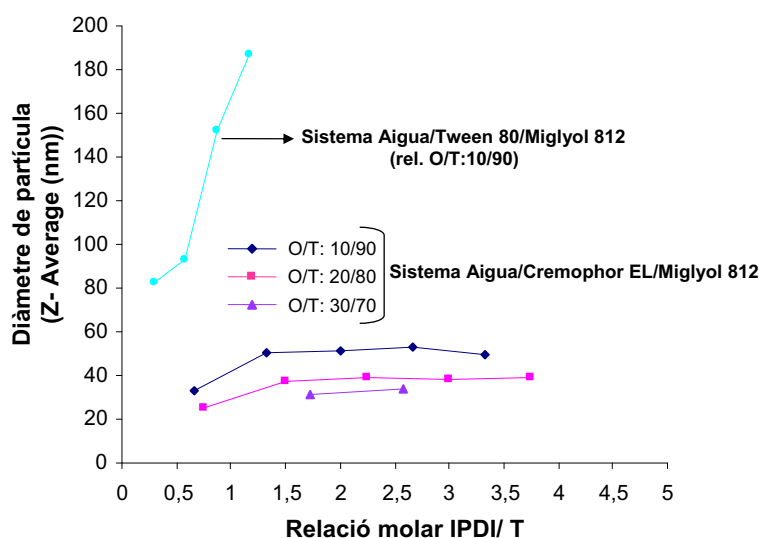
Malgrat que la mida de les nano-emulsions dels sistemes amb Tween 80 i Cremophor EL és similar ( $12,64 \pm 1,18$  nm amb Tween 80 i  $14,71 \pm 0,61$  nm amb Cremophor EL), les nanopartícules obtingudes amb Tween 80 com a reactiu són de mida notablement superior a les que es formen amb Cremophor EL. Cal destacar que tot i obtenir-se nanopartícules de mida més petita en el sistema amb Cremophor EL, els índex de polidispersitat són més elevats i per obtenir una polidispersitat inferior a 0,150 (població única i amb una estreta distribució del diàmetre de partícula) es requereixen concentracions de monòmer entre 3 i 4 vegades superiors a la que es necessita amb el Tween 80 per a la formació de nanopartícules amb un diàmetre de partícula homogeni.

L'augment de la concentració de diisocianat en el sistema amb Tween 80 es manifesta amb un increment del diàmetre de partícula determinat per DLS. La formació de nanopartícules amb Tween 80 per a la concentració de 0,1 mmol d'IPDI/g no va ser possible, ja que la nano-emulsió obtinguda prèvia polimerització presentava un aspecte tèrbol i es va descartar.

En el sistema amb Cremophor EL, per a totes les relacions oli/tensioactiu estudiades, s'observa un augment inicial del diàmetre de partícula en incrementar la concentració d'IPDI fins assolir una determinada concentració a partir de la qual la mida de partícula s'estabilitza. Per la relació O/T 30/70, no es van considerar les concentracions més elevades (0,08 mmol/g i 0,1 mmol/g) per l'aspecte inicial de la nano-emulsió, ja que les mescles amb l'IPDI incorporada prèviament a la polimerització eren més translúcides que les obtingudes amb concentracions més baixes de monòmer.

Cal destacar que en les nanopartícules amb Cremophor EL com a tensioactiu, l'augment de la concentració de monòmer porta a una disminució de l'índex de polidispersitat sense que s'incrementi el diàmetre de partícula. La població de nanopartícules obtinguda sembla ser cada vegada més homogènia i amb un embolcall polimèric més definit.

A la figura 4.51 s'ha representat el diàmetre de partícula (Z-Average) determinat per DLS de cadascuna de les composicions estudiades en funció de la relació molar IPDI/tensioactiu.



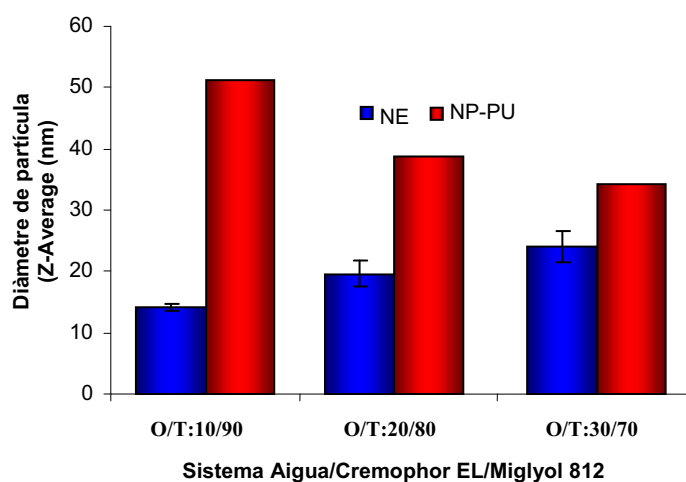
**Figura 4.51:** Diàmetre de partícula en funció de la relació molar diisocianat d'isoforona/tensioactiu per a composicions del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812.

Si s'observen les relacions molars teòriques entre el diisocianat i el tensioactiu determinades per a cada concentració sembla ser que el diàmetre de partícula roman constant per a relacions superiors a 1 (sistema amb Cremophor EL). Diferents autors (Zdrahala, 1999; Tiarks, 2001; Zanetti- Ramos, 2006) han descrit la relació molar 1 com a òptima per a la preparació de poliuretans. En el cas del sistema amb Tween 80, les relacions molars en tots els casos van ser inferiors a la relació molar a partir de la qual la mida de partícula no varia i això podria explicar l'increment del diàmetre de partícula en

augmentar la concentració de monòmer en relació al sistema amb Cremophor EL. Per a l'última concentració estudiada (0,08 mmol/g), es va obtenir un valor de relació molar de 1,16. No es van poder preparar concentracions superiors.

En el sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812, si es comparen les diferents relacions O/T (10/90, 20/80, 30/70), s'observa una disminució del diàmetre de partícula en disminuir la concentració de tensioactiu per a les diferents concentracions d'IPDI estudiades.

A la figura 4.52 s'ha representat el diàmetre de partícula de les nano-emulsions inicials i les nanopartícules obtingudes en funció de la relació O/T per a la concentració d'IPDI de 0,06 mmol/g del sistema amb Cremophor EL. Per a aquesta concentració s'han obtingut sistemes de baixa polidispersió amb valors d'índex de polidispersitat inferiors a 0,150.



**Fig.4.52:** Z-Average de les nano-emulsions abans de polimeritzar i de les nanopartícules corresponents en funció de la relació O/T per a la concentració d'IPDI de 0,06 mmol/g del sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812.

Com es pot observar a la figura 4.52, el diàmetre de les nanopartícules disminueix amb la relació O/T a diferència del que succeeix amb les nano-emulsions. Les diferències de diàmetre entre les nano-emulsions prèvies i les nanopartícules són més petites com més elevada és la relació O/T, arribant-se a obtenir nanopartícules amb una mida relativament propera a la de la nano-emulsió per a la relació O/T: 30/70 (aproximadament 10 nm de diferència).

#### 4.2.2.3. Preparació de nanopartícules de poliuretà amb polietilenglicol (PU PEG)

Després d'estudiar la formació de nanopartícules de poliuretà (PU) per la reacció dels tensioactius amb l'IPDI es va estudiar la influència en la formació d'aquestes partícules d'un component amb grups hidroxil a la molècula. Així, per a la preparació de les nanopartícules es va seleccionar el polietilenglicol 400 ja que s'ha descrit com eficaç per recobrir la superfície d'aquestes, evitant que siguin reconegudes per les cèl·lules del sistema reticuloendotelial i incrementant així el seu temps de permanència al torrent sanguini (Illum, 1986; Gref, 1994; Bazile, 1995; Gref, 2000, Fontana, 2001; Gref, 2003; Owens, 2006). L'estequiometria entre l'IPDI i el PEG 400 s'ha mantingut 1:1 en concordança amb els estudis desenvolupats per Bouchemal et al. (2004) que van sintetitzar nanocàpsules de poliuretà amb diisocianat d'isoforona i polietilenglicols de diferent pes molecular.

Les nano-emulsions amb un 90% d'aigua es van preparar amb una concentració de PEG 400 i d'IPDI de 0,06 mmol/g pel mètode descrit al capítol 3.3.3.2. Es va seleccionar la concentració de 0,06 mmol/g d'IPDI ja que correspon a la concentració mínima necessària per a obtenir nanopartícules de baixa polidispersitat amb Cremophor EL. Per a formar les nanopartícules, es va utilitzar el mateix mètode de preparació descrit anteriorment. Després de ser preparades les formulacions es van deixar reposar en un bany termostatat a 25°C. Les nano-emulsions i les nanopartícules obtingudes es van caracteritzar per DLS determinant a 25°C el diàmetre de gota o de partícula i l'índex de polidispersitat. A la taula XXVII es pot observar tant la composició de les formulacions com els resultats obtinguts.

**Taula XXVII:** Composició, diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats a 25°C per DLS de nano-emulsions i nanopartícules. La concentració de PEG 400 i d'IPDI per a totes les formulacions va ser de 0,06 mmol/g.

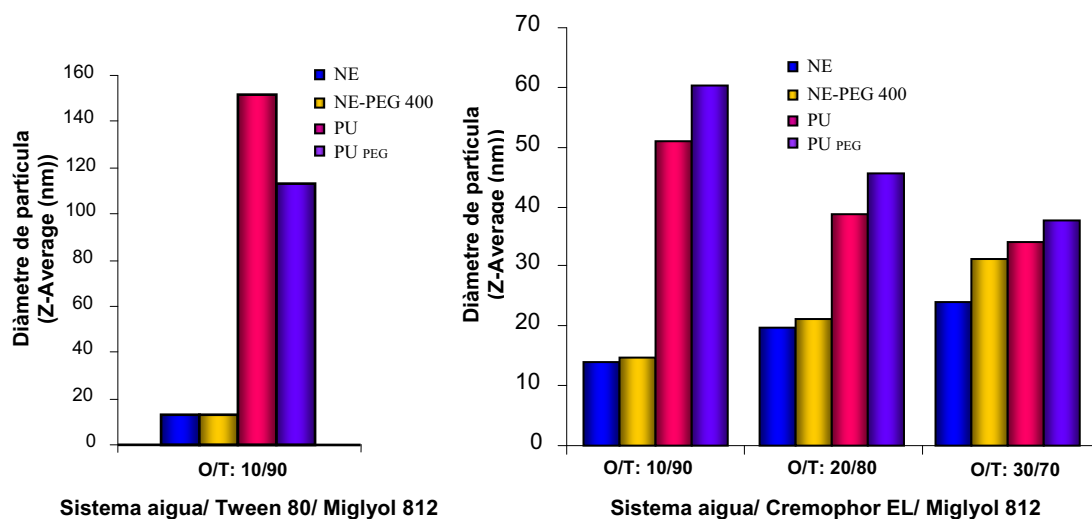
Relació Oli/Tensioactiu	Nano-emulsions <sup>1</sup>		Nanopartícules <sup>1</sup>	
	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	P	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	13,06	0,176	113,00	0,084
Miglyol 812/Cremophor EL: 10/90	14,66	0,114	60,20	0,137
Miglyol 812/Cremophor EL: 20/80	21,05	0,072	45,70	0,194
Miglyol 812/Cremophor EL: 30/70	31,30	0,189	37,30	0,170

<sup>1</sup>:La caracterització es va realitzar just després de preparar les composicions, després de deixar-les refredar a 25°C en un bany termostatat.

La diferència entre les dues primeres composicions radica únicament en el tensioactiu no iònic utilitzat. Si es comparen aquestes dues formulacions es pot observar que les nanopartícules amb un diàmetre de partícula més gran però una polidispersitat més baixa ( $<0,1$ ) s'han obtingut per a les composicions amb Tween 80 com a tensioactiu per a la mateixa concentració de PEG/IPDI, relació O/T i temperatura. Tenint en compte que no s'han observat diferències importants en el diàmetre de gota de les nano-emulsions inicials (13,06 nm i 14,66 nm), l'obtenció de nanopartícules de diferent mida podria explicar-se per la influència del tensioactiu en el procés de polimerització. A l'apartat anterior ja es va constatar que les nanopartícules formades a partir de nano-emulsions amb Tween 80 eren d'una mida més gran que les que tenien Cremophor EL a la seva composició. Per altra banda, mantenint les condicions experimentals, s'han observat diferències en el diàmetre de gota entre les nanopartícules de PU PEG (113 nm per al Tween 80 i 60,2 nm per al Cremophor EL) i les de PU estudiades al capítol anterior (152 nm en el cas de composicions amb Tween 80 i 51,1 nm per al Cremophor EL) indicant que el PEG 400, també intervé en la reacció de polimerització. Per tant, l'embolcall polimèric podria estar constituït per unitats d'uretà derivades de la reacció de l'IPDI amb el tensioactiu i d'unitats d'uretà que provenen de la reacció amb el PEG.

En el sistema amb Cremophor EL s'ha estudiat també la influència de la relació O/T en la formació de nanopartícules de PU PEG. Com es pot observar a la taula XXVII, el diàmetre de partícula disminueix amb la concentració de tensioactiu, obtenint-se amb la relació O/T: 30/70 les nanopartícules de menor diàmetre. Malgrat aquest fet, es van observar fenòmens d'instabilitat cinètica (cremat) a les 24 hores en les composicions preparades amb les relacions O/T:20/80 i O/T 30/70. L'increment del diàmetre que té lloc en formar-se les nanopartícules també és inferior com més elevada és la relació O/T. Per a la relació O/T: 10/90 es van obtenir nanopartícules 4 vegades més grans que les nano-emulsions, per a la 20/80, 2 vegades més grans i per a la 30/70 la mida de les nanopartícules i les gotes de la nano-emulsió va ser del mateix ordre. Aquesta mateixa tendència ja s'havia observat a l'apartat anterior en la preparació de nanopartícules sense PEG.

A la figura 4.53 s'ha representat el diàmetre de partícula de les nano-emulsions amb i sense PEG 400, i de les corresponents nanopartícules de PU i PU PEG (concentració d'IPDI de 0,06 mmol/g) dels sistemes amb Tween 80 i Cremophor EL.



**Figura 4.53:** Diàmetre de partícula de nano-emulsions i nanopartícules preparades amb i sense PEG 400 per a diferents relacions O/T del sistema aqua/ Tween 80/ Miglyol 812 i aqua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 .

Com es pot observar a la Fig 4.53, en el sistema amb Tween 80, la incorporació de PEG 400 a la formulació no suposa una modificació del diàmetre de les gotes de la nano-emulsió inicial. En canvi, una vegada ha tingut lloc la polimerització, es van obtenir nanopartícules de mida més petita a partir de la nano-emulsió O/W que contenia PEG 400 a la seva composició. Tenint en compte que ambdues composicions es van preparar amb la mateixa concentració de tensioactiu i d'IPDI i es van sotmetre a la mateixa temperatura de polimerització, la reducció del diàmetre sembla ser deguda a l'efecte del PEG 400.

En el sistema amb Cremophor EL, per contra del que succeeix amb el Tween 80, s'han observat petites diferències en la mida de gota de les nano-emulsions preparades amb i sense biomaterial per a totes les relacions O/T estudiades. Aquest fet suggereix que el PEG 400 podria adoptar una disposició diferent en la interfície de les gotes en funció del tensioactiu utilitzat. També és important considerar el repartiment dels reactius a la nano-emulsió per a diferents concentracions de tensioactiu.

Si es comparen les nanopartícules de PU i PU PEG preparades en les mateixes condicions experimentals, les que contenen el biomaterial a la seva composició (PU PEG) presenten un diàmetre de partícula lleugerament superior. Aquestes diferències en la mida de partícula entre PU i PU PEG, semblen reduir-se progressivament amb la relació O/T. De fet, amb la relació O/T:30/70, el diàmetre de partícula es va modificar



mínimament en relació a les nanopartícules preparades sense biomaterial (34,2 nm per les nanopartícules de PU i 37,3 nm per les de PU PEG).

#### **4.2.2.3.1. Influència de la concentració d'IPDI/ PEG 400 (1:1)**

S'ha estudiat l'efecte conjunt de la concentració d'IPDI i de PEG 400 en la preparació de nanopartícules de PU PEG. Per a la realització d'aquest estudi s'han seleccionat composicions amb un 90% d'aigua i una relació O/T: 10/90 per al sistema amb Tween 80 i 20/80 per al sistema amb Cremophor EL.

En el cas del sistema amb Cremophor EL s'ha seleccionat la relació 20/80 amb la finalitat de reduir la concentració de tensioactiu. S'ha triat la relació 20/80 i no la 30/70 ja que correspon a la mínima concentració de tensioactiu amb la que s'han obtingut diferències aparents en el diàmetre de partícula en relació a les nanopartícules elaborades sense cap biomaterial (veure Fig. 4.53). El fet que hi hagi diferències és indicatiu de la participació del PEG 400 en la reacció de polimerització, com ja s'ha explicat anteriorment (apartat 4.2.2.3).

Les composicions es van preparar amb diferents concentracions d'IPDI i de PEG 400 en relació molar 1 compreses entre 0,01 mmol/g i 0,1 mmol/g pel procediment explicat a l'apartat 3.3.3.2. La caracterització de les nanopartícules es va realitzar per DLS després de deixar reposar les formulacions a 25°C en un bany termostatat.

A continuació s'indicaran els resultats obtinguts en funció del tensioactiu emprat: Tween 80 o Cremophor EL.

#### ***Influència de la concentració d'IPDI/ PEG 400 (1:1) en nanopartícules amb Tween 80 com a tensioactiu***

Els resultats obtinguts (diàmetre de partícula i índex de polidispersitat) per a les composicions del sistema amb Tween 80 es troben detallats a la taula XXVIII. Les determinacions dels paràmetres morfomètrics tant de les nano-emulsions com de les nanopartícules es van realitzar per DLS a 25° C.

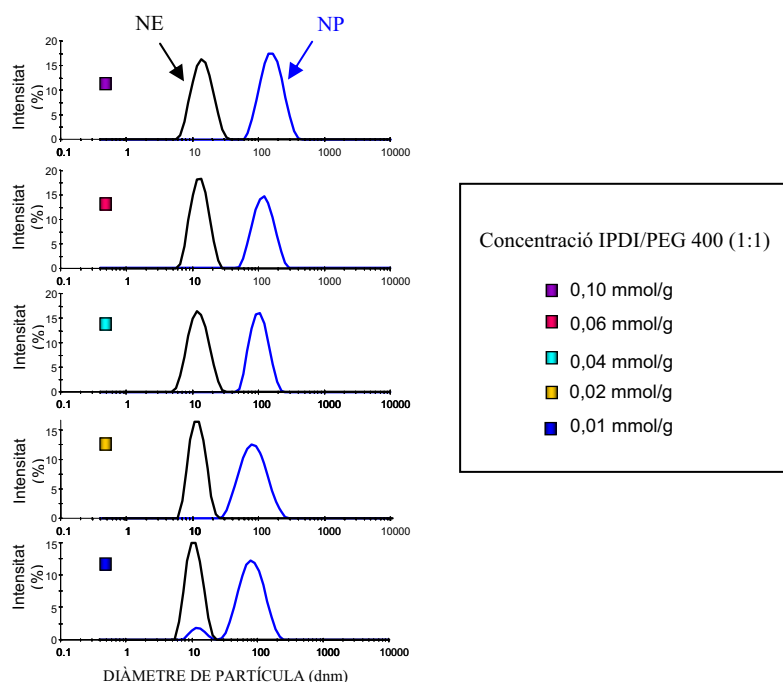
**Taula XXVIII:** Diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats a 25°C per DLS de nano-emulsions i les corresponents nanopartícules del sistema aigua /Tween 80/Miglyol 812 preparades amb diferents concentracions d'IPDI i PEG 400.

Concentració IPDI/PEG 400	Nano-emulsions		Nanopartícules	
	Diàmetre de gota (Z-Average (nm))	p	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	p
0,01 mmol/g	11,40	0,104	65,33	0,210
0,02 mmol/g	11,60	0,095	72,11	0,121
0,04 mmol/g	12,30	0,060	88,83	0,061
0,06 mmol/g	12,80	0,083	112,0	0,057
0,10 mmol/g	13,30	0,084	143,0	0,121

La incorporació de PEG 400 a la formulació no ha comportat modificacions importants en el diàmetre de gota de les nano-emulsions inicials obtenint-se mides compreses entre 11,40 i 13,30 nm (el diàmetre de les gotes de la nano-emulsió sense PEG 400 va ser de  $12,64 \pm 1,18$  nm). No obstant, s'ha observat que la mida de les gotes augmenta lleugerament amb la concentració de PEG 400. Caldria estudiar concentracions de PEG 400 superiors per a confirmar que aquesta tendència es manté però això implicaria augmentar considerablement la concentració d'IPDI per a mantenir l'estequiometria 1:1 entre el PEG 400 i el monòmer i no s'ha considerat convenient augmentar aquesta concentració per raons de toxicitat.

En el cas de les nanopartícules (obtingudes després d'escalfar les nano-emulsions a 70°C) es pot observar que l'augment de la concentració de PEG 400 i de monòmer, dóna lloc a un increment del diàmetre de partícula. Cal destacar que en el cas de les nanopartícules de PU PEG a diferència de les de PU si va ser possible la formació de partícules amb una concentració d'IPDI de 0,1 mmol/g. Les nanopartícules amb un diàmetre més petit (65,3nm) correspondrien a la concentració tant d'IPDI com de PEG 400 de 0,01 mmol/g però per aquesta concentració es va observar l'existència simultània de dues poblacions (NE i NP) detectades per DLS (Fig 4.54).

A la figura 4.54 s'han representat les corbes de distribució de mides per intensitat obtingudes per DLS de la nano-emulsió inicial i de les nanopartícules en funció de la concentració de monòmer i de biomaterial. Amb la finalitat de poder establir comparacions, a la mateixa gràfica està representada la corba de distribució corresponent a les nano-emulsions (abans de la reacció de polimerització a 70°C) i les nanopartícules obtingudes a partir d'aquestes (després de polimeritzar a 70°C).

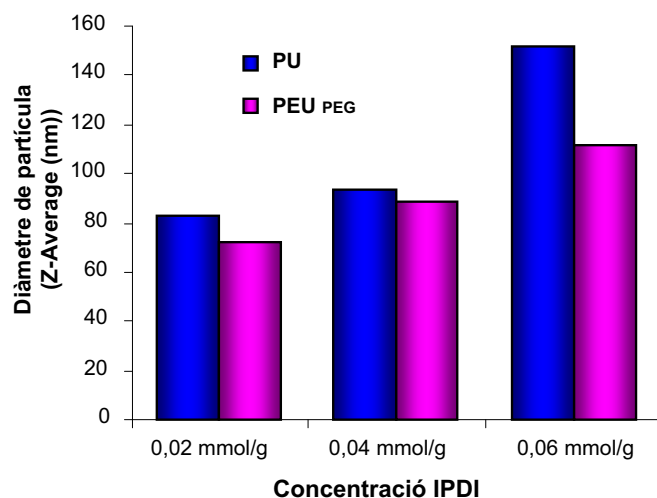


**Fig. 4.54:** Corbes de distribució de mides per intensitat obtingudes per DLS de la nano-emulsió inicial i de les corresponents nanopartícules per a cada concentració d'IPDI/PEG 400 estudiada en el sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812.

Si es comparen les corbes de distribució de diàmetre de partícula de les nano-emulsions inicials amb les corresponents nanopartícules obtingudes després de la polimerització, es poden observar per a totes les composicions excepte per a la que s'ha emprat una concentració d'IPDI/PEG 400 més baixa, dues poblacions diferenciades corresponents únicament a la nano-emulsió o a les nanopartícules. En el cas de la concentració de 0,01 mmol/g d'IPDI/PEG 400, la presència d'un pic al voltant de 12 nm que es correspon amb la nano-emulsió inicial és indicatiu que la concentració de monòmer ha resultat insuficient per a una completa polimerització. Per tant, es podria dir que la concentració d'IPDI i PEG 400 òptima (no es detecta nano-emulsió per DLS i la polidispersitat és inferior a 0,150) per a la preparació de nanopartícules de PU PEG amb aquest sistema és de 0,02 mmol/g. Per observació visual directa de les formulacions es va detectar la formació d'un precipitat sòlid amb el temps en les composicions corresponents a nanopartícules amb concentracions d'IPDI/PEG 400 superiors a 0,02 mmol/g.

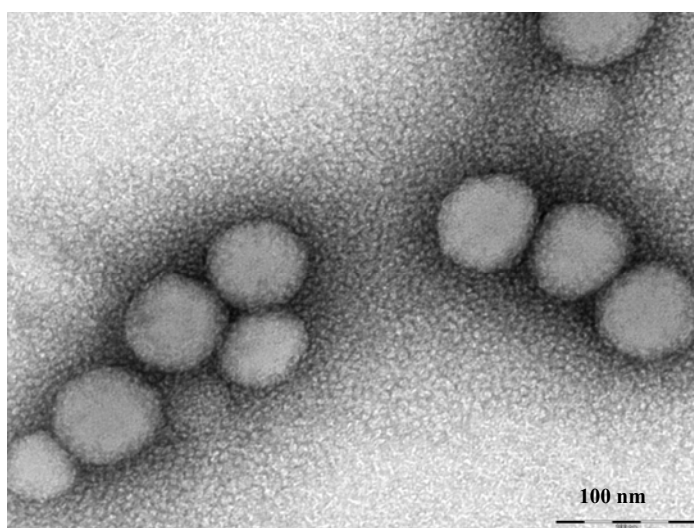
Si es comparen les nanopartícules de PU PEG amb les corresponents nanopartícules de PU (elaborades sense PEG 400) descrites a l'apartat 4.2.2.2, s'observa una reducció de la mida de partícula que s'explicaria per la reacció majoritària entre el diisocianat i els grups hidroxil del PEG 400. Aquestes diferències són especialment significatives per a la concentració d'IPDI de 0,06 mmol/g. La figura 4.55 correspon al diàmetre de

partícula determinat per DLS de nanopartícules de PU PEG i PU preparades amb diferents concentracions d'IPDI.



**Figura 4.55:** Diàmetre de partícula determinat a 25°C per DLS de nanopartícules de PU i PU PEG del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812, en funció de la concentració d'IPDI.

La composició amb una concentració d'IPDI i PEG 400 de 0,02 mmol/g (mínima concentració a partir de la qual ja no es detecta nano-emulsió per DLS i s'obtenen nanopartícules de baixa polidispersitat) es va caracteritzar també per TEM. La imatge de la figura 4.56 correspon a les nanopartícules després de ser tractades amb acetat d'uranil a l'1% (apartat 3.3.5.2).



**Fig. 4.56:** Nanopartícules de PU PEG obtingudes amb la relació O/T: 10/90 del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 per a la concentració de 0,02 mmol/g IPDI/PEG 400 després de sotmetre la composició a 70°C durant 4 hores.

En el sistema amb Tween 80 s'ha aconseguit la formació de nanopartícules de PU PEG força esfèriques, de diàmetre semblant que oscil·la entre 50 i 80 nm i amb un embolcall polimèric molt ben estructurat i definit.

***Influència de la concentració d'IPDI/ PEG 400 (1:1) en nanopartícules amb Cremophor EL com a tensioactiu***

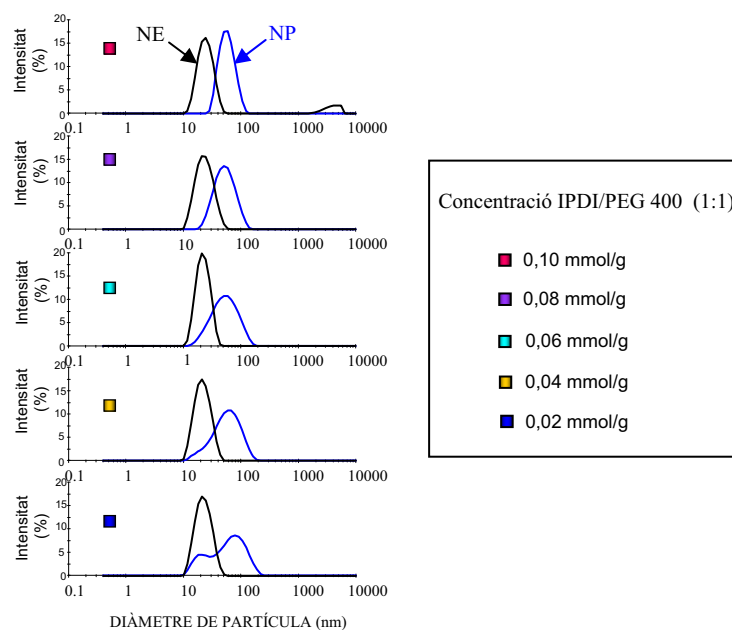
La influència de la concentració d'IPDI i de PEG 400 també s'ha estudiat en el sistema amb Cremophor EL. A la taula XXIX es poden observar els resultats corresponents al diàmetre de partícula i índex de polidispersitat de les nano-emulsions inicials i les corresponents nanopartícules preparades amb PEG 400.

**Taula XXIX:** Diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats a 25°C per DLS de nano-emulsions i nanopartícules del sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812 preparades amb diferents concentracions de PEG 400 i IPDI.

Concentració IPDI/PEG 400	Nano-emulsions		Nanopartícules	
	Diàmetre de gota (Z-Average (nm) )	p	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm) )	p
0,02 mmol/g	21,80	0,129	43,90	0,291
0,04 mmol/g	21,20	0,163	48,80	0,208
0,06 mmol/g	21,05	0,072	45,70	0,195
0,08 mmol/g	22,15	0,121	47,40	0,145
0,10 mmol/g	26,00	0,225	52,20	0,142

Per a les diverses concentracions estudiades, no s'han observat diferències importants en el valor del diàmetre promig de partícula (comprès entre 43,90-52,20 nm) malgrat incrementar la concentració de monòmer i de PEG 400 fins a 5 vegades l'inicial. Les polidispersions superiors a 0,200, en el cas de les nanopartícules, són indicatives de la presència simultània de gotes de nano-emulsió i de nanopartícules com es pot comprovar a les corbes de distribució de mida de partícula per intensitat de la Fig.4.57.

A la figura 4.57 es troben representades les corbes de distribució de mida de partícula en intensitat per a cadascuna de les diferents concentracions estudiades. Igual que per a les composicions amb Tween 80, a la mateixa gràfica s'han superposat les corbes de distribució de mida de les nano-emulsions (abans de la reacció de polimerització a 70°C) i de les nanopartícules obtingudes (després de sotmetre les composicions a 70°C).



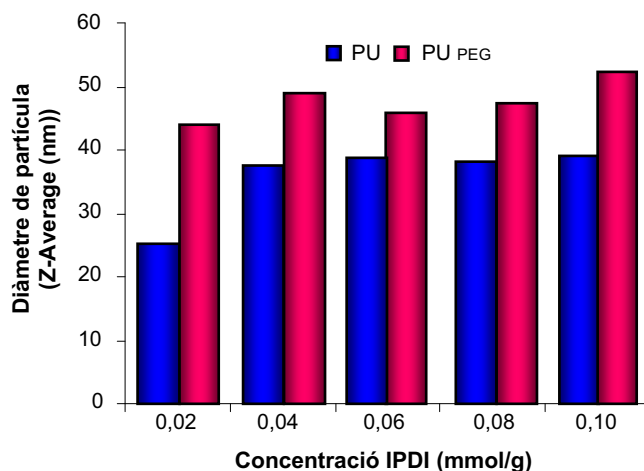
**Fig. 4.57:** Corbes de distribució de mides per intensitat obtingudes per DLS de la nano-emulsió inicial i de les corresponents nanopartícules per a cada concentració d'IPDI/PEG 400 estudiada en el sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812 .

Com es pot observar, les corbes de distribució del diàmetre de partícula corresponents a les nano-emulsions (NE) i a les nanopartícules (NP) es van diferenciant a mesura que s'incrementa la concentració de PEG 400 i IPDI, obtenint-se composicions cada vegada menys polidisperses (tots els valors de PDI obtinguts van ser superiors a 0,140). Es va observar visualment l'aparició de fenòmens de cremat a les 24 hores en aquelles formulacions amb concentracions de monòmer i PEG 400 superiors a 0,06 mmol/g que desapareixien amb una lleu agitació. Totes les mostres presentaven una petita quantitat de precipitat que s'incrementava amb la concentració de monòmer.

Les nanopartícules de mida més gran (52,20 nm) i amb una polidispersitat més baixa (0,142) es van obtenir amb la concentració de 0,1 mmol/g. Tot i que per aquesta concentració sembla observar-se un augment significatiu del diàmetre de partícula, s'ha de tenir en compte que les gotes de nano-emulsió inicials ja presentaven un valor de Z-average superior al de la resta de les composicions (26 nm enfront 21-22 nm).

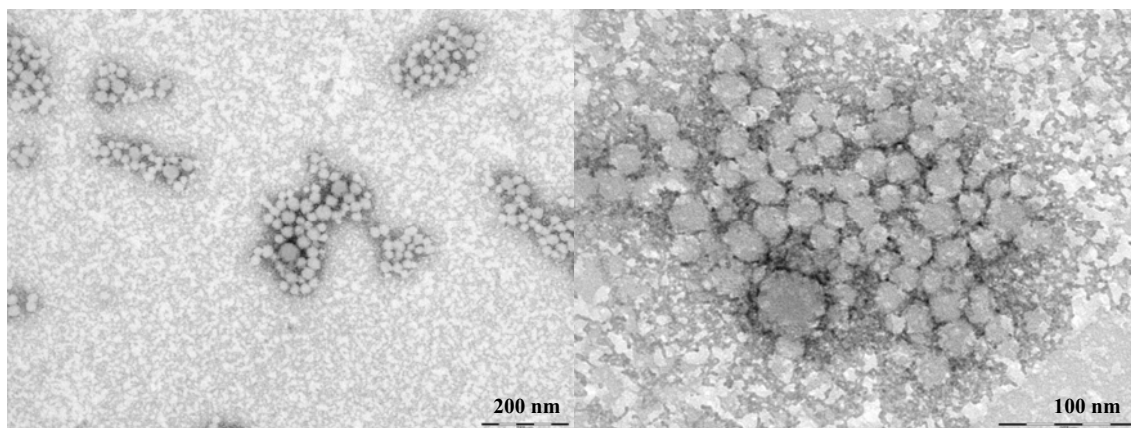
Un comportament similar ja es va observar amb les nanopartícules de PU (apartat 4.2.2.2), on a partir d'una determinada concentració de monòmer la mida de partícula roman constant. Tenint en compte que tant el PEG 400 com el tensioactiu Cremophor EL tenen grups hidroxil a la seva estructura, ambdós components estaran en competència pel monòmer i l'estequiometria de la reacció entre el PEG 400 i l'IPDI es veurà afectada. Per comparació amb els resultats obtinguts sense PEG 400 (Fig.4.58),

s'observa un increment en el diàmetre de partícula amb el PEG 400 per a totes les concentracions estudiades que podria indicar que aquest component intervé en el procés de polimerització (l'única modificació que s'ha produït en relació a les nanopartícules de PU és la incorporació de PEG 400 a la formulació). Com ja s'ha comentat a l'apartat anterior, no es pot descartar la reacció entre l'IPDI i els grups hidroxil del tensioactiu.



**Fig. 4.58:** Diàmetre de partícula determinat per DLS a 25°C de les nanopartícules de PU i PU PEG en funció de la concentració d' IPDI obtingudes a partir de nano-emulsions del sistema aigua/Cremophor EL/Miglyol 812.

La composició amb la que es va obtenir una població de NP ben diferenciada de la NE inicial (d'acord amb les corbes de distribució de mides per intensitat) i un índex de polidispersitat més baix, es va caracteritzar per TEM amb la finalitat de comprovar la correcta formació de l'embolcall polimèric. Aquesta composició correspon a la concentració d' IPDI i PEG 400 de 0,1 mmol/g. La mostra es va preparar per tinció negativa amb acetat d'uranil tal com es descriu a l'apartat 3.3.5.2. La figura 4.59 correspon a les imatges obtingudes per TEM observades a diferents augments.



**Fig. 4.59:** Nanopartícules de PU PEG obtingudes amb la relació O/T: 20/80 del sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812 per a la concentració de 0,1mmol/g IPDI/PEG 400 després de sotmetre la composició a 70°C durant 4 hores, observades per TEM a diferents augments.

A diferència de la composició preparada amb Tween 80 (Fig 4.56) on s'observaven nanopartícules isodiamètriques, molt homogènies i amb una cobertura polimèrica molt ben marcada, les nanopartícules obtingudes en el sistema amb Cremophor EL són poc homogènies, de forma irregular, poc esfèriques, de diferent mida i amb un embolcall polimèric desestructurat i poc definit.

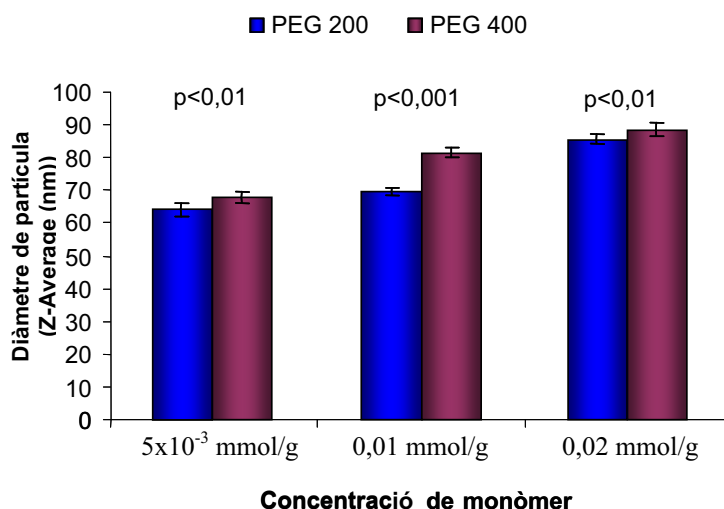
Per aquestes raons, es va decidir continuar els estudis de formació de nanopartícules de PU PEG únicament amb composicions amb Tween 80 com a tensioactiu.

#### 4.2.2.3.2. Influència del pes molecular del PEG

En el cas de les nanopartícules de PU PEG s'ha estudiat també com es modifica el diàmetre de partícula en funció del pes molecular del PEG utilitzat. Per a la realització d'aquest estudi es van seleccionar PEGs que a 20°C són líquids, com el PEG 200 i el PEG 400 .

Així, s'han preparat nanopartícules a partir de nano-emulsions amb un 90% d'aigua i una relació O/T: 10/90 del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 emprant com a biomaterial PEGs de baix pes molecular (200 g/mol i 400 g/mol). Les composicions s'han preparat per triplicat i s'han estudiat 3 concentracions d'IPDI/ PEG diferents,  $5 \cdot 10^{-3}$  mmol/g, 0,01 mmol/g i 0,02 mmol/g. S'ha determinat el diàmetre de les nanopartícules obtingudes per Dynamic Light Scattering a 25°C, 24 hores després de la seva preparació (4h a 72°C). Els resultats obtinguts es mostren a la figura 4.60.





**Fig. 4.60:** Diàmetre de les nanopartícules en funció de la concentració de monòmer i del pes molecular del PEG, per a composicions amb un 90% d'aigua i una relació O/T: 10/90 del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812. El valor de p correspon al nivell de significació determinat a partir de l'anàlisi de la variància.

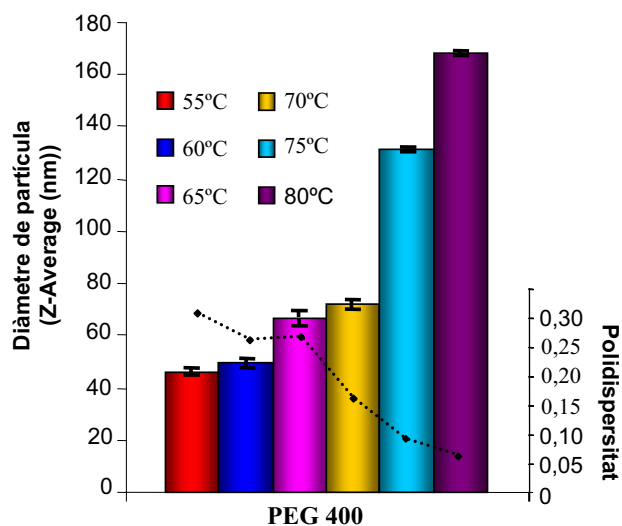
Per a totes les concentracions estudiades s'han observat diferències estadísticament significatives ( $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ ) en la mida de les partícules obtingudes en variar el pes molecular del poliòl. Per tant, el pes molecular del PEG influeix en la morfometria de les nanopartícules de PU PEG. Així, s'han obtingut nanopartícules amb un diàmetre més petit amb el poliòl de pes molecular més baix (PEG 200). L'obtenció de nanopartícules amb PEGs d'elevat pes molecular no va ser possible ja que no es van poder preparar les nano-emulsions prèvies. Els resultats obtinguts concorden amb els estudis de Bouchemal et al. (2004) en els quals la mida de les nanopartícules de poliuretà (preparades amb IPDI,  $\alpha$ -tocoferol, Span 85, acetona, aigua, PEGs i Tween 20) s'incrementava en augmentar el pes molecular del polietilenglicol. Per altra banda, com ja s'havia observat en els estudis anteriors l'augment de la concentració de monòmer i PEG independentment del seu pes molecular, també suposa un increment en el diàmetre de les nanopartícules obtingudes.

#### 4.2.2.3.3. Influència de la temperatura

S'ha estudiat l'efecte de la temperatura en la formació de nanopartícules de PU PEG a partir de nano-emulsions. Per a la preparació de les nanopartícules s'ha seleccionat la composició que presenta una relació O/T 10/90 i una concentració d'aigua del 90% p/p

del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812. S'han emprat concentracions de monòmer de 0,02 mmol IPDI/g i 0,02 mmol PEG 400/g d'acord amb el resultat obtingut de l'estudi de les concentracions (concentració mínima de monòmer necessària per obtenir nanopartícules amb una baixa polidispersitat, apartat 4.2.2.3.1). Els estudis s'han dut a terme a temperatures compreses entre 55 i 80°C. La utilització de temperatures més baixes no ha estat possible ja que no es va produir polimerització. El procés de preparació de les nanopartícules consisteix en formar inicialment les nano-emulsions a 25°C per mètodes de baixa energia amb l'IPDI i el PEG 400 incorporats i posteriorment sotmetre les formulacions a les diferents temperatures a estudiar durant un temps de polimerització de 4 hores. Les nanopartícules obtingudes es van caracteritzar per DLS.

A la Fig. 4.61 es troben representats els valors corresponents al diàmetre de partícula per a cadascuna de les formulacions estudiades i la seva polidispersitat.



**Fig. 4.61:** Diàmetre de partícula (gràfic de barres) i polidispersitat (dispersió de punts) en funció de la temperatura, determinats a 25°C per DLS, de nanopartícules amb un 90% d'aigua i una relació en pes O/T 10/90 del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812.

Com es pot observar a la Fig. 4.61, per a totes les composicions estudiades, el diàmetre promig de partícula s'incrementa amb la temperatura. Considerant els estudis realitzats per Barrère i Landfester (2003) amb nanopartícules de poliuretà sintetitzades a partir de nano-emulsions que contenien IPDI i dodecadiol solubilitzats a una fase interna d'hexadecà, l'obtenció de partícules de mida més petita a temperatures més baixes podria explicar-se de la següent manera:

Una disminució de la temperatura comportaria un alentiment del procés de polimerització ja que la difusió del diisocianat cap a la fase aquosa seria més lenta. El

monòmer, a mesura que difon, aniria interaccionant amb els biomaterials de la interfície i l'embolcall polimèric aniria creixent progressivament. Com que la reacció transcorre lentament, pràcticament tot el diisocianat s'exhauriria en el procés de polimerització, per tant la reacció amb l'aigua quasi no tindria lloc, la fusió de les gotes seria mínima i s'obtindrien partícules de PU PEG de mida més petita. Per contra, amb temperatures elevades, la polimerització és molt ràpida i el creixement de l'embolcall polimèric té lloc en un període de temps molt curt. Part del diisocianat participaria en la reacció de polimerització i part interaccionaria amb l'aigua afavorint l'apropament de les gotes ja que les espècies formades podrien continuar reaccionant amb els hidroxils presents a la interfície d'altres gotes, obtenint-se nanopartícules de PU PEG de mida superior.

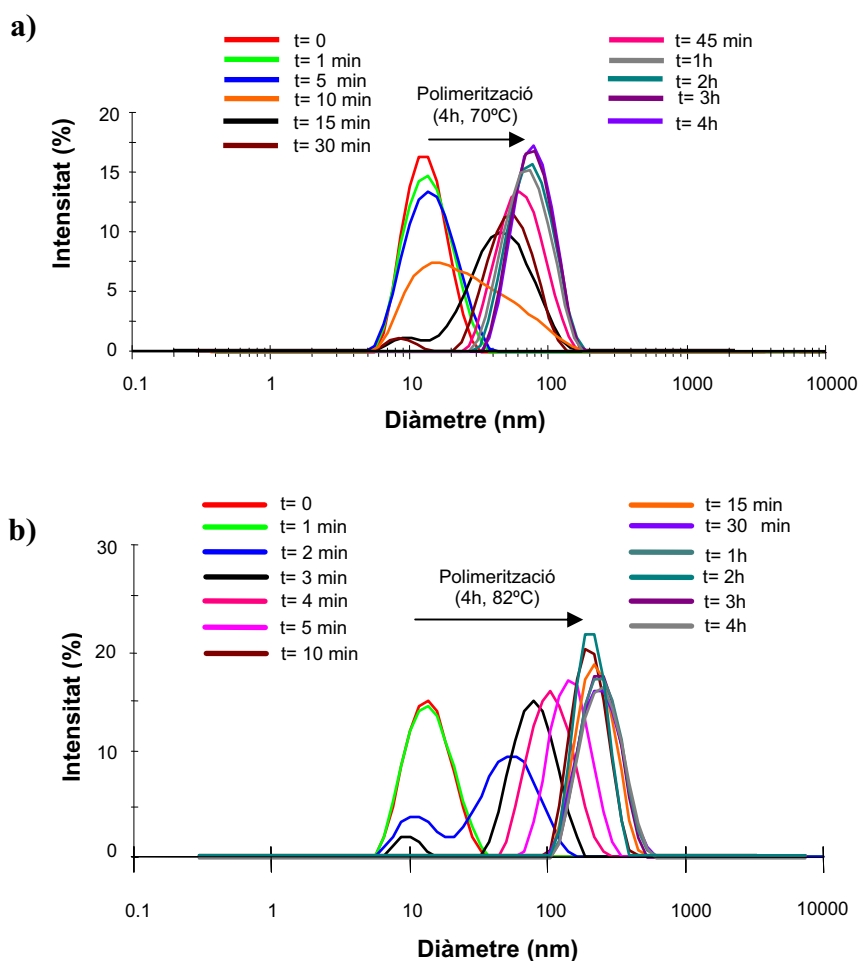
En relació als índex de polidispersitat obtinguts, únicament es van aconseguir sistemes de baixa polidispersitat (polidispersitat  $\leq 0,150$ ) quan es va treballar amb temperatures superiors a 65°C. De fet, la utilització de temperatures igual o inferiors a 65°C va donar lloc a la formació de dues poblacions detectades per DLS en l'anàlisi per intensitat, la primera entre 10-15 nanòmetres corresponent a les gotes de nano-emulsió sense polimeritzar i una segona de nanopartícules.

Després d'estudiar tot aquest rang de temperatures, es va considerar la temperatura de 70±2°C com la millor elecció per a la preparació de nanopartícules de PU PEG ja que amb aquesta temperatura s'ha aconseguit la formació de sistemes de baixa polidispersitat amb el menor diàmetre de partícula (75 nm).

El temps de polimerització s'ha considerat com un factor depenent de la temperatura i no com un paràmetre crític per si mateix. Com ja s'ha explicat, quan s'utilitzen temperatures elevades, la formació i creixement de l'embolcall polimèric s'esdeven ràpidament mentre que a temperatures baixes la reacció de polimerització s'alenteix considerablement i el creixement de la paret polimèrica és lent i progressiu. Per observar com transcorre el procés de polimerització quan s'aplica una determinada temperatura, s'ha determinat el diàmetre de partícula per DLS a diferents intervals de temps. Les temperatures seleccionades en aquest estudi van ser 70°C i 82°C.

Per a estudiar com evoluciona el procés de polimerització en funció del temps s'ha seleccionat la mateixa nano-emulsió per ambdues temperatures (composició amb una relació O/T 10/90 i una concentració d'aigua del 90% p/p del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812). Una vegada formada la nano-emulsió amb l'IPDI incorporat s'ha sotmès a la temperatura a estudiar durant un període de temps de 4 hores, extraient-se al·líqüotes

cada x temps que s'han caracteritzat per Dynamic Light Scattering. A la Fig. 4.62 es mostren els resultats obtinguts.



**Fig. 4.62.** Variació del diàmetre de partícula en funció del temps a) 70°C i b) 82°C de la composició amb un 90% d'aigua, una relació O/T 10/90 i una concentració d'IPDI/PEG 400 de 0,02 mmol/g del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812.

A 70°C (Fig. 4.62a), el procés de polimerització s'inicia quan han transcorregut uns 10 minuts aproximadament, observant-se un pic molt ample (polidispersitat entre 0,250 i 0,300) que comprèn tot el rang de mides de la nano-emulsió inicial i s'estén cap a mides superiors, indicant que es comencen a formar nanopartícules. En el transcurs de 30 min ja s'observen dues poblacions diferenciades, una corresponent al remanent de nano-emulsió i l'altra a les nanopartícules de PU PEG. Als 45 min ja no es detecta la presència de nano-emulsió i únicament s'observa el pic de les nanopartícules. A mesura que avança la reacció, aquest pic es desplaça lleugerament cap a la dreta, incrementant-se uns 10 nm la mida de partícula. Aquest procés es coneix com maduració i és l'etapa durant la qual l'embolcall polimèric acaba de formar-se. A partir de les 3 hores les

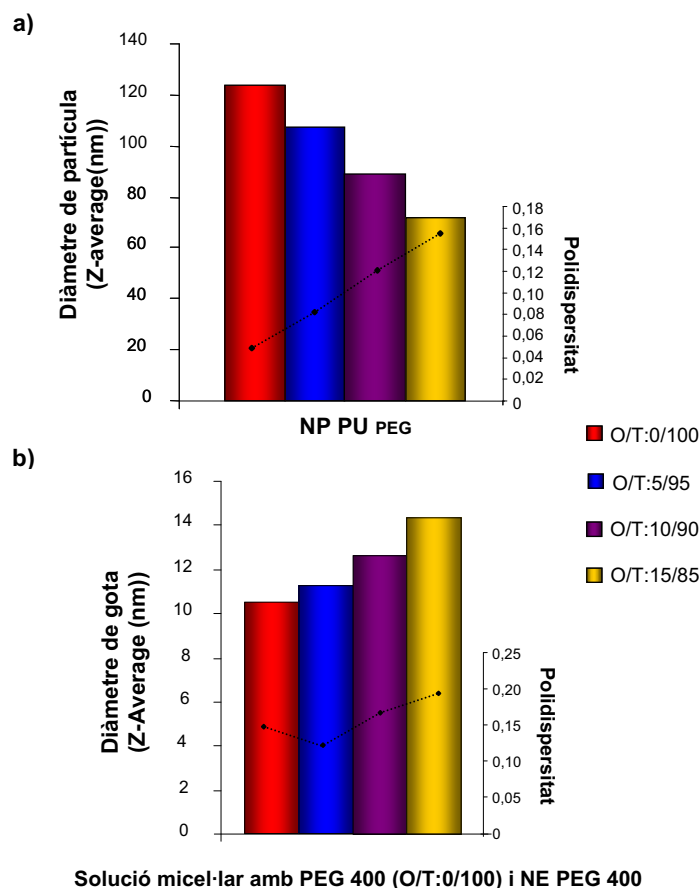
corbes es superposen entre si i ja no es modifica més el diàmetre de partícula indicant que la reacció de polimerització ha finalitzat. A 70°C es van obtenir nanopartícules amb un diàmetre final de 69 nm.

A 82 °C (Fig 4.62b), des del minut 2, ja s'observa com el pic que correspon a la nano-emulsió (12-13 nm) va desapareixent progressivament detectant-se un nou pic associat a la formació de nanopartícules (inici del procés de polimerització). Aquest pic es va desplaçant cap a la dreta fins que als 4 min de polimerització es pot observar una única corba de distribució de mides. En aquest moment ja no queda nano-emulsió i el que s'obtenen són nanopartícules. El desplaçament de la corba cap a mides de partícula superior que s'observa fins els 30 minuts correspondria al procés de maduració. La diferència amb la temperatura de 70°C és que en aquest cas la mida de partícula s'incrementa considerablement (uns 100 nm) en un període de temps molt reduït. A partir de 30 minuts fins a les 4 hores no s'observen canvis significatius en la mida de les partícules obtingudes i les corbes es superposen unes sobre les altres. El diàmetre de les nanopartícules obtingudes va ser de 210 nm.

Ambdós experiments concorden amb la hipòtesi postulada anteriorment ja que la reacció de polimerització ha transcorregut molt més lentament a la temperatura de 70°C, finalitzant-se el procés en 3 hores. Les nanopartícules obtingudes a 70°C també van ser de menor diàmetre.

#### 4.2.2.3.4. Influència de la concentració O/T

S'ha estudiat com es modifica el diàmetre de les partícules de PU PEG en funció de la relació Miglyol 812/Tween 80 en processos de polimerització micel·lar i polimerització en nano-emulsions. Per a dur a terme aquests estudis, s'han preparat composicions amb un 90% d'aigua i una relació en pes O/T de 0/100, 5/95, 10/90 i 15/85, emprant una concentració d'IPDI i PEG 400 de 0,02 mmol/g mantenint l'estequiometria corresponent entre el diisocianat i el poliòl (1:1). Les composicions una vegada preparades a 25°C s'han sotmès a una temperatura de 70±2°C durant 4h per a induir el procés de polimerització. La temperatura i la concentració de biomaterial i de monòmer seleccionades es corresponen als valors òptims obtinguts en els estudis pertinents (apartat 4.2.2.3.3 i 4.2.2.3.1). Les nanopartícules es van caracteritzar per Dynamic Light Scattering just després de ser preparades. A la figura 4.63 s'han representat els paràmetres morfològics de les diferents composicions corresponents a aquest estudi.



**Fig. 4.63:** Diàmetre de partícula (gràfic de barres) i polidispersitat (dispersió de punts) en funció de la relació en pes oli/tensioactiu (O/T) per a a) nanopartícules i b) solució micel·lar i nano-emulsions del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812 amb PEG 400 incorporat.

Com es pot observar a la figura 4.63a a mesura que augmenta la relació O/T disminueix el diàmetre de les nanopartícules de PU PEG a diferència del que s'hauria esperat (Huang, 1998; Landfester, 2000; Zanetti-Ramos, 2006). Així, les nanopartícules amb un diàmetre inferior (71,70 nm) es van obtenir per a la relació O/T: 15/85 mentre que les més grans (123 nm) van correspondre a la relació O/T:0/100 que no contenia Miglyol 812 a la seva composició. S'ha de tenir present que tot i obtenir-se nanopartícules més petites quan disminueix la concentració de tensioactiu, la polidispersitat del sistema augmenta. Per tant la relació O/T: 10/90 seria la d'elecció per la preparació de nanopartícules de PU PEG ja que s'utilitza la mínima concentració de tensioactiu per obtenir dispersions de nanopartícules de baixa polidispersitat amb un diàmetre inferior a 90 nm.

La tendència observada en les composicions inicials (solució micel·lar i nano-emulsions (Fig 4.63b)) es produeix a la inversa, és a dir, les nano-emulsions amb un diàmetre de gota més gran corresponen a la relació O/T:15/85. En general, com més elevada és la

concentració de tensioactiu, es formen més gotes i amb un diàmetre més petit (Sadurní, 2005; Liu, 2006; Solè, 2006). En relació a la polidispersitat, es pot observar un augment d'aquesta en disminuir la concentració de tensioactiu i incrementar el percentatge d'oli. De fet, per la relació en pes O/T:15/85 (pràcticament concentració límit d'oli i tensioactiu a partir de la qual s'obtenen composicions multifàsiques d'aspecte lletós, sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812, Fig.4.1) ja es va obtenir una polidispersitat al voltant de 0,200.

En la formació de nanopartícules, la disminució del diàmetre en reduir la concentració de tensioactiu podria ser deguda a que el diisocinat pot reaccionar tant amb els hidroxils del PEG 400 com del tensioactiu. Com que la concentració de PEG 400 es manté constant en totes les formulacions, les variacions de la mida seran degudes a la reacció de l'IPDI amb el Tween 80 ja que és l'únic factor que es modifica. En aquest cas, el component oliós utilitzat per la preparació de les nano-emulsions no presenta grups hidroxil a la seva estructura (Rowe, 2009), tret dels corresponents a les petites traces d'àcid gras lliure, i per tant no s'ha considerat una reacció entre l'IPDI i el Miglyol 812.

#### **4.2.2.4. Preparació de nanopartícules de poliurea amb lisina (PUR lys)**

Com ja s'ha explicat al capítol 1.2.4, les nanopartícules de poliurea (PUR) es poden formar a partir de la reacció entre els grups isocianats i els grups amino. Per a la preparació de nanopartícules de PUR es va seleccionar inicialment com a biomaterial amb grups amino un aminoàcid que és la lisina (lys). Es va decidir utilitzar un aminoàcid com a diamina ja que s'ha descrit la formació de poliuretans biodegradables i biocompatibles a partir de diisocianats alifàtics i macrodiols, emprant diferents aminoàcids com agents extensors de la cadena polimèrica (Skarja, 1998; Gunatillake, 2003; Sarkar, 2008). Les nano-emulsions amb la composició detallada a la taula XXX es van preparar pel mètode descrit a l'apartat 3.3.3.2. Es va mantenir una estequiometria entre l'IPDI i la lys de 2:1 ja que es va comprovar experimentalment que per aquesta estequiometria s'obtenien els millors resultats en relació a la mida de partícula i l'índex de polidispersitat (determinat per a la composició amb Tween 80). La concentració de monòmer va ser novament de 0,06 mmol/g per a poder obtenir nanopartícules de baixa polidispersitat amb ambdós sistemes (Tween i Cremophor EL) en concordança amb els estudis de formació de nanopartícules de PU de l'apartat 4.2.2.2. Per tant, la

concentració de lys va ser de 0,03 mmol/g per a mantenir l'estequiometria. El procés de polimerització va consistir en aplicar una temperatura de  $70\pm 2^{\circ}\text{C}$  sobre les formulacions durant 4 hores. La caracterització es va dur a terme per DLS després de deixar reposar les composicions a  $25^{\circ}\text{C}$  en un bany termostatat. A la taula XXX es detalla la composició i les característiques morfomètriques de les formulacions estudiades.

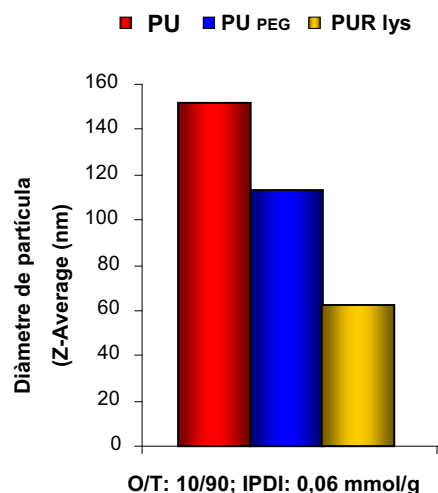
**Taula XXX:** Composició, diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats per DLS a  $25^{\circ}\text{C}$  de nanopartícules amb lys com a biomaterial (PUR lys). La concentració d'IPDI i de lys per a totes les formulacions va ser de 0,06 mmol/g i de 0,03 mmol/g respectivament.

Relació O/T	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	62,20 nm	0,154
Miglyol 812/Cremophor EL: 10/90	52,66 nm	0,150
Miglyol 812/Cremophor EL: 20/80	39,60 nm	0,192
Miglyol 812/Cremophor EL: 30/70	37,30 nm	0,183

\* Les formulacions es van preparar amb un 90% d'aigua.

Les nanopartícules amb un diàmetre de partícula més gran es van obtenir novament quan es va utilitzar **Tween 80** com a tensioactiu (62 nm enfront 52 nm de la formulació equivalent amb Cremophor EL). En la preparació de nanopartícules de PU i de PU PEG ja s'havia observat que les nanopartícules de mida més petita es formaven amb Cremophor EL com a tensioactiu. Si es comparen les nanopartícules de PUR lys (62 nm), PU PEG (113 nm) i PU (152 nm) preparades amb Tween 80 s'observa una reducció important del diàmetre de partícula amb la lys com a biomaterial (Fig. 4.64). Cal destacar que la incorporació de lys en les nano-emulsions amb Tween va comportar una disminució de la mida de les gotes en relació a les nano-emulsions preparades sense l'aminoàcid ( $8,29\text{ nm}$  enfront  $12,64\pm 1,18\text{ nm}$ ) i un augment considerable de la polidispersitat del sistema (valors  $\sim 0,220$ ). Aquests resultats suggereixen una disposició interfacial del biomaterial i la formació de gotes mixtes amb Tween 80 i lys.



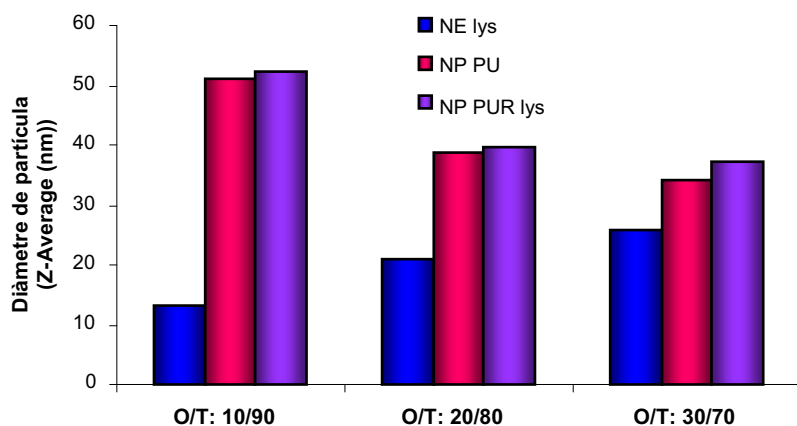


**Fig 4.64:** Diàmetre de nanopartícules de PU, PU PEG i PUR lys preparades amb la relació O/T: 10/90 i una concentració de 0,06 mmol/g del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812.

En els tres casos estudiats es van mantenir les concentracions d'aigua, tensioactiu, oli i monòmer i els paràmetres de polimerització. Per tant, la disminució del diàmetre de partícula sembla ser deguda principalment a la participació de la lys en el procés de polimerització. L'embolcall polimèric de les nanopartícules podria estar constituït per un copolímer de PUR i PU (no es pot descartar una reacció entre el diisocianat i el Tween 80 com succeïa amb les nanopartícules de PU PEG) o bé, tenint en compte l'increment de la polidispersitat (en relació a les nanopartícules de PU i PU PEG, amb una polidispersitat  $<0,100$ ), a la formulació podrien coexistir nanopartícules de PUR lys i de PU conjuntament. Aquest segon punt es va desestimar amb els estudis de contrast de fases mitjançant microscòpia de força atòmica (apartat 4.2.2.7.3) que van posar de manifest la formació d'una única població de nanopartícules.

En relació al sistema amb **Cremophor EL** el diàmetre de partícula disminueix amb la relació oli/ tensioactiu com ja s'havia observat en la preparació de nanopartícules de PU i PU PEG respectivament, obtenint-se les nanopartícules més petites amb la relació O/T: 30/70.

A la figura 4.65 s'ha representat el diàmetre de partícula en funció de la relació O/T per a la nano-emulsió amb lys, les nanopartícules de PU i les de PUR lys del sistema amb Cremophor EL com a tensioactiu.



**Fig 4.65:** Diàmetre de partícula de diferents composicions preparades amb i sense lys per a diferents relacions O/T del sistema aigua/ Cremophor EL/ Miglyol 812.

En el sistema amb Cremophor EL, no s'han observat diferències rellevants en el diàmetre de partícula en relació a les nanopartícules preparades sense biomaterial (nanopartícules de PU) per a les diferents proporcions d'oli i tensioactiu estudiades. Els diàmetres de partícula obtinguts tant per a les nanopartícules de PU com per a les de PUR lys van ser de  $52 \pm 1$  nm per a la relació O/T: 10/90, de  $39 \pm 1$  nm per a la relació O/T: 20/80 i de  $37 \pm 3$  nm per a la relació O/T: 30/70. No obstant, els valors dels índex de polidispersitat obtinguts amb les nanopartícules de PUR lys van ser més elevats que el de les formulacions homòlogues (nanopartícules de PU).

D'acord amb la reactivitat dels isocianats (capítol 1.2.4), la reacció amb grups amino és més ràpida i menys energètica que la reacció amb grups hidroxil. Tenint en compte les diferències observades en els valors dels índex de polidispersitat entre les nanopartícules de PUR lys (0,150-0,192) i les nanopartícules de PU (compresos entre 0,130 i 0,143), a la suspensió de nanopartícules podrien trobar-se tant nanopartícules de PU com nanopartícules de PUR lys.

A diferència de les nano-emulsions preparades amb Tween 80, la presència de lys no va modificar la mida de gota de les nano-emulsions prèvies (13,30 nm amb lys enfront  $14,71 \pm 1,61$  nm sense lys, 20,96 nm enfront  $19,66 \pm 2,17$  nm i 25,50 nm enfront  $22,50 \pm 2,62$  nm per a les relacions O/T:10,90, 20/80 i 30/70 respectivament).

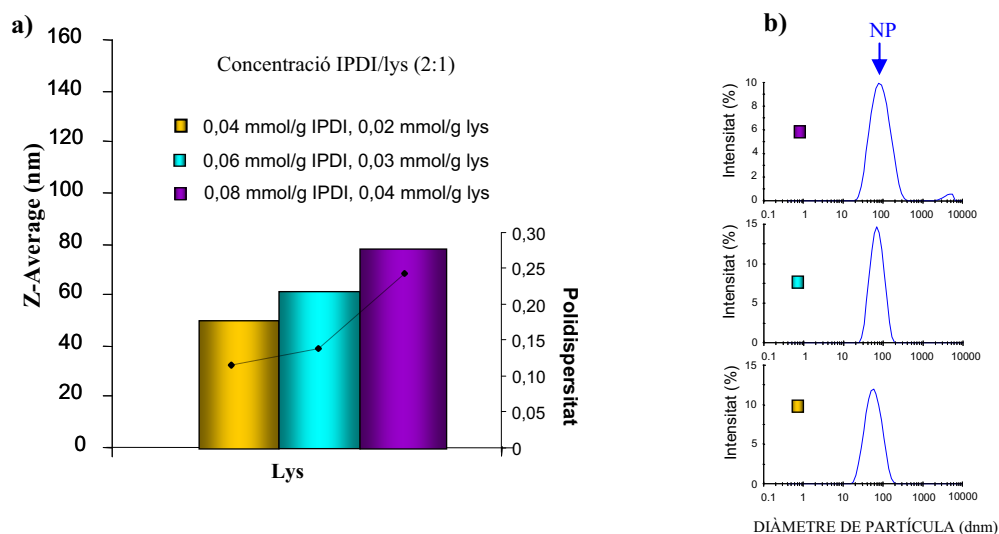
Tenint en compte que la disposició del biomaterial en la interfície dependrà del coeficient de repartiment aigua/tensioactiu i considerant l'elevada solubilitat de la lys en aigua (10 % p/v, Sigma-Aldrich, 2009) podria ser que en el cas del sistema amb Cremophor EL, la major concentració del biomaterial es trobés solubilitzada a la fase aquosa, amb la qual cosa el diàmetre de gota de les nano-emulsions no es modificaria

pràcticament. Aquest fet explicaria també que no s'hagin trobat diferències rellevants en el diàmetre entre les nanopartícules de PU i les de PUR lys, ja que si el biomaterial es troba localitzat majoritàriament a la fase externa enlloc d'estar a l'interfície, l'IPDI de l'interior de les gotes, en difondre, reaccionaria preferentment per proximitat amb els OH del tensioactiu formant-se bàsicament nanopartícules de PU.

En no trobar-se diferències importants en el diàmetre de les nanopartícules que poguessin evidenciar la participació de la lys en el procés de polimerització, es va decidir no continuar amb els estudis d'aquest tipus de nanopartícules amb les composicions del sistema amb Cremophor EL.

#### **4.2.2.4.1. Influència de la concentració d'IPDI/lys (2:1)**

S'ha estudiat la influència de la concentració de l'aminoàcid (lys) i de l'IPDI en la preparació de nanopartícules de PUR lys. Per a dur a terme l'estudi s'han seleccionat únicament composicions amb Tween 80 com a tensioactiu no iònic, ja que els resultats obtinguts amb Cremophor EL (apartat 4.2.2.4) no evidenciaven la implicació de la lys en el procés de polimerització. A l'apartat anterior ja s'ha explicat que les nanopartícules de PU i PUR lys preparades amb Cremophor presenten una mida de partícula del mateix ordre. L'estequiometria entre el diisocianat i la lys es va mantenir 2:1 com ja s'ha explicat anteriorment. Les composicions es van preparar pel procediment explicat al capítol 3.3.3.2 amb concentracions creixents de lys i d'IPDI (Fig. 4.66a). Per a la formació de les nanopartícules, les formulacions es van sotmetre a  $70\pm 2^\circ\text{C}$  durant 4 hores. La caracterització de les composicions es va realitzar per DLS després de deixar reposar les formulacions a  $25^\circ\text{C}$  en un bany termostatat. A la figura 4.66 es poden observar els resultats obtinguts.



**Fig. 4.66:** a) Diàmetre de partícula (gràfic de barres) i polidispersitat (dispersió de punts) en funció de la concentració de lys/IPDI per a composicions amb un 90% d'aigua i una relació O/T 10/90 del sistema aigua/lys/ Tween 80/ Miglyol 812. b) Corbes de distribució per intensitat obtingudes per DLS de les partícules obtingudes per a cada concentració.

En la formació de nanopartícules de PUR lys utilitzant Tween 80 com a tensioactiu, l'augment de la concentració de monòmer i de lys suposa un augment del diàmetre de les partícules tal i com succeïa amb els sistemes de nanopartícules de PU i PU PEG estudiats anteriorment. Les nanopartícules resultants presenten un diàmetre inferior al de les corresponents nanopartícules de PU i PU PEG estudiades a capítols anteriors. A l'apartat anterior ja es va constatar que les nanopartícules de PUR lys preparades amb 0,06 mmol/g d'IPDI presentaven un diàmetre més petit que les de PU PEG i aquestes al seu torn que les de PU. Aquestes diferències en el diàmetre també s'han observat amb les concentracions d'IPDI de 0,04 mmol/g (PU: 93,40 nm, PU PEG: 88,83 nm i PUR lys: 50 nm) i 0,08 mmol/g (PU:187 nm, PU PEG: (112 nm<x<143 nm), PUR lys:78 nm). Amb la concentració d'IPDI de 0,04 mmol/g i de lys de 0,02 mmol/g (concentració més baixa estudiada) es va aconseguir la formació d'una població homogènia de nanopartícules amb un diàmetre de 50 nm i una baixa polidispersitat (polidispersitat<0,150).

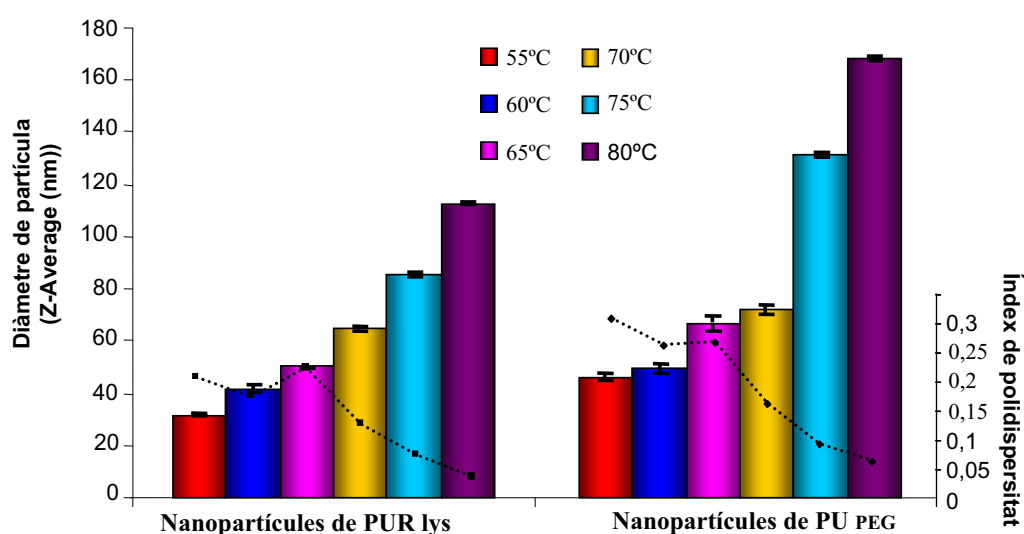
Com es pot observar a la corba de distribució de mides (figura 4.66b), per a la concentració més elevada, 0,08 mmol IPDI/g de nano-emulsió, s'obtenen dues distribucions gaussianes de partícules (valors de polidispersitat superiors a 0,200). El pic d'intensitat més elevada correspon a nanopartícules amb una mida que oscil·la entre 20 i

300 nm (Z-Av. de 80 nm) i el d'intensitat més baixa (cap a 5  $\mu\text{m}$  aproximadament) a agregacions del polímer com a conseqüència de l'excés de concentració.

#### 4.2.2.4.2. Influència de la temperatura

La influència de la temperatura també s'ha estudiat en la formació de nanopartícules de PUR lys a partir de nano-emulsions O/W. Les nanopartícules s'han preparat a partir de la composició amb una concentració d'aigua del 90% p/p i una relació en pes O/T 10/90 del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812 amb lys incorporada. Les concentracions de monòmer i biomaterial seleccionades per a l'estudi van ser de 0,04 mmol IPDI/g i 0,02 mmol lys/g d'acord amb els resultats obtinguts al capítol anterior. Es va estudiar la formació de nanopartícules de PUR lys en un rang de temperatures comprès entre 55 i 80°C. Les nano-emulsions preparades a 25°C per mètodes de baixa energia amb els monòmers incorporats es van sotmetre a les diferents temperatures a estudiar durant un temps de polimerització de 4 hores. La caracterització de les nanopartícules obtingudes es va dur a terme per DLS a 25°C després de deixar refredar les mostres en un bany termostatat.

A la Fig. 4.67 s'han representat els diàmetres de partícula determinats per DLS de les composicions amb lys per a cada temperatura. A títol comparatiu s'han representat també els resultats que s'havien obtingut amb les nanopartícules de PU PEG (apartat 4.2.2.3.3).



**Fig. 4.67:** Variació del diàmetre de partícula (gràfic de barres) i de la polidispersió (gràfic de dispersió de punts) en funció de la temperatura per a nanopartícules de PUR lys i de PU PEG preparades a partir de la composició del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812 amb un 90% d'aigua i una relació O/T 10/90 .

En la formació de nanopartícules de PUR lys també s'observa un increment del diàmetre de partícula amb la temperatura. A l'apartat 4.2.2.3.3 ja s'ha explicat que quan s'empren temperatures més baixes la reacció de polimerització s'alenteix considerablement facilitant l'obtenció de nanopartícules amb un diàmetre més petit. Per a la formació de nanopartícules de PUR lys es va requerir una temperatura superior a 65°C per a l'obtenció de sistemes de baixa polidispersitat (a temperatures inferiors es detectava encara la presència de gotes de nano-emulsió per DLS). Les nanopartícules de mida més petita (63 nm) i amb un índex de polidispersitat inferior a 0,150 es van obtenir amb la temperatura de 70±2°C.

La temperatura d'elecció tant per a la preparació de nanopartícules de PUR lys com de PU PEG va resultar ser la mateixa (70±2°C). Si es comparen els diàmetres de partícula de les nanopartícules de PUR lys i PU PEG per a cadascuna de les temperatures estudiades es pot observar que les nanopartícules que contenen lys són de mida molt més petita malgrat que s'ha utilitzat el doble d'IPDI per a la seva preparació.

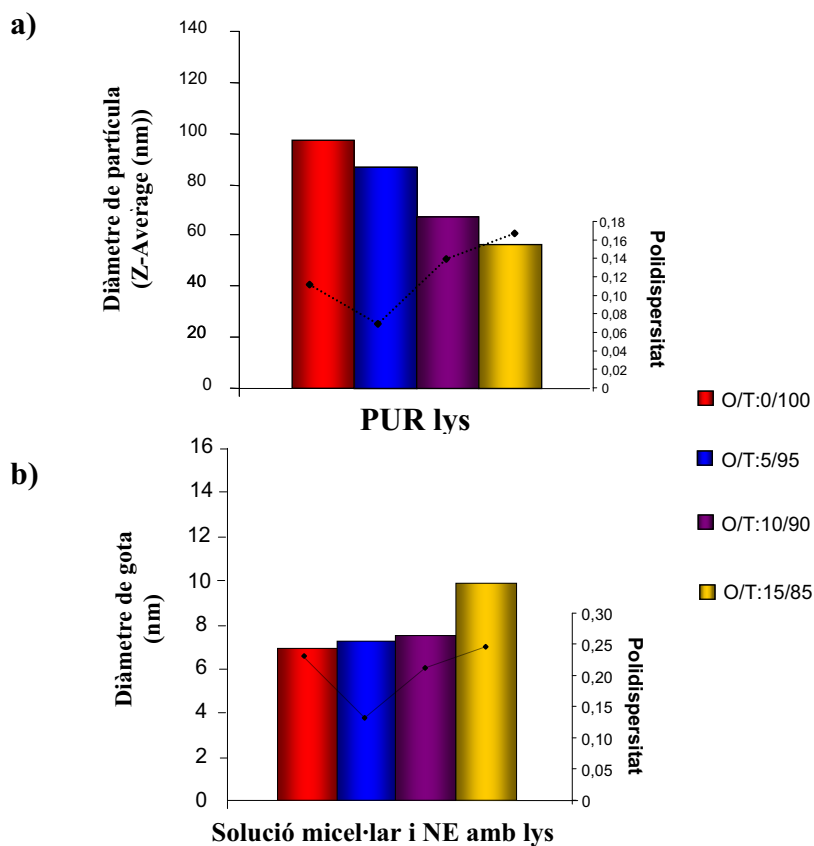
#### **4.2.2.4.3. Influència de la concentració O/T**

Com ja s'ha explicat anteriorment, la concentració de tensioactiu és un factor a considerar en la preparació de nanopartícules a partir de nano-emulsions.

La influència de la concentració de tensioactiu en la preparació de nanopartícules de PUR lys s'ha estudiat tant en processos de polimerització micel·lar com en processos de polimerització en nano-emulsions. Per a desenvolupar aquests estudis s'ha determinat el diàmetre de partícula de diverses composicions preparades amb diferents relacions Miglyol 812/Tween 80. En l'apartat 4.2.2.3.4 ja s'ha explicat que el component oliós seleccionat no interfereix en la reacció de polimerització i per tant no hauria d'influir en els resultats obtinguts. Així, s'han preparat composicions amb un 90% d'aigua i una relació en pes O/T de 0/100, 5/95, 10/90 i 15/85, utilitzant una concentració de 0,04 mmol d'IPDI /g i 0,02 mmol de lisina /g per tal de mantenir una estequiometria de 2:1 (relació estequiomètrica òptima entre el diisocianat i el biomaterial determinada experimentalment). La concentració d'IPDI i de lys es va seleccionar d'acord amb els estudis desenvolupats al capítol 4.3.6.1.

Per a obtenir les nanopartícules, les composicions preparades a 25°C, es van portar a una temperatura de 70±2°C (temperatura d'elecció, apartat 4.2.2.4.2) durant 4h. Les nanopartícules es van caracteritzar per Dynamic Light Scattering a 25°C just després de

ser preparades. Els resultats obtinguts es mostren a la Fig 4.68 on s'ha representat el diàmetre de partícula i la polidispersitat vers la relació O/T de les nanopartícules de PUR lys i de les composicions prèvia polimerització.



**Fig. 4.68:** Diàmetre de partícula en nm (gràfic de barres) i polidispersitat (gràfic de dispersió de punts) en funció de la relació en pes oli/tensioactiu (O/T) per a composicions del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812 amb la lys incorporada. La gràfica 4.68a correspon a les nanopartícules de PUR lys i la gràfica 4.68b a les composicions inicials abans de polimeritzar.

A la Fig 4.68a s'observa que el diàmetre de les nanopartícules de PUR lys disminueix amb la relació O/T. Aquesta mateixa tendència ja s'havia observat a l'apartat 4.2.2.3.4 amb les nanopartícules de PU PEG. La influència del tensioactiu en la reacció de polimerització queda patent en aquest estudi, ja que s'han mantingut els mateixos paràmetres de polimerització per a totes les composicions estudiades i no s'ha variat la concentració de lys. Com ja s'ha explicat a capítols anteriors, el tensioactiu i biomaterial (amb grups reactius) competeixen pel monòmer. Si es manté la concentració de lys constant i es produeixen canvis en el diàmetre de les nanopartícules, aquests serien deguts probablement al tensioactiu, que és l'únic factor que s'ha modificat. Per tant, la disminució del diàmetre de partícula seria conseqüència de la reducció de la concentració de tensioactiu.

Les nanopartícules amb un diàmetre més petit (56,36 nm) s'aconsegueixen per a la relació O/T 15/85 mentre que les de mida més gran (97,30 nm) corresponen a la relació O/T: 0/100. Malgrat aquests resultats, s'ha de tenir en compte l'augment de la polidispersitat del sistema, per tant les nanopartícules amb un diàmetre més petit (70 nm) però amb una polidispersitat  $<0,150$  correspondrien a la relació O/T: 10/90.

Si es comparen les nanopartícules obtingudes amb els estudis realitzats al capítol 4.2.2.3.4 amb nanopartícules de PU PEG, novament s'observa que s'obtenen nanopartícules de mida més petita quan s'utilitza la lys com a biomaterial tot i utilitzar-se el doble de concentració d'IPDI. En ambdós estudis es va emprar la mateixa temperatura i temps de polimerització.

A la figura 4.68b s'ha representat el diàmetre de gota en funció de la relació O/T de les composicions inicials. En aquest cas, s'observa un augment de la mida de les gotes i de la polidispersitat en augmentar la concentració d'oli i disminuir la de tensioactiu (relacions O/T elevades), en concordança amb les referències bibliogràfiques consultades (Sadurní, 2005; Liu, 2006; Solè, 2006; Pey, 2006). Per altra banda, la presència de lys en les formulacions amb Tween 80 comporta una disminució del diàmetre de gota, a diferència del que s'havia observat en el sistema amb Cremophor EL (apartat 4.2.2.4). La mida de gota determinada per DLS de les composicions sense lys va ser de 8,91 nm, 9,80 nm, 12,64 nm, 15,61 nm per a les relacions O/T: 0/100, 5/95, 10/90 i 15/85 respectivament (veure Fig 4.17). En el mateix ordre però amb lys incorporada, les mides de gota han sigut de 6,87 nm, 7,13 nm, 7,48 nm i 10,55 nm. Les modificacions en el diàmetre de les gotes podrien explicar-se per la disposició majoritària de la lys a la interfície oli/aigua.

#### **4.2.2.5. Preparació de nanopartícules de PUR amb biotina i estreptavidina (PUR biot i PUR strep)**

La formació de nanopartícules de PUR amb biotina o estreptavidina (descrites a l'apartat 4.2.2.1) és d'especial interès per a aconseguir sistemes d'alliberació controlada de principis actius amb una major especificitat d'acció (Goodwin, 2001; Nobs, 2006; Pan, 2008).

Per a la preparació de les nanopartícules de PUR amb biotina (PUR biot) i amb estreptavidina (PUR strep) es va seleccionar la composició amb una concentració



d'aigua del 90% (p/p) i una relació O/T: 10/90 del sistema aigua/ Tween 80/ Miglyol 812. Les nano-emulsions es van preparar a 25°C pel mètode descrit al capítol 3.3.2. La polimerització va consistir en aplicar una temperatura de 70±2°C durant 4h. A la taula XXXI es mostra la composició de cada formulació i els paràmetres morfomètrics (diàmetre de partícula i polidispersió) determinats per DLS a 25°C.

**Taula XXXI:** Composició, diàmetre de partícula i índex de polidispersitat determinats per DLS a 25°C de nanopartícules amb biotina o amb estreptavidina com a biomaterial.

Relació O/T	Monòmer i biomaterial (mmol/g)	Relació estequiomètrica (IPDI: biomaterial)	Diàmetre de partícula (Z-Average (nm))	P
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	Biotina (0,005) IPDI (0,01)	2:1	60,90 nm	0,198
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	Biotina (0,005) IPDI (0,02)	4:1	102,33 nm	0,065
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	Estreptavidina (2*10 <sup>-5</sup> ) IPDI (0,002)	10000:1	56,20 nm*	0,276*
Miglyol 812/Tween 80: 10/90	Estreptavidina (2*10 <sup>-5</sup> ) IPDI (0,02)	100000:1	69,43 nm	0,133

\* El valor del diàmetre de partícula com a Z-Average no es pot considerar del tot fiable ja que l'índex de polidispersitat va ser superior a 0,250.

**Nanopartícules de PUR biot:** La concentració de biotina que s'ha utilitzat correspon a la solubilitat màxima del biomaterial a la nano-emulsió (0,122% p/p que correspon a 0,005 mmol/g). Inicialment, les nanopartícules es van preparar mantenint la relació estequiomètrica IPDI i biotina de 2:1 considerada idònia per a la preparació de nanopartícules de PUR (veure apartat 4.2.2.4). Malgrat que es van obtenir nanopartícules amb un diàmetre de 60,9 nm, l'índex de polidispersitat va ser força elevat (0,198) i part de les gotes de nano-emulsió quedaven sense polimeritzar. Per aquesta raó es va decidir incrementar al doble la concentració d'IPDI (relació estequiomètrica entre l'IPDI i la biotina de 4:1). Amb aquesta nova relació, el diàmetre va augmentar considerablement (nanopartícules de 102 nm), però es va aconseguir la formació d'un sistema amb un índex de polidispersitat inferior a 0,100.

En relació a les nanopartícules de PU estudiades a l'apartat 4.2.2.2 per a la mateixa concentració d'IPDI, les nanopartícules de PUR biot (102,33 nm) són de mida més gran que les de PU (83 nm). Tenint en compte que es va mantenir la concentració de tensioactiu i que els paràmetres de polimerització van ser els mateixos, l'increment de diàmetre s'explicaria per la reacció entre l'IPDI i els grups amino de la biotina. No

obstant, com ja s'ha observat amb les nanopartícules de PU PEG i de PUR lys, no es pot descartar la reacció entre l'IPDI i els grups OH del tensioactiu. Cal remarcar que les nanopartícules de PUR biot (102 nm) són considerablement més grans que les de PUR lys (63 nm) malgrat haver-se utilitzat la meitat de la concentració d'IPDI per a la seva preparació. Aquest fet podria explicar-se per la disposició dels grups amino a les respectives estructures químiques ja que en el cas de la lys les amines són primàries mentre que en el cas de la biotina trobem dues amines secundàries formant part d'una estructura cíclica molt més voluminosa (capítol 3.1.2.5).

**Nanopartícules de PUR strep:** Per a la preparació de nanopartícules amb estreptavidina es va considerar una estequiometria entre l'IPDI i el biomaterial de 10000:1 i 100000:1. S'ha emprat una concentració molt elevada d'IPDI en relació al biomaterial ja que l'estreptavidina conté un gran nombre d'aminoàcids (160 aa per subunitat) i per tant hi haurà molts grups amino disponibles capaços de reaccionar amb els grups isocianats de l'IPDI. Com era d'esperar, les nanopartícules amb un menor diàmetre de partícula (56,20 nm) es van obtenir per a la concentració d'IPDI més baixa però la polidispersitat va ser molt elevada (0,276) i per DLS es detectava encara la presència de gotes de la nano-emulsió. Aquest fet pot ser degut a que s'ha utilitzat una temperatura de polimerització baixa o una concentració d'IPDI insuficient. L'increment de la temperatura no es va considerar ja que com s'ha observat en capítols anteriors, podria afavorir-se la reacció de l'IPDI amb l'aigua. En incrementar-se la concentració d'IPDI, es va obtenir una única població de nanopartícules amb un diàmetre de 69,43 nm i una polidispersitat inferior a 0,150 indicant un estreta distribució de la mida de partícula. Les nanopartícules de PUR strep obtingudes presenten un diàmetre inferior a les nanopartícules homòlogues de PU (83 nm) preparades a les mateixes condicions de polimerització, concentració de Tween 80 i concentració d'IPDI (apartat 4.2.2.3). En relació a les nanopartícules de PUR biot descrites anteriorment, també s'observa una disminució considerable de la mida de partícula (102,33 nm (PUR biot) enfront 69,43 nm (PUR strep)). Per tant, la reducció del diàmetre de partícula sembla ser deguda a l'efecte de l'estreptavidina adsorbida a la interfície oli/aigua de les gotes. Cal destacar que tant els grups amino com els grups carboxílics presents en els diferents aminoàcids de l'estreptavidina són susceptibles de reaccionar amb l'IPDI (veure capítol 1.2.4). No es van observar diferències importants en el diàmetre de les gotes de les nano-emulsions

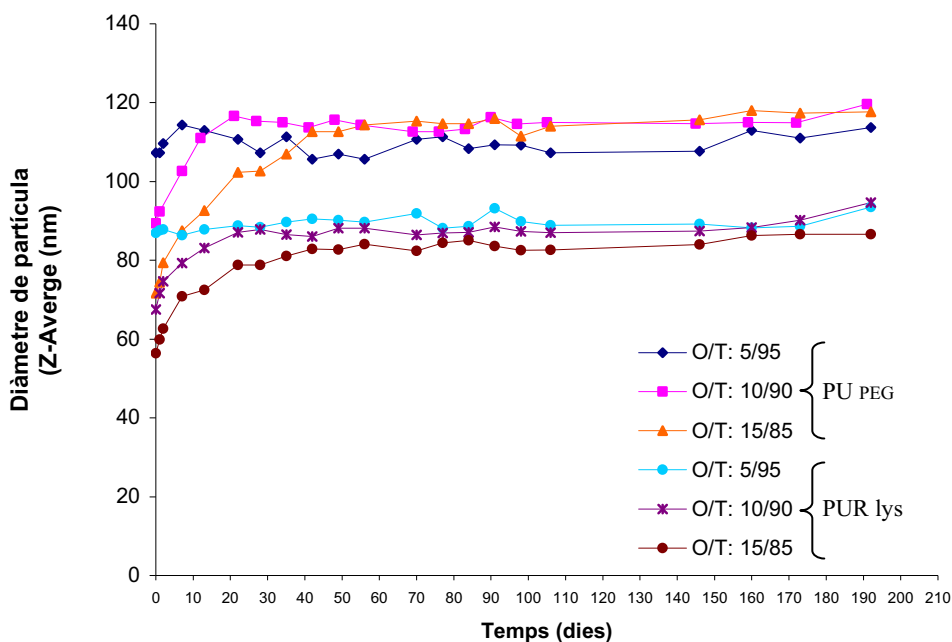
prèvia polimerització ( $12,64 \pm 1,18$  per a la nano-emulsió sense biomaterial i  $11,30$  nm per a la nano-emulsió amb estreptavidina).

#### 4.2.2.6. Estabilitat de nanopartícules

La preparació de nanopartícules de poliuretà i poliurea a partir de PEG 400 i altres biomaterials que modifiquen la hidrofobicitat de la superfície fent-la més hidròfila, suposa un avantatge important en relació a les nanopartícules de poliuretà preparades sense biomaterial. Com ja s'ha explicat anteriorment, el recobriment de la superfície de les nanopartícules amb biomaterials, dificultaria el reconeixement per part de les cèl·lules del sistema immunitari de l'organisme i les partícules podrien romandre més temps al torrent sanguini (Fontana, 2001; Gref, 1995). Per aquest motiu es van seleccionar per a fer els estudis d'estabilitat únicament aquelles nanopartícules que contenen PEG i biomaterials (nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep). En un primer bloc s'han estudiat les composicions preparades amb PEG 400 i lys i posteriorment es mostren els resultats d'estabilitat corresponents a les formulacions amb biotina i estreptavidina.

L'estabilitat de les nanopartícules de PU PEG i PUR lys s'ha estudiat determinant com es modifica el diàmetre de partícula en funció del temps per DLS a  $25^{\circ}\text{C}$ . Les nanopartícules s'han preparat amb la concentració de monòmer i biomaterial i a la temperatura amb les que s'han obtingut millors valors dels paràmetres morfològics (diàmetre de partícula i índex de polidispersitat més baixos). Com a medi de polimerització s'han emprat nano-emulsions amb un 90% d'aigua del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812 a les quals se'ls hi ha incorporat PEG 400 o lys.

A la Fig. 4.69 es troben representades les composicions amb PEG 400 i lys. S'ha determinat la variació del diàmetre de les nanopartícules en funció del temps per a diferents relacions O/T durant 6 mesos.

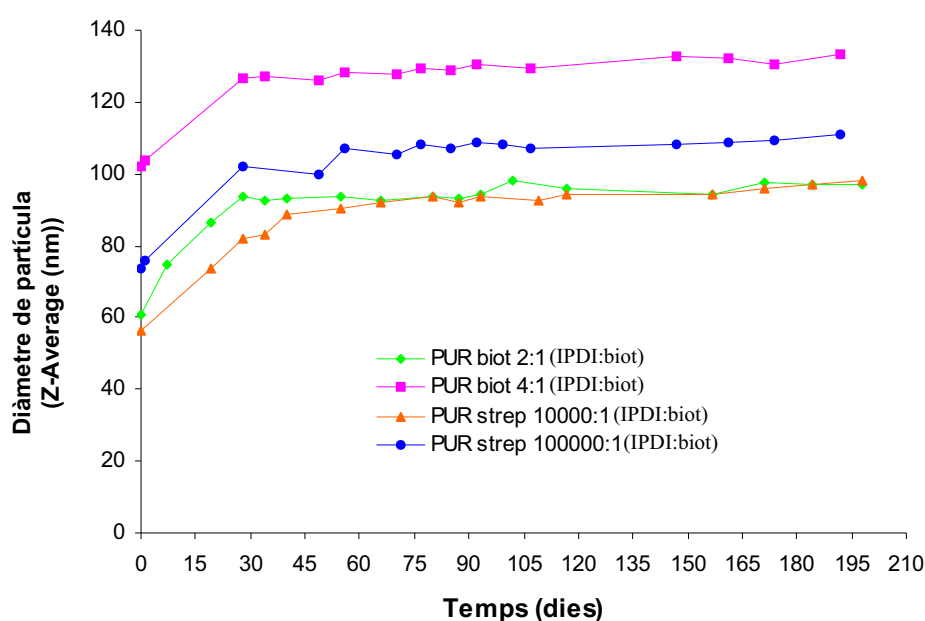


**Fig. 4.69:** Z-Average en nanòmetres en funció del temps per a nanopartícules amb PEG 400 o lisina (PU PEG i PUR lys) amb diferents relacions O/T del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812.

Les nanopartícules que presenten una variació menor enfront a la mida inicial, tant per a les composicions amb PEG 400 com per a les que contenen lys, corresponen a la relació en pes O/T: 5/95 ja que no s'observen diferències significatives en el diàmetre de partícula amb el temps. De fet, amb la relació O/T: 5/95 s'havien obtingut les nanopartícules de PU PEG i PUR lys amb una polidispersitat més baixa ( $<0,100$ ) d'acord amb els estudis desenvolupats als apartats 4.2.2.3.4 i 4.2.2.4.3. Per a la resta de composicions, durant els primers 30 dies es produeix un petit increment de la mida de les partícules degut a que es produeix un cert grau d'agregació però, posteriorment, el diàmetre roman constant amb el temps. La polidispersitat d'aquestes composicions (relació en pes O/T: 10/90 i 15/85) va anar disminuint progressivament a mesura que augmentava la mida de partícula fins arribar a valors inferiors a 0,100. En establitzar-se la mida de partícula, ja no es van observar més variacions de la polidispersitat. Les partícules es van conservar a 25°C durant tot el temps que ha durat l'estudi (192 dies) i visualment no es van observar canvis significatius en el seu aspecte.

La Fig.4.70 correspon als estudis d'estabilitat de nanopartícules de PUR biot i PUR strep sintetitzades amb diferents concentracions de monòmer però mantenint la mateixa concentració de biomaterial. Així, per a la biotina s'han estudiat les relacions

estequiomètriques IPDI:biot de 2:1 i 4:1 i per a l'estreptavidina les relacions IPDI:strep de 10000:1 i 100000:1. Les nanopartícules de PUR biot i PUR strep s'han mantingut a una temperatura de 4°C per a la seva conservació, malgrat que totes les determinacions amb DLS s'han dut a terme a 25°C. Les nanopartícules es van emmagatzemar a 4°C per tal de preservar la integritat de l'estreptavidina i la biotina ja que ambdós biomaterials són més estables a aquesta temperatura (apartat 3.1.2.5). Les composicions es van deixar temperar a 25°C prèvia caracterització per DLS. Les determinacions del diàmetre de partícula s'han realitzat durant 6 mesos durant els quals les mostres no han experimentat canvis en el seu aspecte.



**Fig. 4.70:** Z-Average en nanòmetres en funció del temps per a nanopartícules de PUR biot i PUR strep amb diferents relacions estequiomètriques IPDI/biot i IPDI/strep sintetitzades a partir de nano-emulsions del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812.

Totes les composicions estudiades presenten una elevada estabilitat cinètica tot i que es podrien donar fenòmens d'agregació durant els primers dies que es manifesten amb un increment del Z-Average. Les nanopartícules amb una concentració de monòmer més baixa (PUR biot 2:1 i PUR strep 10000:1) presenten un diàmetre de partícula més petit que aquelles que tenen major concentració, però en relació a l'estabilitat totes les composicions estudiades es comporten de manera similar. La polidispersitat de les composicions PUR biot 2:1 i PUR strep 10000: 1, superiors a 0,150 inicialment, van anar disminuint amb el temps fins a valors inferiors a 0,100. Tenint en compte que en aquestes composicions coexistien nano-emulsió i nanopartícules de PUR, la disminució

de la polidispersitat podria estar relacionada amb fenòmens de maduració d'Ostwald que afecten les gotes de nano-emulsió (apartat 4.1.4). En la composició PUR biot 4:1, no es van observar canvis en el valor de la polidispersitat ( $<0,100$  independentment del temps) malgrat l'augment del Z-Average durant els primers 30 dies d'estudi. Pel que fa a les nanopartícules de PUR strep preparades amb una relació IPDI:strep de 100000:1, la polidispersitat del sistema no es va modificar pràcticament durant tot el període de temps estudiat (192 dies) mantenint-se a uns valors propers a 0,140.

***Resuspensió de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep després de l'aplicació d'ultracentrifugació***

Degut al diàmetre tan petit que presenten les nanopartícules, per a poder-les separar del medi on es troben en suspensió, s'ha d'aplicar una força centrífuga molt elevada i com a conseqüència les nanopartícules tendeixen a agregar-se i compactar-se, perdent la seva identitat i dificultant la seva resuspensió (Vauthier, 2008).

S'ha estudiat la influència del procés de centrifugació en la resuspensió de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep. Les nanopartícules es van preparar a les concentracions d'IPDI i de biomaterial següents:

- PU PEG: (0,02 mmol/g IPDI: 0,02 mmol/g PEG 400), relació (1:1))
- PUR lys (0,04 mmol/g IPDI: 0,02 mmol/g lys), relació (2:1))
- PUR biot (0,02 mmol/g IPDI: 0,005 mmol/g biot), relació (4:1))
- PUR strep (0,02 mmol/g IPDI : $2 \cdot 10^{-5}$  mmol/g strep, relació (100000:1))

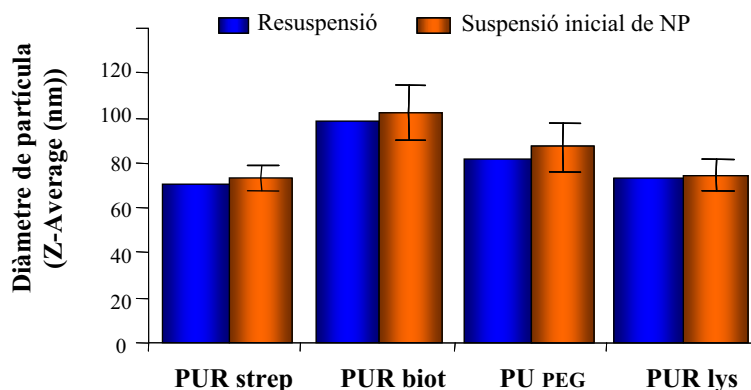
Aquestes concentracions corresponen als valors òptims per a obtenir una mida de partícula i una polidispersitat adequades ( $\varnothing \leq 100$  nm i  $P < 0,150$ ) segons els estudis desenvolupats als respectius capítols.

Les nano-emulsions prèvies es van preparar a 25°C amb una relació en pes O/T:10/90 i una concentració d'aigua del 90% p/p. Per a dur a terme la polimerització, les composicions es van sotmetre a una temperatura de  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  durant 4 hores.

Una vegada formades les nanopartícules es van deixar reposar a 25°C durant 24 hores. Posteriorment, les suspensions de nanopartícules es van centrifugar a 40000 rpm durant 1 hora. El concentrat de nanopartícules recollit ("pellet") es va deixar dessecar a 25°C fins a l'eliminació total de l'aigua del sobrenedant. Les composicions finals es van

reconstituir fàcilment amb aigua MilliQ homogeneïtzant únicament amb agitació mecànica (vòrtex).

Les suspensions de nanopartícules resultants es van caracteritzar per DLS a 25°C. A la figura 4.71 es mostren els resultats del diàmetre de partícula de les composicions després de ser reconstituïdes i de les nanopartícules abans de ser centrifugades.

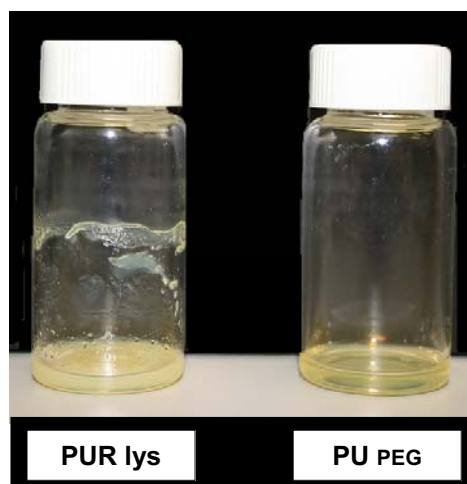


**Fig. 4.71:** Diàmetre de les nanopartícules de PUR strep, PUR biot, PU PEG i PUR lys reconstituïdes després de la centrifugació i de les nanopartícules amb els mateixos components que no han estat sotmeses a cap manipulació.

Com es pot observar a la figura 4.71, el diàmetre de les nanopartícules una vegada centrifugades i reconstituïdes, no es modifica significativament durant el procés de separació i concentració. Pràcticament es van obtenir els mateixos valors de diàmetre de partícula que en les formulacions que no havien estat sotmeses a ultracentrifugació.

#### ***Liofilització de nanopartícules de PU PEG i PUR lys***

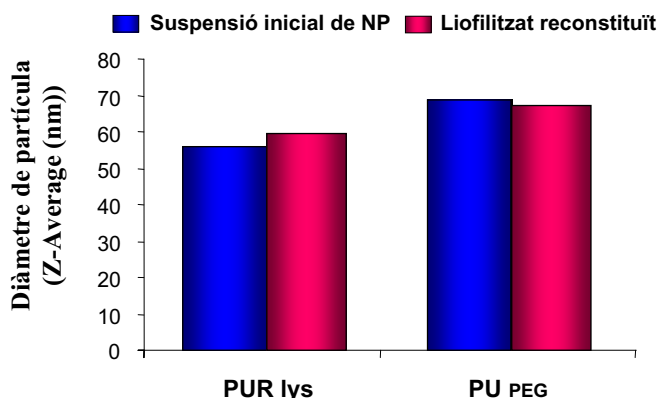
S'han preparat nanopartícules de PU PEG i de PUR lys a partir de les nano-emulsions corresponents amb les concentracions de monòmer i biomaterial idònies d'acord amb els estudis anteriors. La polimerització ha consistit novament en l'aplicació d'una temperatura de  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  sobre les formulacions durant 4h. Una vegada formades les nanopartícules s'han deixat reposar a  $25^\circ\text{C}$ . Posteriorment, s'ha procedit a la seva liofilització prèvia congelació amb una mescla de neu carbònica i acetona. L'addició de crioprotectors tals com sucrosa o trealosa no va ser necessària ja que les mostres no es van alterar durant el procés de congelació. Les mostres es van liofilitzar a una temperatura de  $-89^\circ\text{C}$  i una pressió  $\leq 0,1$  mbar durant 48 hores. A la figura 4.72 es pot observar l'aspecte de les mostres després de la liofilització.



**Fig.4.72:** Aspecte del liofilitzat de les nanopartícules de PUR lys i de PU PEG.

Les mostres liofilitzades presenten una aspecte de gel enloc d'obtenir-se una pols fina degut a l'estructura del polímer emprat i a la presència de concentracions elevades de tensioactiu.

Una vegada liofilitzades les suspensions de nanopartícules es van reconstituir fàcilment amb aigua milliQ utilitzant agitació mecànica. Les composicions obtingudes presentaven el mateix aspecte macroscòpic que les suspensions inicials, és a dir, composicions líquides, translúcides, blavoses i absència d'agregats visibles. Per a corroborar que les nanopartícules havien mantingut les seva identitat durant el procés de liofilització, les composicions reconstituïdes es van caracteritzar a 25°C per DLS. A la figura 4.73 s'ha representat el diàmetre de partícula de les composicions inicials i el diàmetre obtingut amb les mostres reconstituïdes després de la liofilització.



**Fig. 4.73:** Diàmetre de partícula de la suspensió inicial i del liofilitzat després de ser reconstituït.

No s'han observat diferències significatives en el diàmetre de partícula abans i després del procés de liofilització mantenint-se la integritat de les nanopartícules de PU PEG i



PUR lys amb la qual cosa la liofilització podria ser un mètode eficaç per a incrementar l'estabilitat de les composicions.

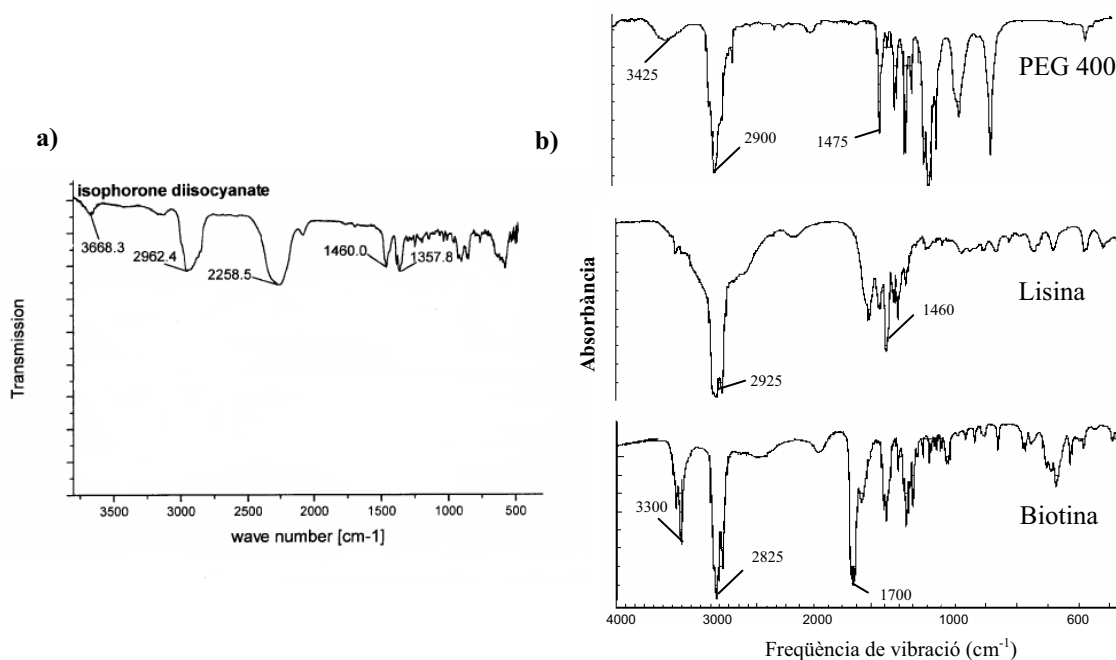
La mida de partícula de les mostres liofilitzades es va tornar a determinar per DLS en el transcurs de 2 anys. Es va obtenir un diàmetre de partícula de 67,9 nm per a les nanopartícules de PU PEG i de 56,5 nm per a les nanopartícules de PUR lys que es corresponen amb la mida de partícula de la suspensió aquosa inicial. Les polidispersitats obtingudes van ser inferiors a 0,150, indicant que es tracta de sistemes de baixa polidispersió. Per tant, la liofilització millora considerablement l'estabilitat de les nanopartícules de PU PEG i de PUR lys ja que s'eviten els fenòmens d'agregació.

#### 4.2.2.7. Caracterització estructural de nanopartícules

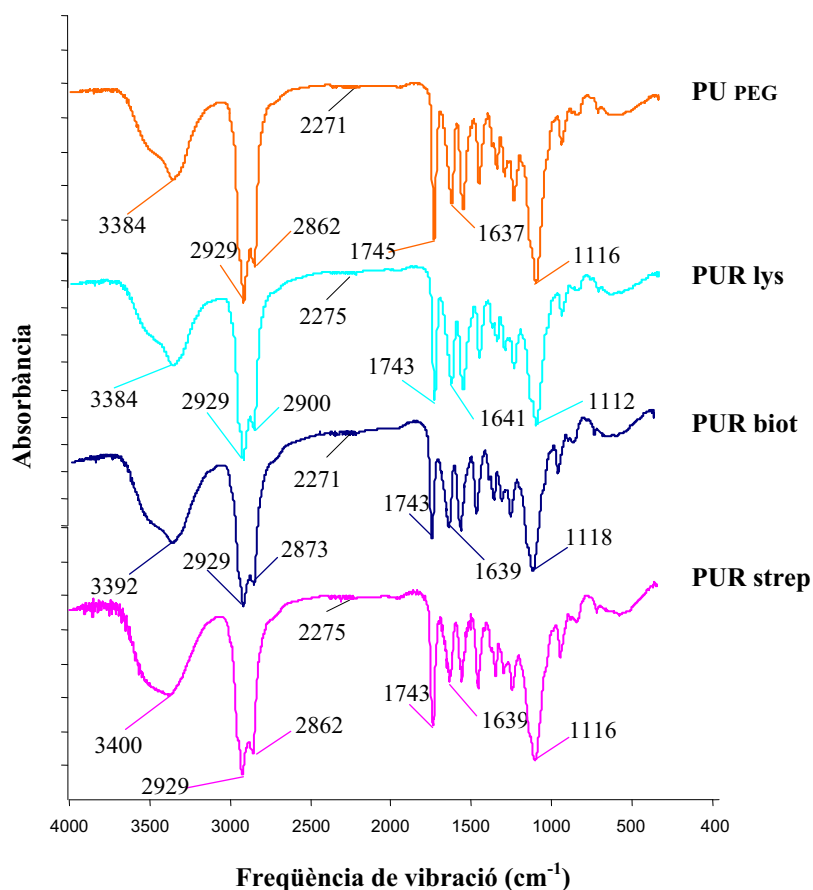
##### 4.2.2.7.1. Caracterització de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep mitjançant FT- IR

La caracterització de l'estructura química dels polímers obtinguts mitjançant la transformada de Fourier en espectroscòpia d'infraroig permet identificar qualitativament la correcta formació dels polímers de poliuretà i poliurea i detectar la presència dels productes que provenen de reaccions secundàries.

La figura 4.74 correspon als espectres d'infraroig de l'IPDI, el PEG 400 i alguns biomaterials (biotina i lys) i la figura 4.75 als espectres FT-IR de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep.



**Fig. 4.74:** Espectre FT-IR del monòmer i alguns biomaterials implicats en la reacció de polimerització: a) IPDI (Tiarks., 2001), biotina, lisina, PEG 400 (Sigma-Aldrich, 2007).



**Fig. 4.75:** Espectres FTIR corresponents a nanopartícules formades a partir de la reacció del diisocianat d'isoforona amb el PEG 400, la lisina, l'estreptavidina o la biotina.

La finalització de la reacció de policondensació entre l'IPDI i els diferents monòmers, sense l'addició de catalitzadors, s'ha pogut confirmar per les anàlisis de FT-IR en comparar els espectres d'infraroig del reactiu (Fig.4.74a) segons la bibliografia (Tiarks, 2001) i dels productes resultants (Fig.4.75), per la desaparició de la banda d'absorció del grup diisocianat ( $2270\text{ cm}^{-1}$ ) després del procés de polimerització.

L'espectre de les diferents nanopartícules obtingudes per la reacció entre l'IPDI i el polioli o les diamines, mostra bandes d'absorció a  $1639\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$  corresponents a la vibració del grup carbonil de les urees i els poliuretans respectivament, a  $1560\text{ cm}^{-1}$  per a la vibració dels grups C-N i a  $3400\text{ cm}^{-1}$  per a la vibració del grup amino. La presència d'aquestes bandes juntament amb l'aparició de la vibració del grup amida a  $2800\text{ cm}^{-1}$  és una forta evidència de la formació de polímers de poliuretà i poliurea (Tiarks, 2001; Durrieu, 2004; Zanetti-Ramos, 2006). En l'espectre d'absorció de les nanopartícules també s'ha pogut detectar una banda sobre  $1112\text{-}1118\text{ cm}^{-1}$  característica de l'estretament de l'enllaç C-O-C atribuïda a la presència del tensioactiu Tween 80. El fet

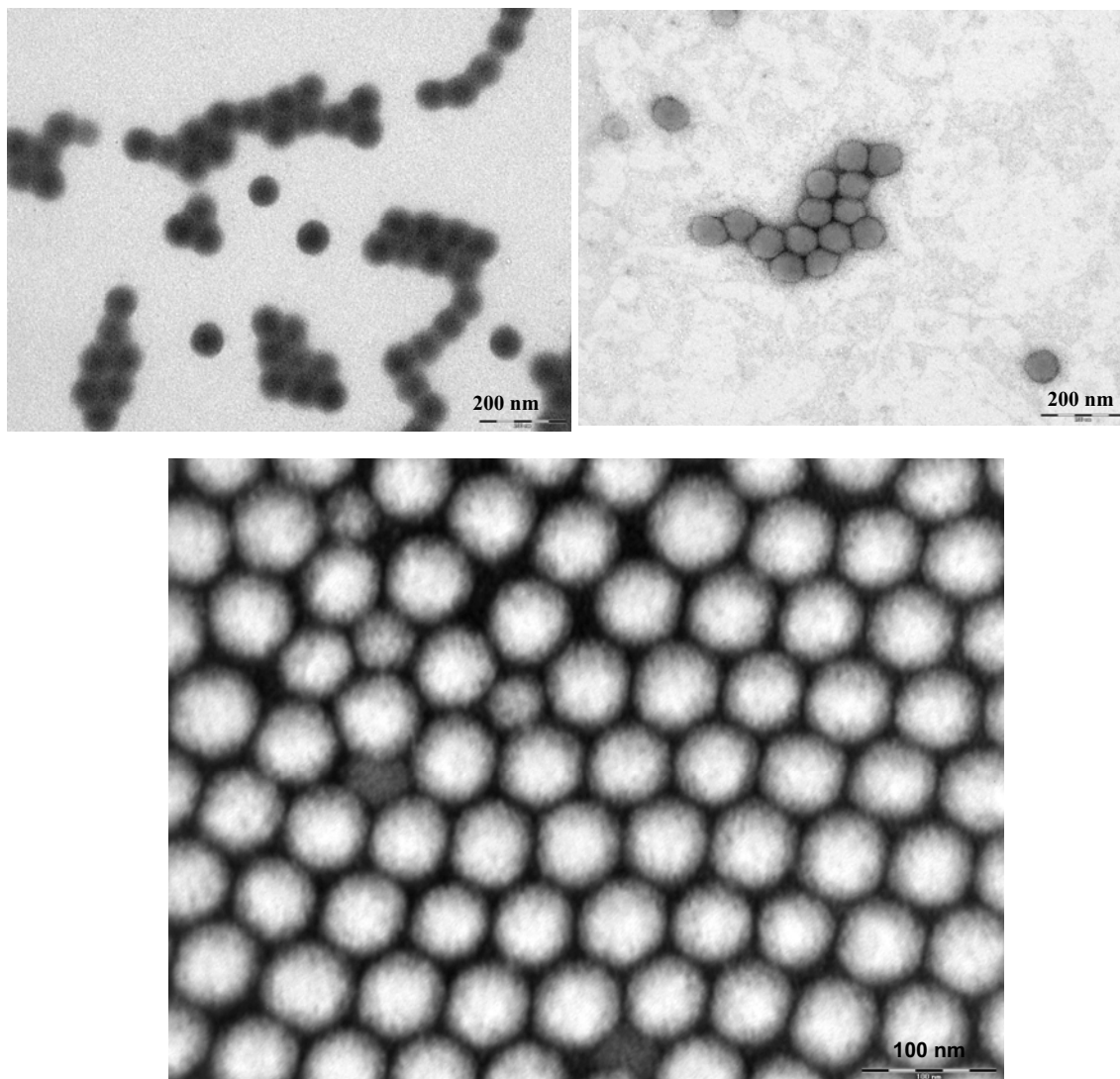
que no s'hagin observat diferències significatives entre les diferents formulacions és degut a que la tècnica utilitzada permet detectar la formació del polímer i la finalització de la reacció de polimerització però no és específica per a distingir entre les nanopartícules de poliuretà i les de poliurea ja que els enllaços formats són molt similars en ambdues espècies químiques.

#### **4.2.2.7.2. Caracterització de les nanopartícules obtingudes per TEM**

Les nanopartícules de PU i de PUR preparades amb PEG 400 i biomaterials es van caracteritzar per Microscòpia Electrònica de Transmissió prèvia tinció negativa amb acetat d'uranil a l'1%. La preparació de les mostres per a la seva observació amb TEM es troba detallada al capítol 3.3.5.2.

A continuació es mostren les imatges obtingudes amb TEM de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep preparades a 70°C.

La Fig.4.76 correspon a nanopartícules de poliuretà (PU PEG) preparades a partir de nano-emulsions amb una relació O/T en pes 10/90 i una concentració d'aigua del 90% (p/p) del sistema aigua/Tween 80/Miglyol 812 a les quals se'ls va incorporar PEG 400 i IPDI a una concentració de 0,02 mmol/g. Les nanopartícules es van observar a diferents augments.

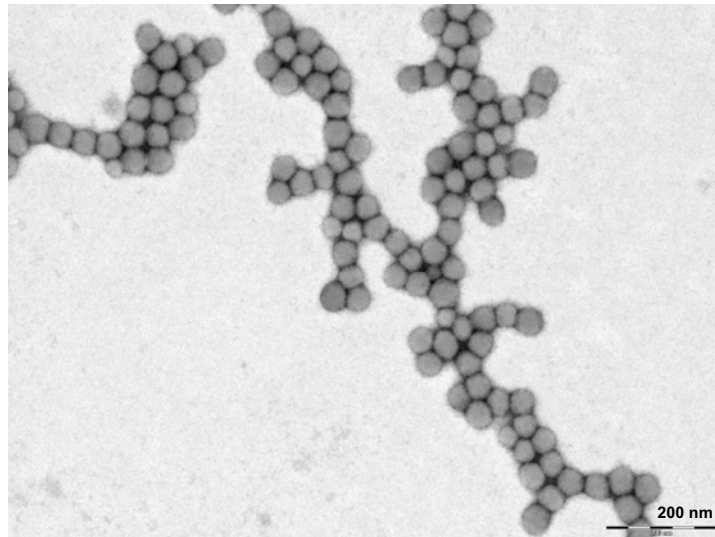
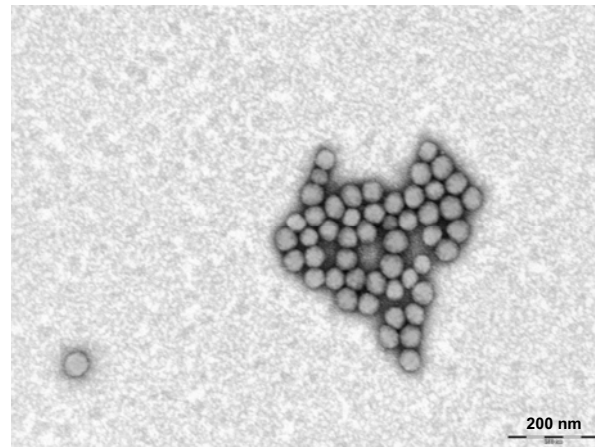


**Fig 4.76:** Nanopartícules de PU PEG (concentració IPDI i PEG 400 de 0,02 mmol/g) observades per TEM a diferents augments.

Les imatges de TEM mostren una població homogènia de nanopartícules isodiamètriques, de forma arrodonida i amb un diàmetre de partícula que oscil·la entre 40 i 80 nm, en les que es pot observar un embolcall polimèric ben estructurat i completament definit. Els diàmetres de partícula obtinguts per TEM concorden amb les determinacions realitzades per DLS a 25°C en les quals es va obtenir un diàmetre de partícula de l'ordre de 70 nm i una baixa polidispersitat ( $P < 0,150$ ). A les micrografies electròniques no es van observar nanopartícules de mida superior als 100 nm.

La substitució del PEG 400 per un polietilenglicol de pes molecular inferior, PEG 200, utilitzant la mateixa nano-emulsió com a medi de polimerització, dóna lloc a la formació de nanopartícules de poliuretà (PU) amb un diàmetre de partícula inferior com ja s'ha

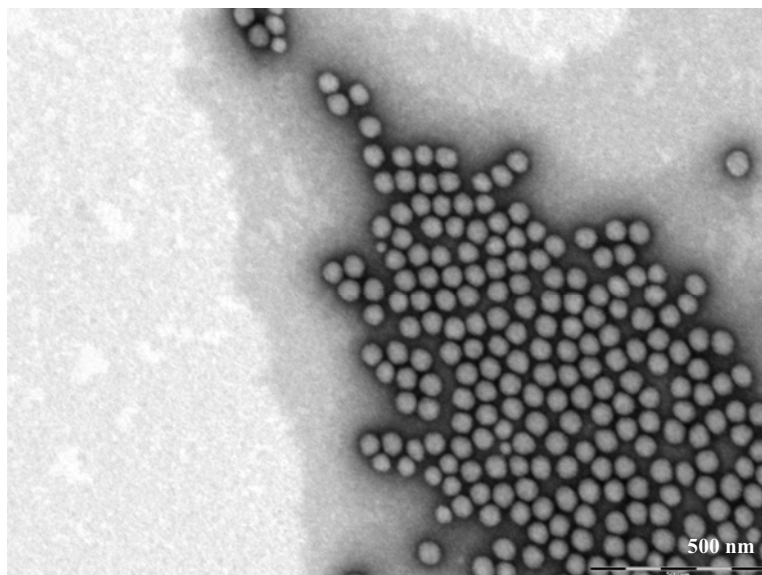
constatat al capítol 4.2.2.3.2. A la figura 4.77 es mostren les imatges de TEM de les nanopartícules obtingudes amb PEG 200.



**Fig. 4.77:** Micrografia electrònica de nanopartícules de PU PEG preparades amb PEG 200 a una concentració de 0,02 mmol/g.

A les imatges de TEM, es pot observar una única població de nanopartícules isodiamètriques, ben delimitades i amb un important contrast respecte el fons de la preparació. Les nanopartícules presenten un diàmetre al voltant de 50 nm corresponent al diàmetre promig calculat del recompte de 100 partícules. Els resultats concorden amb els valors de Z-average obtinguts amb DLS (Z-Average:54,53 nm, P:0,127). Les nanopartícules de PU PEG preparades amb PEG 200 són considerablement més petites que les obtingudes amb PEG 400. L'agrupació de les nanopartícules formant diferents figures podria ser conseqüència de la tinció negativa amb acetat d'uranil.

La figura 4.78 correspon a les nanopartícules de poliurea preparades amb lisina (PUR lys) a una concentració de 0,04 mmol/g a partir de nano-emulsions amb un 90% (p/p) d'aigua i una relació en pes O/T: 10/90 del sistema aigua/Tween 80/ Miglyol 812.

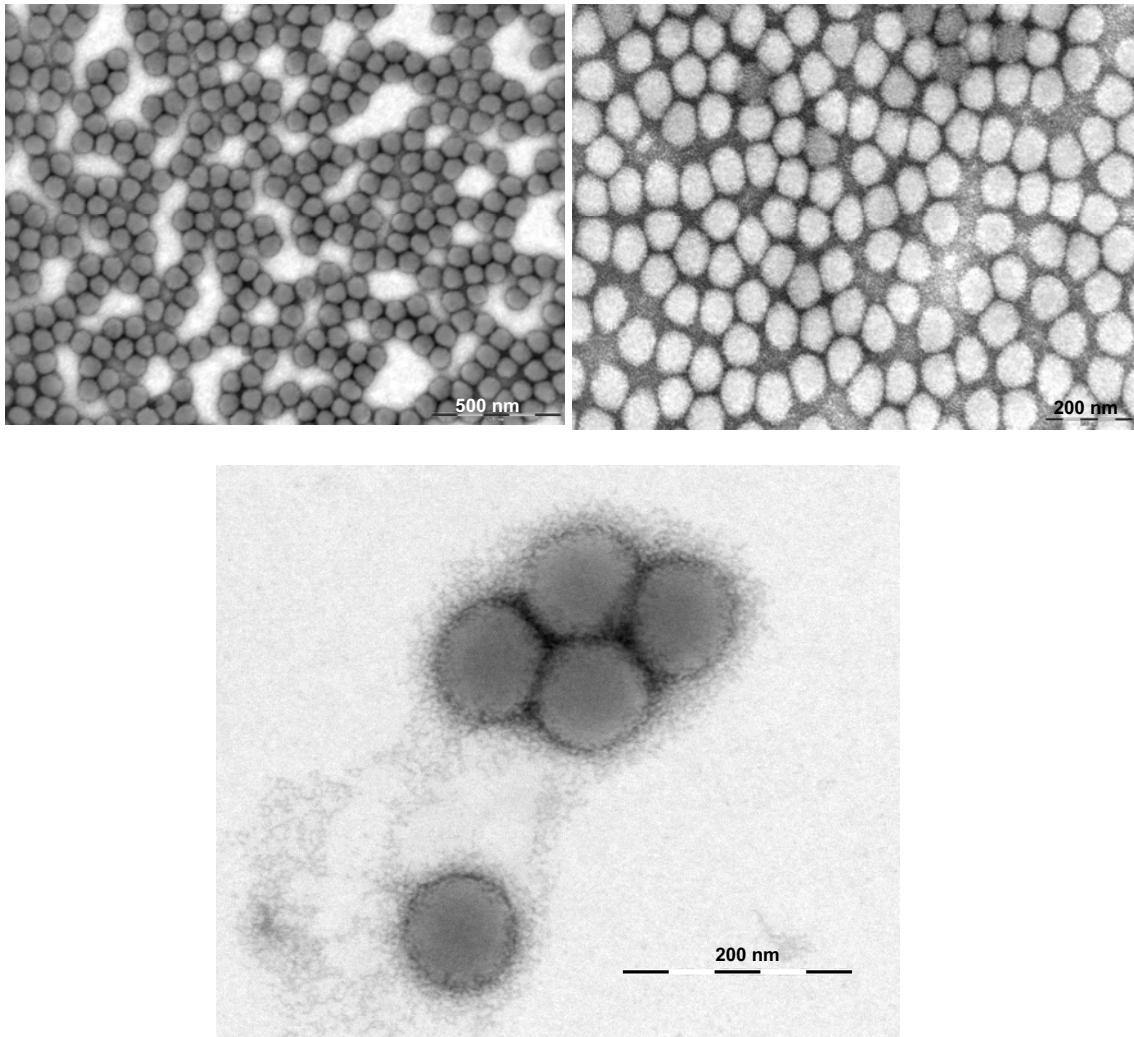


**Fig. 4.78:** Imatge obtinguda per TEM de nanopartícules de PUR lys preparades a una concentració d'IPDI i de lys de 0,04 mmol/g i 0,02 mmol/g respectivament.

Com es pot observar a la micrografia, les nanopartícules de PUR lys sintetitzades mantenint les mateixes condicions de polimerització (temps i temperatura) que per a formar les partícules amb PEG 400, són de mida més petita (uns 20 nm aproximadament) que les de PU PEG. Amb la lys com a biomaterial es van obtenir nanopartícules de l'ordre dels 50 nm, resultats que concorden amb els estudis de DLS (veure apartat 4.2.2.4.1). A la imatge es poden observar fins i tot algunes nanopartícules de diàmetre inferior. Si es comparen amb les nanopartícules de PU PEG preparades amb PEG 200 s'ha de tenir en compte que tot i obtenir-se nanopartícules d'una mida similar, s'ha utilitzat una concentració força superior d'IPDI en la preparació de les nanopartícules de PUR lys.

En relació a la morfologia, les nanopartícules de PUR lys també són de forma arrodonida, isodiamètriques i amb una coberta polimèrica contínua, ben definida i contrastada.

Les nanopartícules de poliurea (PUR) també es poden formar a partir de la reacció entre la biotina i l'IPDI (PUR biot) com ja s'ha constatat a l'apartat 4.2.2.5. A la figura 4.79 es mostren les imatges obtingudes amb TEM de les nanopartícules amb biotina a una concentració de 0,005 mmol/g observades a diferents augments.

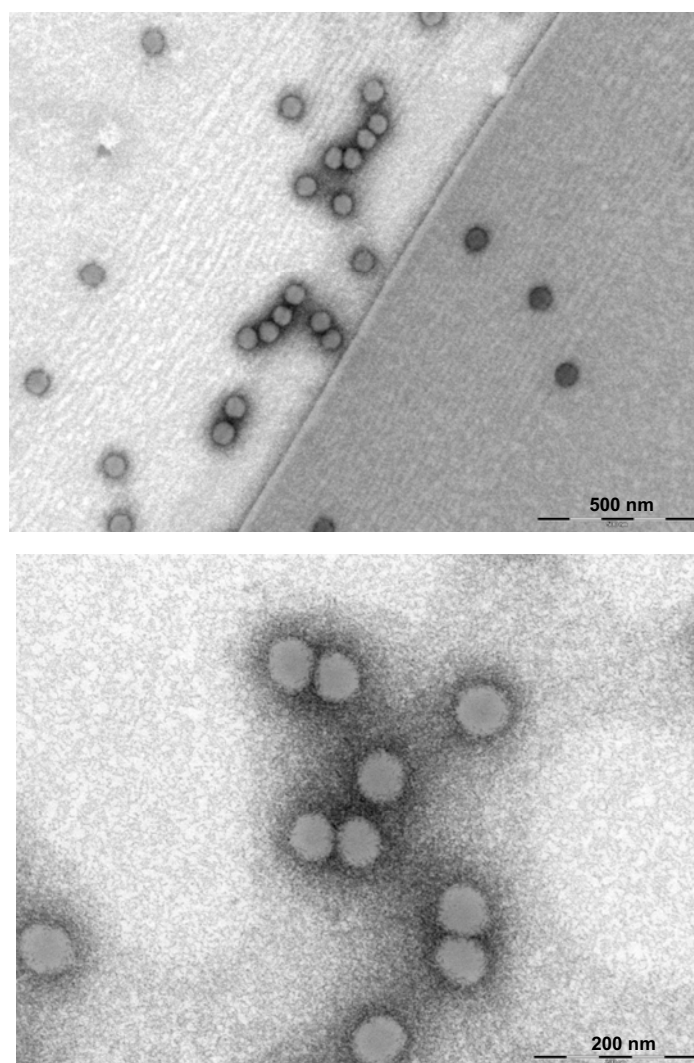


**Fig. 4.79:** Micrografies electròniques de les nanopartícules de PUR biot preparades amb una concentració de biotina de 0,005 mmol/g i d'IPDI de 0,02 mmol/g. A la part inferior de la figura es mostra la imatge ampliada de les nanopartícules de PUR biot observades a  $10^5$  augments.

La caracterització per TEM mostra una població homogènia de nanopartícules de forma més o menys arrodonida amb un diàmetre aproximat de 95 nm (els resultats de DLS de l'apartat 4.2.2.5 indicaven un Z-Average de 102 nm). A la imatge situada a la dreta de la figura i observada a  $10^5$  augments sembla que es perd una mica la morfologia regular de

les nanopartícules tot i que podria ser conseqüència del procés de preparació i observació de les mostres.

L'elevada reactivitat dels grups  $-N=C=O$  del diisocianat amb grups  $-NH_2$ , ha suggerit la possibilitat de poder formar nanopartícules utilitzant proteïnes que reaccionin amb l'IPDI. En aquest treball d'investigació es va emprar com a proteïna l'estreptavidina. A l'apartat 4.2.2.5 ja es va constatar l'obtenció de nanopartícules de poliurea amb estreptavidina (PUR strep). La figura 4.80 correspon a les nanopartícules de PUR strep caracteritzades per TEM i observades a diferents augments.



**Fig. 4.80:** Imatges obtingudes per TEM de nanopartícules de PUR strep observades a diferents augments.

A les imatges de TEM s'observen nanopartícules isodiamètriques d'uns 70 nm de diàmetre amb un embolcall polimèric ben estructurat i definit. Les nanopartícules presenten una estreta distribució del diàmetre de partícula que corrobora que es tracta



d'un sistema de baixa polidispersitat. No es van observar nanopartícules de mida superior als 90 nm.

#### **4.2.2.7.3. Caracterització de les nanopartícules obtingudes per Microscòpia de Força Atòmica (AFM)**

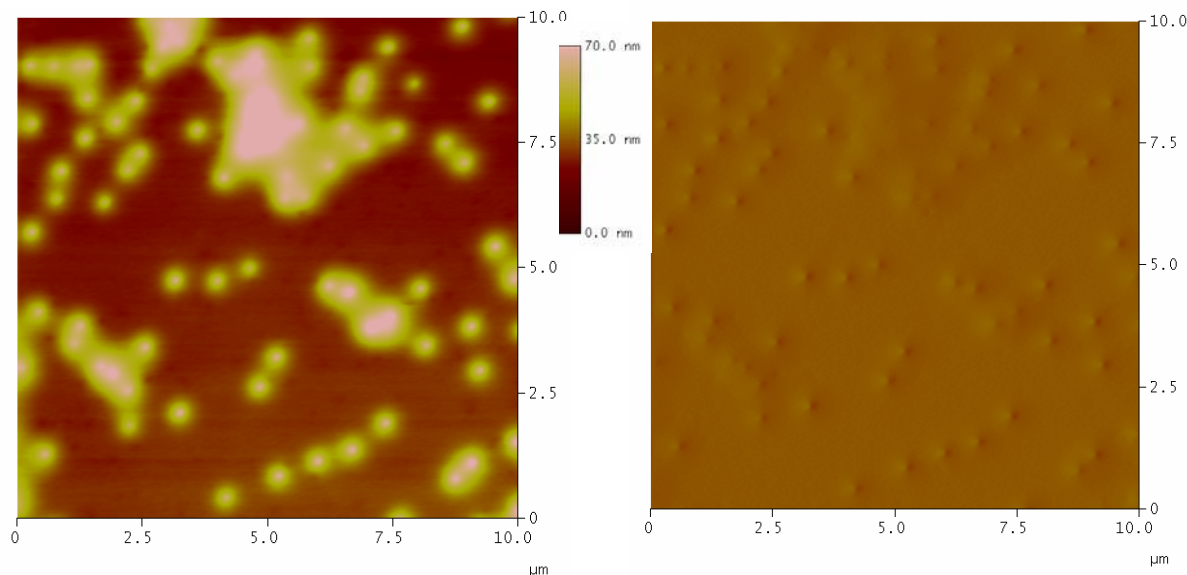
L'observació de les nanopartícules per microscòpia de forces atòmiques permet determinar les característiques morfològiques, el diàmetre de partícula, la topografia de la mostra i fins i tot l'homogeneïtat de les composicions. Així, les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep es van caracteritzar per AFM amb la finalitat de corroborar l'esfericitat de les nanopartícules i l'homogeneïtat de les diferents composicions. D'acord amb els estudis de Montasser et al (2002) es pot considerar que es manté la morfologia esfèrica de les nanopartícules, enteses com a nanoestructures amb una matriu sòlida, quan la relació diàmetre/alçada de partícula és  $< 4$ .

Per tal de poder observar les nanopartícules aïllades ha estat necessària una dilució mínima d'1:50 degut a l'elevada concentració de tensioactiu present a la superfície de la nanopartícules que afavoreix la seva agregació. La suspensió de nanopartícules es va dipositar sobre una làmina de mica fresca (Fitzen-Garcia, 2009) i es va deixar assecar a una cambra amb corrent de nitrogen per a la seva fixació durant 12 hores. Les imatges d'AFM es van obtenir per la modalitat de "tapping" i no per la de contacte, ja que la presència d'elevades concentracions de tensioactiu comportava una fàcil adhesió a la sonda.

Tal com s'ha comentat anteriorment, tenint en compte l'elevada reactivitat de l'IPDI, el grup diisocianat podria reaccionar tant amb els hidroxils del tensioactiu, presents en totes les formulacions, com amb els grups OH del PEG 400 o els grups amino de la lys, la biotina i l'estreptavidina. Per tant, es podrien obtenir nanopartícules de diferent naturalesa dins de la mateixa formulació o bé, el polímer que recobreix les partícules, podria estar constituït conjuntament de productes derivats de la reacció de l'IPDI amb el tensioactiu i de la reacció de l'IPDI amb el biomaterial. Amb la finalitat de descartar la possibilitat de l'existència de dos tipus diferents de nanopartícules dins la mateixa composició, es va utilitzar el contrast de fases en la modalitat de "tapping".

A continuació, es poden observar diferents imatges topogràfiques i de contrast de fases de les diferents nanopartícules estudiades.

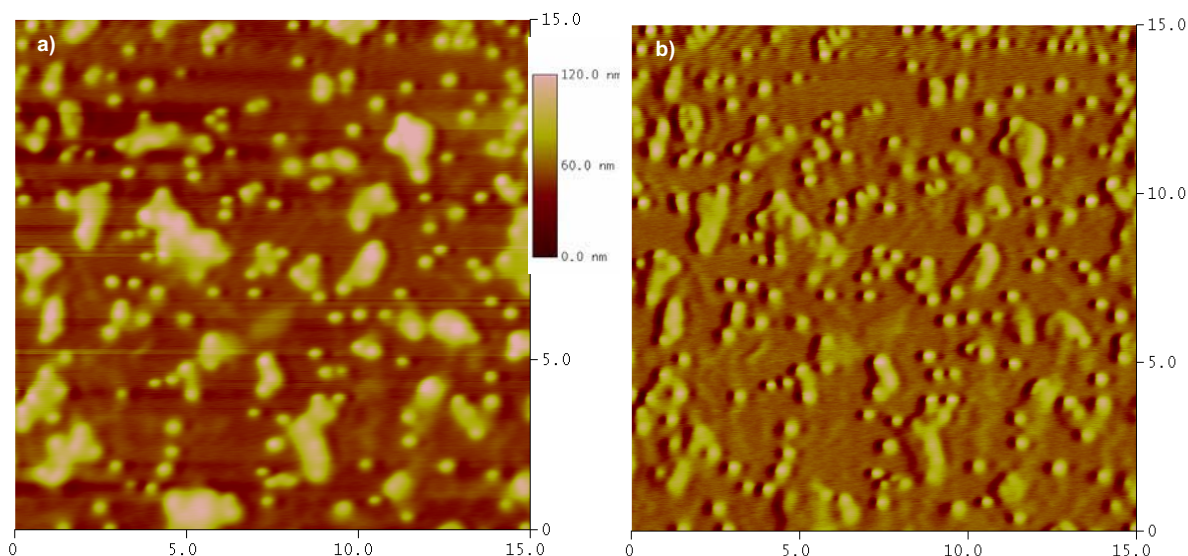
Les figures 4.81, 4.82 i 4.83 corresponen respectivament a les imatges topogràfiques, de contrast de fases i 3D obtingudes amb AFM de les nanopartícules de PU PEG preparades amb una concentració d'IPDI i de PEG 400 de 0,02 mmol/g. Per a l'observació de les mostres es va aplicar un factor de dilució d'1:50 i d'1:125.



**Figura 4.81:** Imatges topogràfiques obtingudes per AFM en la modalitat de tapping de les nanopartícules de PU PEG (concentració 0,02 mmol PEG/g de nano-emulsió) observades a una escala de 10  $\mu\text{m}$ . Les imatges corresponen a una dilució 1:50 de la suspensió inicial de nanopartícules.

A la figura 4.81, en la qual s'ha utilitzat la composició més concentrada, es pot observar la presència d'uns corpuscles de forma arrodonida que correspondrien a nanopartícules aïllades de PU PEG i la formació d'agregats voluminosos d'aquestes. El punt més àlgid del mapa topogràfic equival a una alçada de 70 nm. A les imatges, les nanopartícules de PU presenten la peculiaritat de trobar-se envoltades per una aurèola difusa que podria ser deguda a les diferents capes de tensioactiu i PEG 400 que recobririen la superfície polimèrica. Tant el Tween 80 com el PEG 400 dipositats a la superfície de les nanopartícules, a través dels grups OH, podrien formar ponts d'hidrogen amb l'aigua de tal manera que les molècules d'aigua quedarien fortament retingudes a la superfície formant diferents capes d'hidratació (Alves-Pereira, 2008). Cal destacar que aquesta aurèola únicament es va observar en les nanopartícules de PU PEG.

Per tal d'evitar la formació d'agregats, eliminar l'excés de tensioactiu i evitar la formació de capes d'hidratació durant el procés de preparació de les mostres, es va incrementar el factor de dilució a 1:125.



**Figura 4.82:** Imatge a) topogràfica i b) de contrast de fases de nanopartícules de PU PEG observades a una escala de  $15 \times 15 \mu\text{m}$  per AFM en la modalitat de tapping. Les imatges corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió inicial de nanopartícules.

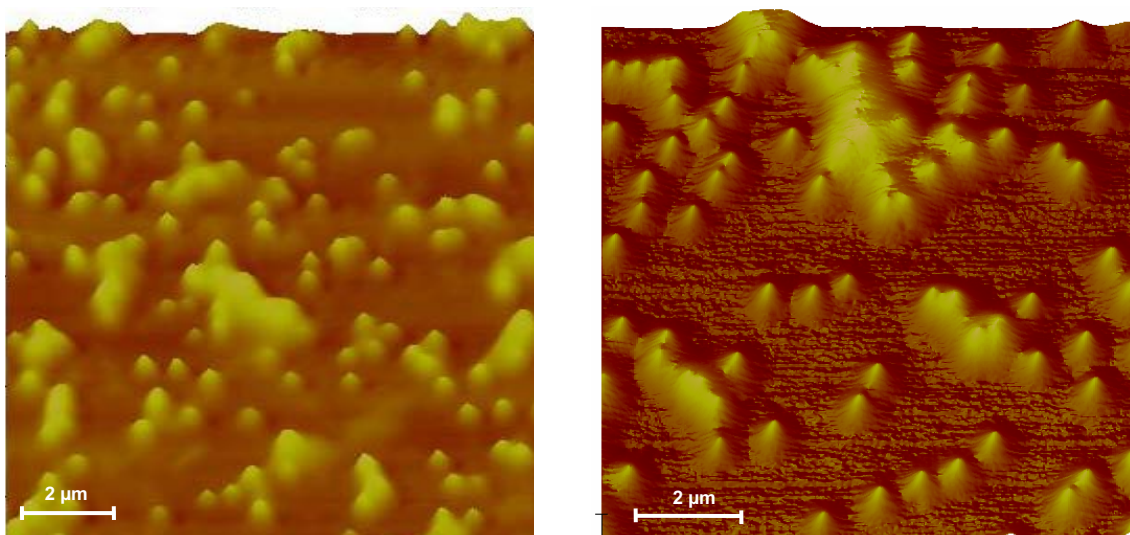
Les imatges d'AFM mostren una població homogènia de nanopartícules de PU de morfologia aparentment esfèrica tot i la presència de diversos agregats constituïts principalment per nanopartícules superposades i immerses en diferents capes de tensioactiu. Tant a les imatges topogràfiques com de contrast de fases es pot apreciar també la formació de diferents capes dipositades sobre la superfície de mica amb una alçada compresa entre 2 i 20 nm que podrien correspondre al Tween 80.

A partir de la figura 4.82a, es va determinar el diàmetre i l'alçada de 30 nanopartícules aïllades de PU PEG. Les nanopartícules van presentar una estreta distribució de mides en relació a aquests dos paràmetres (diàmetre i alçada). El diàmetre promig de les nanopartícules de PU PEG va ser de  $167 \pm 30$  nm i l'alçada de  $61 \pm 9,8$  nm. Per tant, en concordança amb la hipòtesi postulada per Montasser et al. (2002) esmentada anteriorment, les nanopartícules presentarien una morfologia esfèrica, ja que la relació diàmetre/alçada es troba al voltant de 2,8. Per altra banda, la mida de partícula determinada per AFM va ser força superior a la que s'havia obtingut per DLS (al voltant de 80 nm), fet que podria explicar-se per un possible aplanament de les nanopartícules de PU PEG en ser dipositades sobre la mica durant el procés de fixació i secat amb corrent de nitrogen. L'increment del diàmetre de partícula en relació als resultats obtinguts amb DLS en aquest cas, també podria ser degut a la formació de diferents capes d'hidratació al voltant de les nanopartícules, com ja s'ha explicat anteriorment. Els resultats obtinguts concorden amb els estudis desenvolupats per diversos autors

(Montasser, 2002; Alves-Pereira, 2008; Fritzen-Garcia, 2009) que també van caracteritzar diferents sistemes de nanopartícules per AFM i DLS.

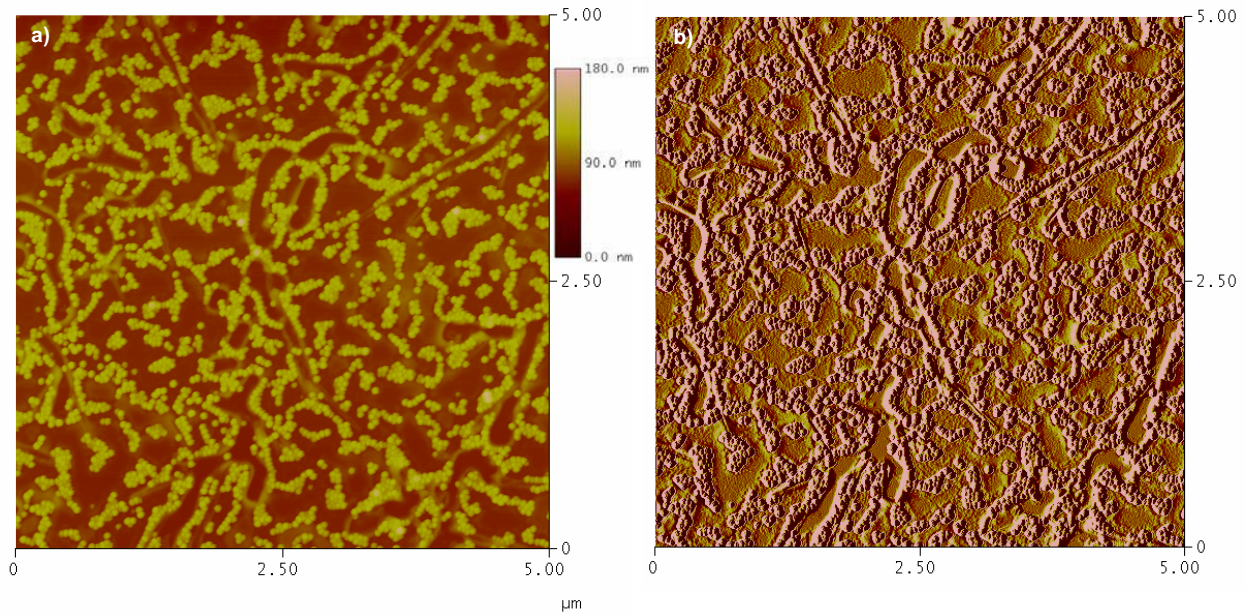
A la imatge de contrast de fases (Fig 4.82b) es pot observar que les nanopartícules són homogènies en quant a composició i per tant estructuralment idèntiques. El fet que no s'observin diferències entre les nanopartícules a nivell de la composició és indicatiu doncs de l'existència d'un únic tipus d'embolcall polimèric. A l'apartat 4.2.2.3 ja es va proposar un model de coberta polimèrica constituïda conjuntament per unitats d'uretà derivades de la reacció de l'IPDI amb el tensioactiu i de l'IPDI amb el PEG 400. La formació de nanopartícules únicament a partir de la reacció de l'IPDI i el tensioactiu es va desestimar en base als resultats dels estudis de caracterització amb DLS que evidenciaven l'obtenció de nanopartícules de menor diàmetre en presència de PEG.

Les imatges 3D (figura 4.83) posen de manifest com les nanopartícules de PU PEG queden dipositades sobre les diferents capes de tensioactiu o immerses al seu interior dificultant la determinació del diàmetre de partícula i emascarant la seva morfologia esfèrica. Les nanopartícules de PU PEG s'observen com a monticles recoberts amb denses capes de tensioactiu que sobresurten de la superfície de mica. Per a l'obtenció d'aquestes imatges es va emprar la composició diluïda 125 vegades en relació a la suspensió aquosa inicial de nanopartícules.

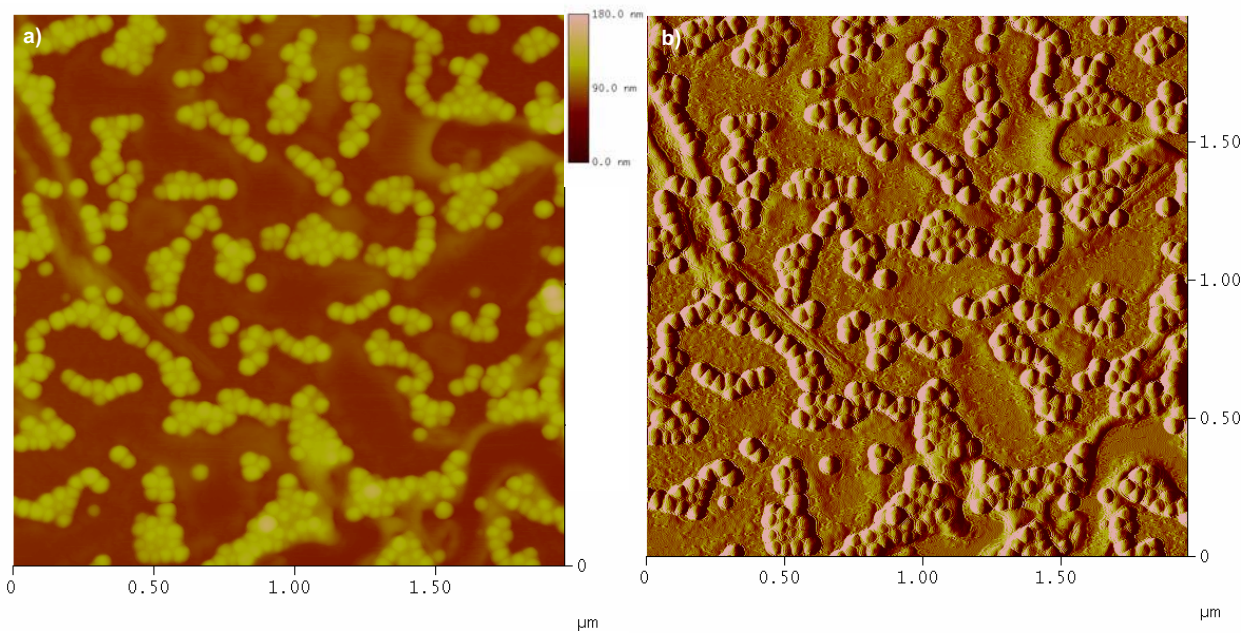


**Figura 4.83:** Imatge 3D de les nanopartícules de PU PEG observades per AFM a una escala de 15 x 15 μm. Les nanopartícules observades corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió aquosa inicial.

Les figures 4.84, 4.85 i 4.86 corresponen als estudis de caracterització realitzats amb AFM de les nanopartícules de PUR lys preparades amb una concentració de 0,04 mmol/g d'IPDI i de 0,02 mmol/g de lys. Per a la correcta observació de la mostra va ser necessària una dilució 1:125 de la formulació inicial.



**Figura 4.84:** Imatge a) topogràfica i b) de contrast de fases de nanopartícules de PUR lys observades a una escala de  $5 \times 5 \mu\text{m}$  per AFM en la modalitat de tapping. Per a l'obtenció de les imatges es va dur a terme una dilució 1:125 de la suspensió inicial de nanopartícules.

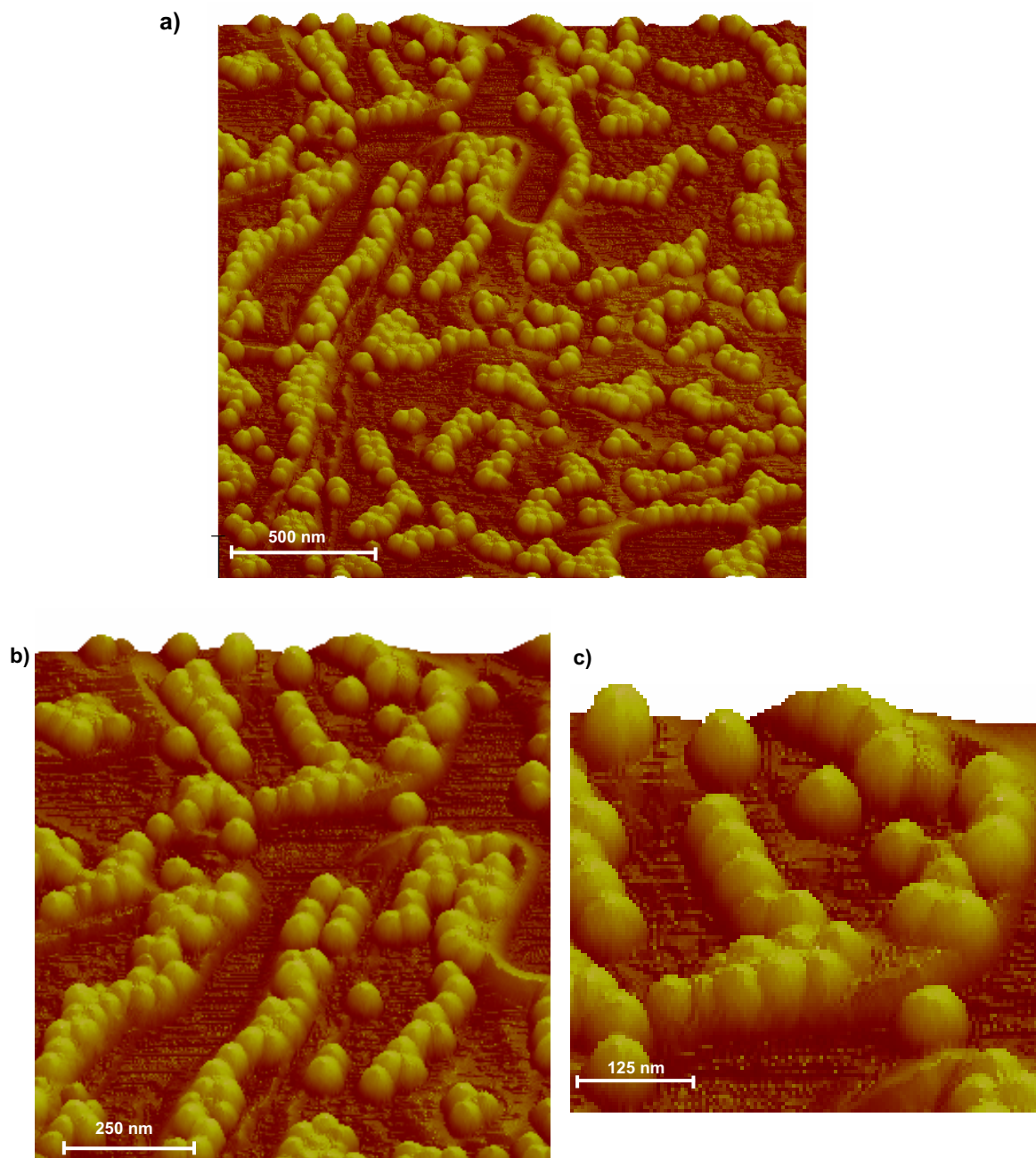


**Figura 4.85:** Imatge a) topogràfica i b) de contrast de fases de nanopartícules de PUR lys observades a una escala de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  per AFM en la modalitat de tapping. Les composicions observades corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió aquosa inicial.

Com era d'esperar, tenint en compte els baixos valors de polidispersitat obtinguts amb DLS propis de sistemes amb una distribució estreta i monomodal de la mida de partícula, a les figures 4.84 i 4.85 (a) es pot observar una única població de nanopartícules de forma arrodonida i força homogènies en quant a diàmetre de partícula. Amb la finalitat de corroborar l'esfericitat de les nanopartícules de PUR lys, es van determinar els diàmetres i les alçades de 30 nanopartícules. Es van obtenir uns valors de diàmetre de  $65,19 \pm 6,46$  nm i d'alçada de  $44,44 \pm 5,19$  nm que indiquen que les nanopartícules de PUR lys són morfològicament esfèriques. Les diferències entre ambdós valors podrien ser degudes a les rugositats que presenta el substrat de mica sobre el qual s'han dipositat les mostres. Els valors obtinguts concorden pràcticament amb els resultats obtinguts per DLS per contra del que succeïa amb les nanopartícules de PU PEG explicades anteriorment. El diàmetre de les nanopartícules determinat per DLS va ser de 60 nm, les petites diferències entre ambdues tècniques podrien ser degudes a que en la caracterització per AFM es té en compte el gruix de la punta. En el cas de les nanopartícules de PUR lys no s'observa un aplanament de les partícules com el que es produïa en les composicions preparades amb PEG 400, degut a diferències estructurals a nivell de l'embolcall polimèric que els conferiria una major rigidesa. Cal destacar que la lisina és una molècula molt més petita que el PEG 400, amb la qual cosa la reacció entre la lys i l'IPDI donaria lloc a un polímer de poliurea amb unes regions flexibles ("soft segments") molt menys voluminoses que per al PEG 400.

A les imatges de contrast de fases (4.84b i 4.85b), que corresponen a diferents regions de la mostra, no es van detectar diferències de composició entre les nanopartícules. Per tant, es pot desestimar la hipòtesi postulada a l'apartat 4.2.2.4 de la formació de nanopartícules constituïdes únicament per poliuretà i únicament per poliurea dins la mateixa formulació. D'acord amb els resultats obtinguts en aquest estudi i tenint en consideració els estudis realitzats en capítols anteriors, les nanopartícules de PUR lys presentarien un embolcall polimèric format per unitats de poliuretà i de poliurea conjuntament. La formació exclusivament de nanopartícules de poliuretà ja es va descartar per les diferències obtingudes en el diàmetre de partícula entre les nanopartícules de PU i les de PUR lys (apartat 4.2.2.4).

A continuació es mostren les imatges 3D obtingudes amb les nanopartícules de PUR lys.

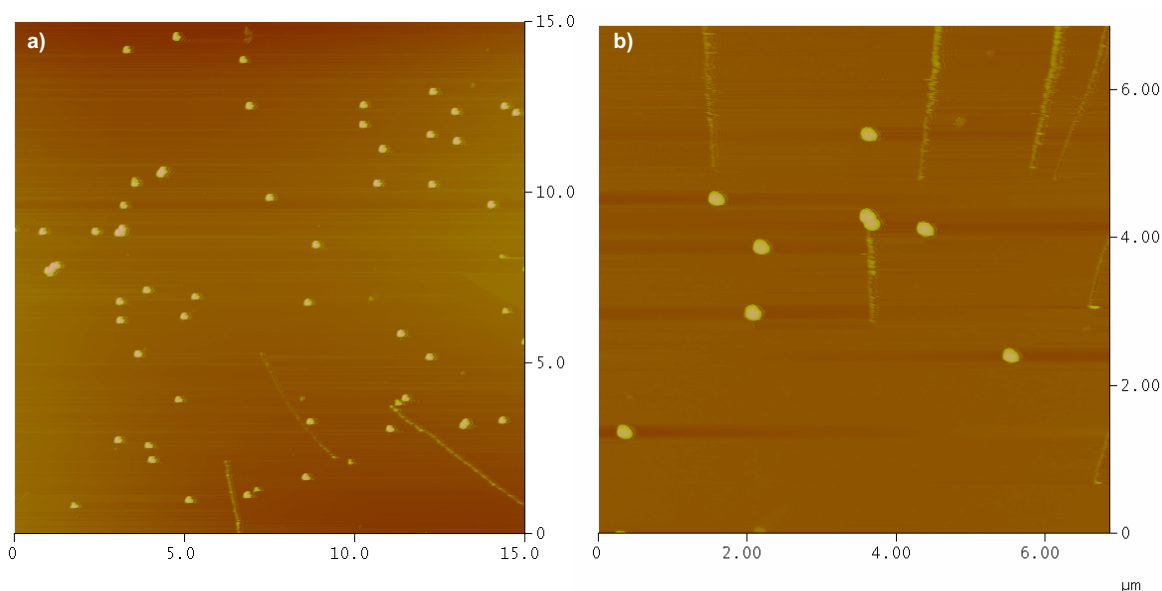


**Figura 4.86:** Imatge 3D de les nanopartícules de PUR lys observades per AFM a a) una escala de  $2 \times 2 \mu\text{m}$  i b) i c) ampliació del quadrant lateral superior esquerre de la imatge. Les nanopartícules observades corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió aquosa inicial.

A la imatge a), corresponent a la visualització en 3D de les nanopartícules de PUR lys a una escala de  $2 \times 2 \mu\text{m}$ , es pot apreciar tant la morfologia pràcticament esfèrica de les nanopartícules de PUR lys com les irregularitats presents en el substrat de mica fresca sobre el qual es troben dipositades. Les imatges 3D també han posat en evidència la presència de diverses capes de tensioactiu a la mostra.

L'ampliació de les imatges (figures b i c) permet apreciar la superfície llisa de les nanopartícules de PUR lys que indicaria que durant el procés de formació de les nanopartícules no s'ha alliberat diòxid de carboni com a producte de la reacció no desitjada amb l'aigua (figura 1.15) ja que l'alliberació de CO<sub>2</sub> implicaria la formació de porus (Jabbari, 2000).

Les figures 4.87 i 4.88 corresponen a les imatges topogràfiques i 3D obtingudes amb AFM de les nanopartícules de PUR biot preparades amb una concentració d'IPDI de 0,02 mmol/g i de biotina de 0,005 mmol/g. La suspensió inicial de nanopartícules es va diluir 125 vegades.



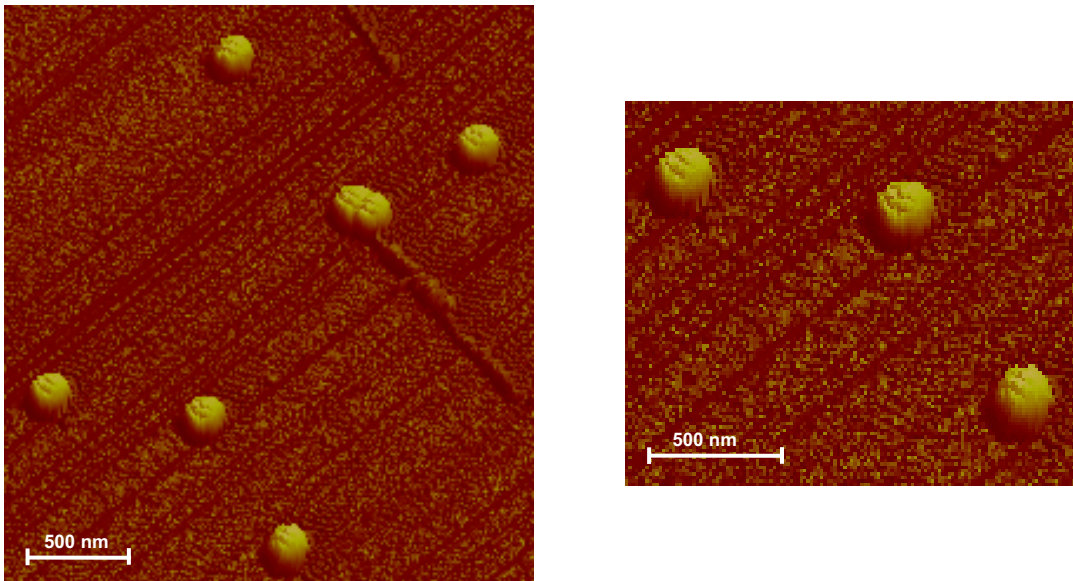
**Figura 4.87:** Imatges topogràfiques de les nanopartícules de PUR biot observades a una escala a) de 15 x 15 μm i b) 7 x 7 μm per AFM en la modalitat de tapping. Les imatges corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió inicial de nanopartícules.

Com es pot observar a les micrografies, la població de nanopartícules de PUR biot és molt homogènia en relació al diàmetre de partícula ja que no s'observa una àmplia dispersió de mides. Es va determinar el diàmetre i l'alçada de 30 nanopartícules de PUR biot. El diàmetre promig obtingut va ser de  $204 \pm 19$  nm i l'alçada de  $98 \pm 4,66$  nm. Els valors de diàmetre determinats per DLS es trobaven al voltant de 100 nm (apartat 4.2.2.5). Com ja s'ha explicat en el cas de les nanopartícules de PU PEG, les diferències de diàmetre podrien ser degudes a una petita deformació de les nanopartícules de PUR biot durant el procés de preparació de les mostres previ a la seva observació per AFM.



Pel que fa a la seva morfologia, d'acord amb els estudis desenvolupats per Montasser et al. (2002), es podria dir que les nanopartícules preparades amb biotina són força esfèriques, ja que la relació entre el diàmetre i l'alçada es troba al voltant de 2.

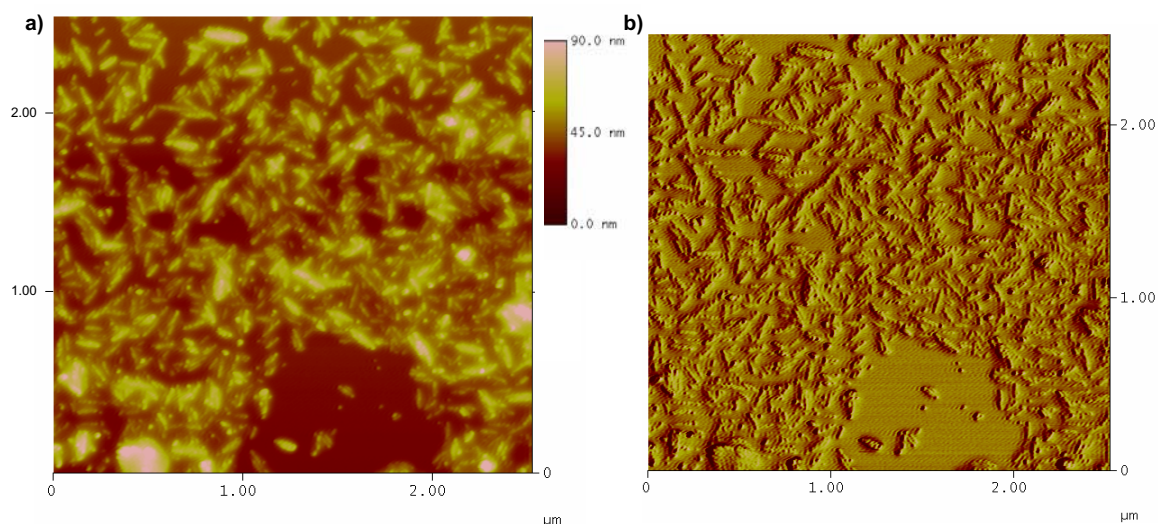
Les imatges 3D van permetre observar amb més detall la morfologia d'aquestes nanopartícules.



**Figura 4.88:** Imatges 3D de les nanopartícules de PUR biot observades per AFM amb la modalitat de tapping. Les imatges corresponen a una dilució 1:125 de la suspensió inicial de les nanopartícules.

A les imatges es poden observar nanopartícules de PUR biot de morfologia esfèrica tot i que queden lleugerament endinsades en el substrat de mica fresca. La seva superfície per contra del que s'havia observat amb les nanopartícules de PUR lys sembla ser lleugerament rugosa, fet que podria atribuir-se a un efecte de la punta en contactar amb la mostra. De fet, durant l'observació, es van generar diferents soles com a conseqüència de l'arrossegament d'algunes de les nanopartícules, que són indicatius del contacte d'aquestes amb la punta de l'AFM.

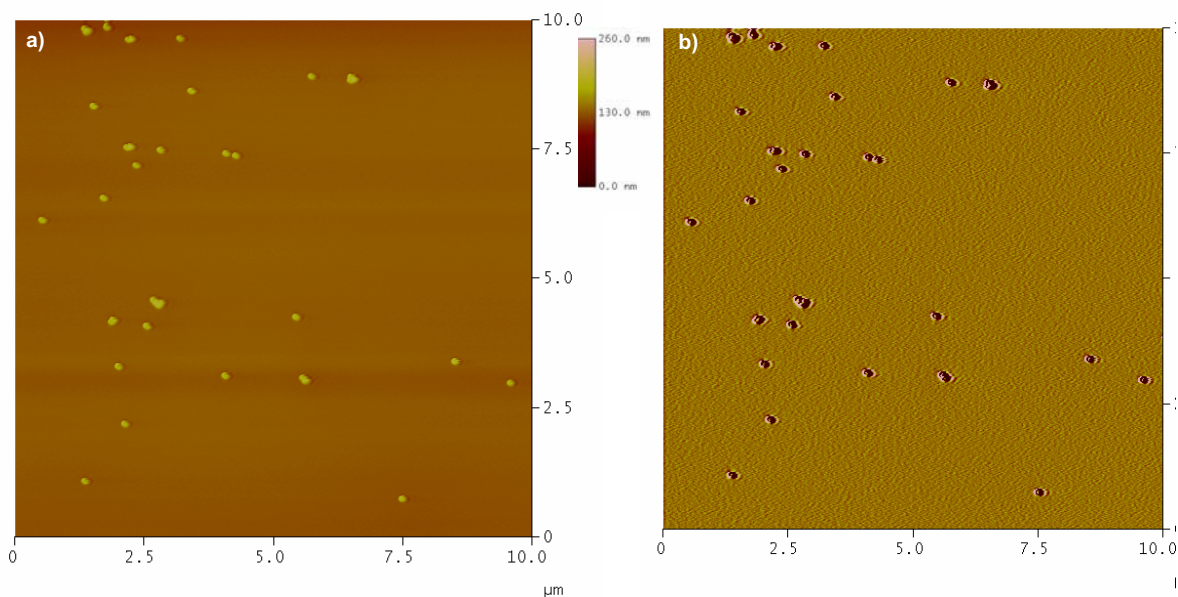
En el cas de les nanopartícules de PUR strep, el procés de preparació i observació de la mostra per AFM es trobava dificultat ja que a determinades concentracions i durant el procés d'assecamment es podria produir una cristal·lització de la proteïna com la que s'observa a la figura 4.89.



**Figura 4.89:** Imatge a) topogràfica i b) contrast de fases obtingudes per AFM a una escala de  $2,5 \times 2,5 \mu\text{m}$  dels cristalls d'estreptavidina.

Per a evitar els processos de cristallització, es va haver de diluir considerablement la concentració de la composició inicial. Les imatges de la figura 4.89 concretament corresponen a un factor de dilució 1:75.

A les figures 4.89 i 4.90 es poden observar les imatges topogràfiques, de contrast de fases i 3D de les nanopartícules de PUR strep. Les nanopartícules es van preparar a una concentració d'IPDI de  $0,02 \text{ mmol/g}$  i d'estreptavidina de  $2 \times 10^{-5} \text{ mmol/g}$ . Per a la seva observació per AFM es va realitzar una dilució 1:200 de la suspensió de nanopartícules.

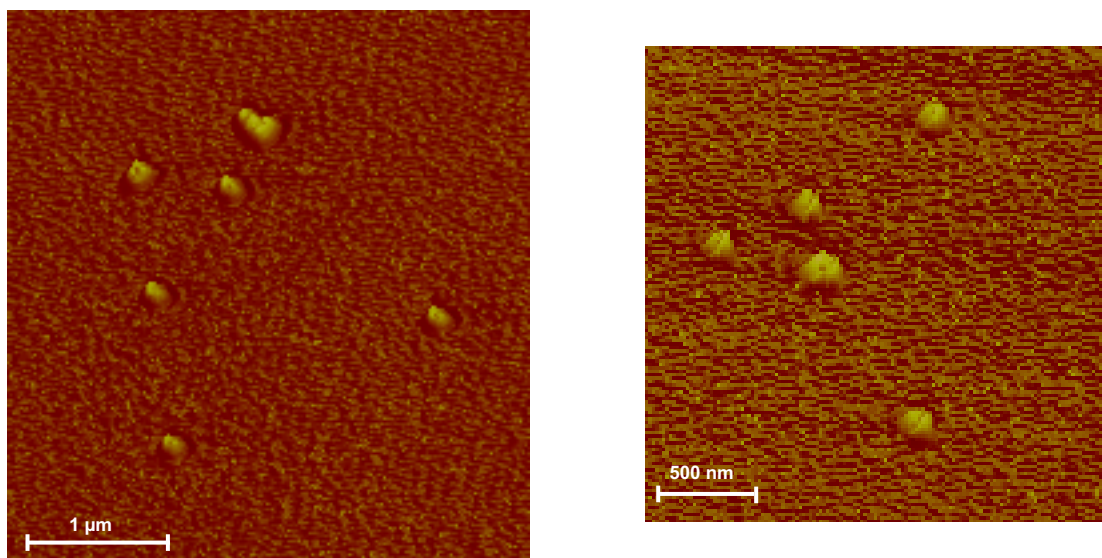


**Figura 4.89:** Imatge a) topogràfica i b) de contrast de fases de nanopartícules de PUR strep observades a una escala de  $10 \times 10 \mu\text{m}$  per AFM en la modalitat de tapping. Les imatges corresponen a una dilució 1:200 de la suspensió inicial de les nanopartícules.

Les nanopartícules de PUR strep mostrades a la imatge topogràfica presenten una morfologia esfèrica i un diàmetre de partícula homogeni. A partir d'un número representatiu de nanopartícules es va determinar el diàmetre i l'alçada com ja s'havia fet en els casos anteriors (nanopartícules de PU PEG, PUR lys i PUR biot). Per a les nanopartícules de PUR strep es va obtenir un diàmetre de  $131 \pm 24$  nm i una alçada de  $52 \pm 7$  nm. En la caracterització per DLS s'havia obtingut un valor de diàmetre promig de 70 nm. Les diferències s'atribueixen principalment al procés de deposició de la mostra sobre la superfície de mica que podria donar lloc, com ja s'ha explicat anteriorment, a un aplanament de les nanopartícules i com a conseqüència a un increment del seu diàmetre.

Les imatges de contrast de fases (Fig.4.89b) no indiquen diferències de composició entre les nanopartícules, per tant l'embolcall polimèric d'aquestes estarà constituït pel mateix tipus de copolímer. A l'apartat 4.2.2.5 ja es va posar de manifest la participació de l'estreptavidina en el procés de polimerització, per tant la coberta polimèrica podria contenir tant unitats d'uretà derivades de la reacció amb el Tween com de poliurea fruit de la reacció amb els grups amino de l'estreptavidina.

A continuació es mostren les imatges 3D de les nanopartícules de PUR strep.



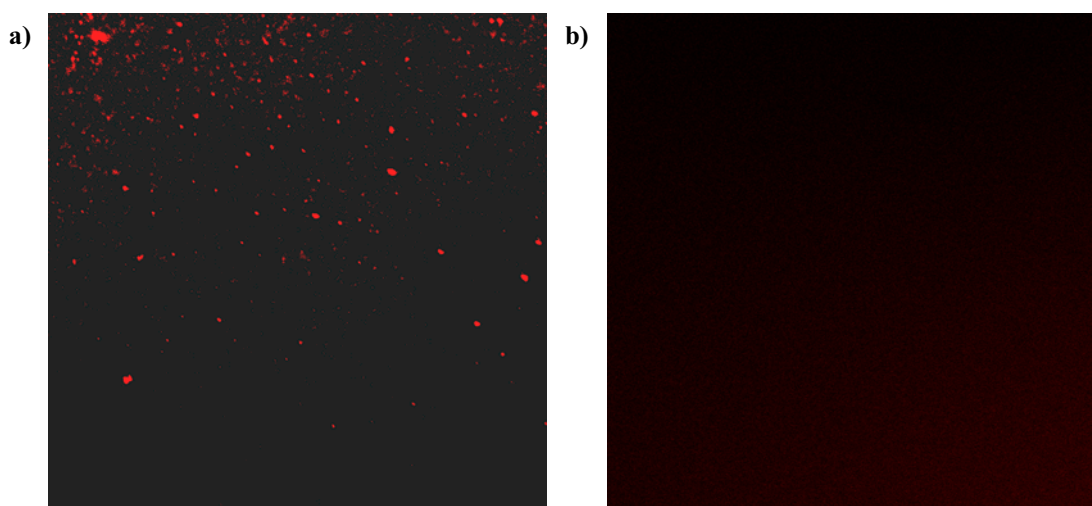
**Figura 4.90:** Imatges 3D de les nanopartícules de PUR strep observades per AFM amb la modalitat de tapping. Les imatges corresponen a una dilució 1:200 de la suspensió inicial de les nanopartícules.

A les imatges 3D (Fig 4.90) es pot apreciar com les nanopartícules de PUR strep s'endinsen en el substrat de mica fresca dificultant així la seva caracterització. Malgrat

aquest fet, a les micrografies encara es pot observar la morfologia relativament esfèrica que presenten les nanopartícules de PUR strep.

#### 4.2.2.7.4. Caracterització de les nanopartícules de biotina amb Microscòpia Confocal

La biotina, com ja s'ha explicat al capítol 3.1.2.5, és una biomolècula que s'uneix fortament i selectivament a l'estreptavidina. Gràcies a aquesta unió les nanopartícules de biotina s'han pogut marcar amb fluorescència (el complex fluorescent es troba unit a l'estreptavidina). A la figura 4.91 es poden observar les nanopartícules de PUR biot sense el fluorescent i les nanopartícules de PUR biot marcades amb el complex atto 565 streptavidin que emet a la franja del taronja-vermell.



**Fig.4.91:** a) Nanopartícules de PUR biot (marcades amb el complex fluorescent atto 565 streptavidin) i b) Control negatiu de les nanopartícules de PUR biot, observades per microscòpia confocal.

A la figura 4.91a s'observen nanopartícules de biotina-estreptavidina (tinció positiva en vermell) sobre un fons homogeni de color més atenuat. El marcatge no correspon a partícules aïllades sinó a agregacions de partícules ja que el límit de resolució del microscopi emprat es troba al voltant de 200 nm i les nanopartícules observades presenten una mida de 95-100 nm (determinada per TEM i DLS). Malgrat que la qualitat de la imatge no és òptima, el fet que s'observi marcatge positiu indica que el lloc d'unió de la biotina amb l'estreptavidina roman inalterat durant el procés de polimerització. La figura 4.91b correspon al control negatiu, és a dir les nanopartícules de biotina no marcades amb fluorescència. Com es pot observar, les nanopartícules estudiades no

presenten fluorescència intrínseca amb la qual cosa tota la fluorescència detectada a la Fig.4.91a és deguda exclusivament a la unió amb les molècules d'estreptavidina.

#### **4.2.2.8. Incorporació de ketoprofèn en nanopartícules seleccionades i cessió a una solució receptora**

S'ha estudiat la incorporació d'un antiinflamatori no esteroïdal (ketoprofèn) en nano-emulsions i nanopartícules de poliuretà i poliurea emprant com a component aquós aigua o PBS (pH: 7,4). Així, es van seleccionar composicions preparades amb PEG 400 i amb lys com a formulacions representatives de nanopartícules de PU i PUR respectivament. En relació a les poliurees (PUR) es van seleccionar les nanopartícules amb lys ja que per a aquestes composicions s'havien obtingut els diàmetres de partícula més petits determinats per DLS (~ 50 nm, apartat 4.2.2.4.1). El ketoprofèn presenta uns valors de solubilitat màxima en aigua de 0,014% i en PBS (pH:7,4) de 0,41%, determinats experimentalment mitjançant HPLC.

Els estudis per a determinar la solubilitat màxima del ketoprofèn van consistir en la incorporació progressiva de petites quantitats de fàrmac a les mescles prèviament preparades fins a l'aparició de precipitat o d'un canvi significatiu en les composicions que indicaria que s'ha assolit la màxima concentració de solubilització (veure capítol 3.3.7). Les mescles corresponents a nano-emulsions i nanopartícules es van opacificar en excedir-se la concentració màxima de solubilització, fet que indicaria que s'haurien produït modificacions importants en l'estructura interna de les gotes o partícules de la fase dispersa. Per a algunes composicions, aquestes modificacions van comportar fins i tot la desestabilització del sistema. Per tant, per a determinar la concentració màxima de solubilització es van preparar nano-emulsions i nanopartícules amb una concentració de ketoprofèn lleugerament inferior a aquella a partir de la qual s'observen canvis en l'aspecte visual. El ketoprofèn incorporat en les nano-emulsions i en les suspensions de nanopartícules es va quantificar per HPLC.

Per altra banda, també es va estudiar la influència de la incorporació de ketoprofèn en les dispersions a partir de la determinació dels paràmetres morfomètrics (diàmetre de gota o partícula i índex de polidispersitat) mitjançant DLS. Les composicions estudiades es van preparar amb concentracions de ketoprofèn inferiors a la concentració màxima de solubilització. Concretament, es va seleccionar una concentració de 0,92% en pes per a

formulacions preparades amb aigua i d'1,23% per a les dispersions amb PBS a pH 7,4. Les formulacions es van preparar a 25°C solubilitzant el ketoprofèn en la mescla O/T (nano-emulsions) i addicionant posteriorment el component aquós (veure capítol 3.3.7). En el cas de les nanopartícules de PU PEG i PUR lys, el fàrmac s'ha incorporat per sonicació en les nanopartícules prèviament preparades. La incorporació del fàrmac abans del procés de polimerització no ha sigut possible ja que durant el procés de formació de les nanopartícules es va produir una separació en fases deguda a la interacció fàrmac-monòmer. Considerant la reactivitat química dels diisocianats, el grup carboxílic del ketoprofèn és susceptible de reaccionar amb el grup isocianat de l'IPDI donant lloc a un producte inestable (veure capítol 1.2.4).

Finalment, en les composicions corresponents a nanopartícules, es va determinar també l'eficiència d'encapsulació mitjançant el mètode de filtració-centrifugació. Al capítol 3.3.8 es descriu amb detall com s'ha dut a terme aquest procediment.

Els resultats obtinguts en els estudis descrits prèviament es mostren a les taules XXXII i XXXIII. A la taula XXXII es detalla la composició de les formulacions estudiades, la solubilitat màxima de ketoprofèn i l'eficiència d'encapsulació.

**Taula XXXII:** Composició de nano-emulsions i nanopartícules preparades amb PEG 400 i lys emprant com a component aquós aigua o PBS a pH 7,4. Les mescles corresponen a una concentració en pes O/T de 10/90 i una concentració de PEG 400 o lys de 0,02 mmol/g.

Composició	Component aquós (p/p)	Monòmer (IPDI)	Solubilitat màxima de Ketoprofèn a la NE i la suspensió de NP (%)	Eficiència d'encapsulació (%)
NE PEG 400 H <sub>2</sub> O	90% aigua	—	1,13±0,06	—
NE PEG 400 PBS	90% PBS pH 7,4	—	1,55±0,05	—
NP PU PEG 400 H <sub>2</sub> O	90% aigua	0,02 mmol/g	1,08±0,1	95,48
NP PU PEG 400 PBS	90% PBS pH 7,4	0,02 mmol/g	1,52±0,07	80,47
NE lys H <sub>2</sub> O	90% aigua	—	1,41±0,1	—
NE lys PBS	90% PBS pH 7,4	—	1,73±0,09	—
NP PUR lys H <sub>2</sub> O	90% aigua	0,04 mmol/g	1,02±0,03	88,57
NP PUR lys PBS	90% PBS pH 7,4	0,04 mmol/g	1,48±0,02	80,05

En relació a la màxima concentració de ketoprofèn solubilitzada, com era d'esperar, s'han aconseguit incorporar concentracions de fàrmac més elevades en les composicions en les que s'ha emprat PBS com a fase externa, degut a la major solubilitat del ketoprofèn en aquesta solució reguladora de fosfats. Tot i això, tant en nano-emulsions

com en nanopartícules que contenen una elevada fracció en pes de component aquós (90%), s'han solubilitzat concentracions de fàrmac molt superiors (>1% en pes) a les detectades en les solucions aquoses (0,014% i 0,41% en pes de ketoprofèn en aigua i en PBS a pH 7,4 respectivament). Aquestes concentracions són de l'ordre de les obtingudes en la literatura en composicions similars (Puglia, 2008).

Quan es comparen les composicions corresponents a nano-emulsions i nanopartícules preparades amb polietilenglicol (PEG 400), no s'observen diferències significatives en la concentració màxima de ketoprofèn solubilitzada entre ambdós tipus de dispersions. En les formulacions en les que es va emprar aigua com a component aquós, es van solubilitzar concentracions de ketoprofèn de l'ordre de l'1,1 % en pes i en les preparades amb PBS es van obtenir valors de solubilitat màxima al voltant de l'1,5% en pes. Per contra, en les composicions amb lisina, la concentració màxima de ketoprofèn solubilitzat és més elevada en les nano-emulsions (1,41% i 1,71%, aigua i PBS respectivament) que en les nanopartícules (1,02% i 1,48% en pes, composicions amb aigua i PBS respectivament).

Quan es comparen les composicions preparades amb PEG 400 i amb lys, en el cas de les nano-emulsions, s'han solubilitzat concentracions més elevades de fàrmac tant en aigua com en PBS en les formulacions que contenen l'aminoàcid. En relació a les nanopartícules, no s'han observat diferències importants en la concentració màxima solubilitzada de ketoprofèn entre les nanopartícules de PU PEG i de PUR lys.

En les nano-emulsions amb lisina, l'aminoàcid lliure podria complexar-se amb el ketoprofèn i formar la sal corresponent (lisinat de ketoprofèn) que tindria una solubilitat en el component aquós superior a la del fàrmac lliure. Si la solubilitat en la fase externa augmenta es podran incorporar quantitats més elevades de ketoprofèn a la composició. De fet, en la nano-emulsió que no conté lisina es va aconseguir incorporar un 1,23% en pes de ketoprofèn (apartat 4.1.5) enfront l'1,41% obtingut en presència de lisina. En el cas de les nanopartícules de PUR lys, pràcticament tot l'aminoàcid reacciona amb l'IPDI i per tant no queda lisina en forma lliure capaç d'interaccionar amb el ketoprofèn.

Finalment, pel que fa a l'eficiència d'encapsulació (veure capítol 3.3.8), s'ha aconseguit incorporar fins un 95% de fàrmac en les nanopartícules de PU PEG i un 88,57% en nanopartícules de PUR lys quan s'empra aigua com a component aquós. En el cas de les composicions amb PBS a pH 7,4 l'eficiència d'encapsulació disminueix considerablement fins a valors del 80% ja que el fàrmac és molt més soluble en la

solució reguladora de fosfats que en aigua (0,41% enfront 0,014% en pes) detectant-se per HPLC una major concentració de fàrmac lliure.

A la taula XXXIII es poden observar els valors de mida de partícula i polidispersió obtinguts per DLS en composicions sense ketoprofèn i composicions en les quals s'ha incorporat el fàrmac.

**Taula XXXIII:** Diàmetre de partícula i polidispersitat (P) de composicions amb PEG 400 i lys preparades amb aigua i PBS.

Composició	Caracterització en absència de fàrmac		Caracterització en incorporar ketoprofèn *	
	Z-average (nm)	P	Z-average (nm)	P
NE PEG 400 H <sub>2</sub> O	13,43	0,137	10,66	0,136
NE PEG 400 PBS	12,46	0,195	11,73	0,103
NP PU PEG H <sub>2</sub> O	81,46	0,121	55,80	0,162
NP PU PEG PBS	72,86	0,119	54,66	0,119
NE lys H <sub>2</sub> O	9,29 <sup>1</sup>	0,272 <sup>1</sup>	10,36	0,142
NE lys PBS	11,06 <sup>1</sup>	0,274 <sup>1</sup>	12,46	0,121
NP PUR lys H <sub>2</sub> O	64,03	0,135	49,93	0,109
NP PUR lys PBS	79,19	0,118	67,70	0,149

\* En les composicions preparades amb aigua com a component aquós es va solubilitzar un 0,92% en pes de ketoprofèn i en les que contenen PBS a pH 7,4 un 1,23% en pes de fàrmac.

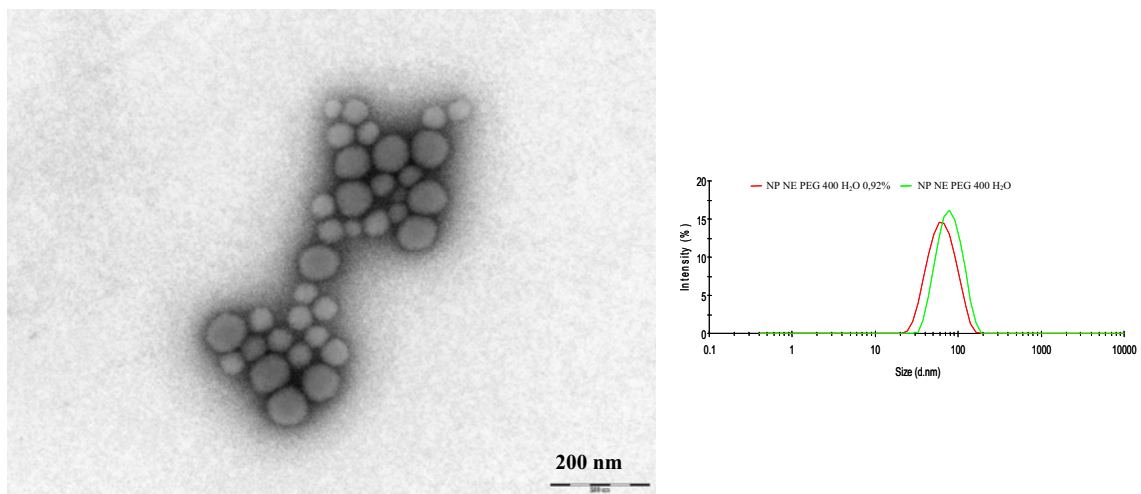
<sup>1</sup> Els valors del diàmetre de gota com a Z-average no es poden considerar fiables ja que l'índex de polidispersitat és superior a 0,250.

La incorporació de ketoprofèn en les formulacions comporta una disminució del diàmetre de les gotes de les nano-emulsions i de les nanopartícules en quasi tots els casos estudiats. Aquest comportament ja es va observar al capítol 4.1.5 de l'apartat de nano-emulsions on es va estudiar la solubilitat de ketoprofèn en diferents nano-emulsions seleccionades i es va atribuir a la disposició del fàrmac en la interfície de les gotes. Així, el fàrmac actuaria com a co-tensioactiu augmentant el radi de curvatura i estabilitzant les gotes de la fase dispersa (Podlogar, 2005). De fet, en les composicions corresponents a nano-emulsions la polidispersitat del sistema disminueix considerablement en incorporar el ketoprofèn. Únicament en les nano-emulsions preparades amb l'aminoàcid lisina s'ha observat un petit augment del diàmetre de gota quan es solubilitza el ketoprofèn. No obstant, cal destacar que els valors dels índex de polidispersitat en aquestes formulacions són superiors a 0,250 i les petites diferències en la mida podrien ser degudes a que les determinacions s'estan realitzant als límits de



detecció de l'equip de DLS. La naturalesa del component aquós (aigua o solució reguladora de fosfats) no ha suposat diferències importants en el diàmetre de gota de les nano-emulsions. Pel que fa a les nanopartícules, considerant la seva estructura polimèrica relativament rígida, la disminució del diàmetre es va atribuir a un efecte de la sonicació que actuaria disminuint el grau d'agregació.

La figura 4.92 correspon a nanopartícules de PU PEG a les quals se'ls ha incorporat mitjançant sonicació, una concentració de 0,92% en pes de ketoprofèn. La imatge es va obtenir per TEM.



**Figura 4.92:** Micrografia de TEM corresponent a nanopartícules de PU PEG (C: 0,02mmol/g d'IPDI i de PEG 400) amb 0,92% en pes de ketoprofèn.

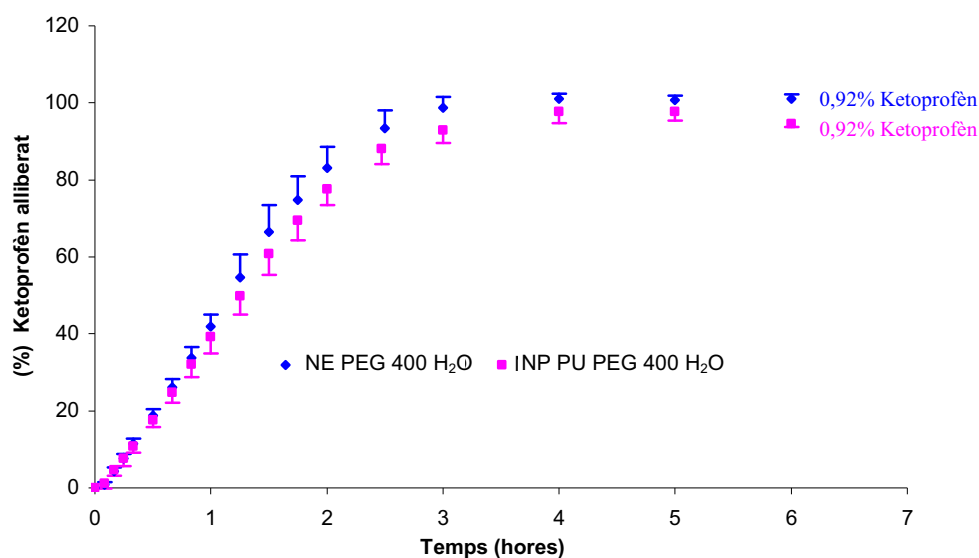
La incorporació del fàrmac una vegada preparades les nanopartícules ha suposat una disminució del diàmetre de partícula i un augment de la polidispersitat de la formulació corroborat pels estudis realitzats amb Dynamic Light Scattering. A la imatge obtinguda per TEM es poden observar partícules de diàmetres diferents, les més petites presenten una mida d'uns 20-30 nm i les més grans d'uns 60-70 nm mantenint-se no obstant, la morfologia arrodonida i isodiamètrica ja observada en les nanopartícules sense fàrmac.

Després de constatar que es podien incorporar concentracions elevades de ketoprofèn ( $\geq 1\%$ ) en nano-emulsions i nanopartícules preparades amb una elevada fracció en pes de component aquós (90%) aconseguint una eficiència d'encapsulació de l'ordre del 80-95%, es va procedir a estudiar la difusió del fàrmac des d'aquestes composicions cap a una solució receptora de PBS a pH 7,4. Per a dur a terme els estudis de cèl·lula es van

seleccionar les composicions amb PEG 400 ja que s'havien obtingut millors resultats en relació a l'eficiència d'encapsulació que en les formulacions amb l'aminoàcid lisina (veure taula XXXII).

Els assaigs d'alliberació del ketoprofèn s'han desenvolupat en composicions corresponents a nano-emulsions O/W i nanopartícules de PU PEG en les quals s'ha utilitzat aigua o PBS a pH 7,4 com a component aquós. En les formulacions amb aigua s'ha solubilitzat un 0,92% en pes de fàrmac i en les formulacions amb PBS un 1,23%. Amb aquestes concentracions de ketoprofèn solubilitzades es compleixen les condicions *sink* en la solució receptora (PBS a pH 7,4). Els assaigs s'han dut a terme a una temperatura de 37°C, realitzant extraccions de mostra durant 6 hores. Les condicions experimentals de l'estudi es descriuen amb més detall al capítol 3.3.9. Per a cadascun dels experiments s'han utilitzat 5 replicats i s'ha representat la mitja i la desviació estàndard del fàrmac alliberat en la solució receptora expressat en percentatge en funció del temps. Les composicions estudiades no han presentat alteracions en el seu aspecte visual ni separació en fases en les condicions en les que s'ha desenvolupat l'estudi de cèssió. En els assaigs en PBS (pH 7,4), després del procés de polimerització, el pH disminueix a 6,76 i posteriorment, quan es solubilitza l'1,23% de ketoprofèn, es redueix a 5,4 com a conseqüència del caràcter àcid del fàrmac. La quantificació dels resultats s'ha dut a terme per HPLC mitjançant un mètode prèviament validat.

A la figura 4.93 es troben representats els resultats de l'assaig de cèssió de les formulacions en aigua.



**Fig. 4.93:** Perfils d'alliberació del ketoprofèn determinant el percentatge de fàrmac alliberat en funció del temps, corresponents a la nano-emulsió i la suspensió de nanopartícules de PU PEG en les que s'ha utilitzat aigua com a fase externa.

D'acord amb els perfils de les corbes de cessió, en transcórrer 4 hores pràcticament tot el ketoprofèn ha difós a través de la membrana de cel·lulosa des de les composicions fins a la solució receptora. Tot i això, quan es comparen els perfils corresponents a la nano-emulsió i la suspensió de nanopartícules es pot observar que la difusió del ketoprofèn cap a al solució receptora és lleugerament més lenta en les nanopartícules de poliuretà (NP PU PEG H<sub>2</sub>O) que en la nano-emulsió corresponent (NE PEG 400 H<sub>2</sub>O); a les 2 hores s'ha alliberat un 75% del fàrmac incorporat en les nanopartícules mentre que el mateix percentatge d'alliberació s'aconsegueix quan han transcorregut 1,5 hores en el cas de la nano-emulsió. El fet que la diferència sigui tan petita podria ser degut a que el fàrmac no es troba totalment internalitzat en les partícules sinó que es troba adsorbit a la seva superfície com a conseqüència de la seva incorporació una vegada ja formada l'estructura polimèrica.

S'han aplicat els models de cessió d'ordre zero, primer ordre i Higuchi per a cadascun dels replicats. A la taula XXXIV es troben detallats els valors promigs de les constants cinètiques d'alliberació i dels coeficients de correlació al quadrat ( $r^2$ ) per a cada composició estudiada.

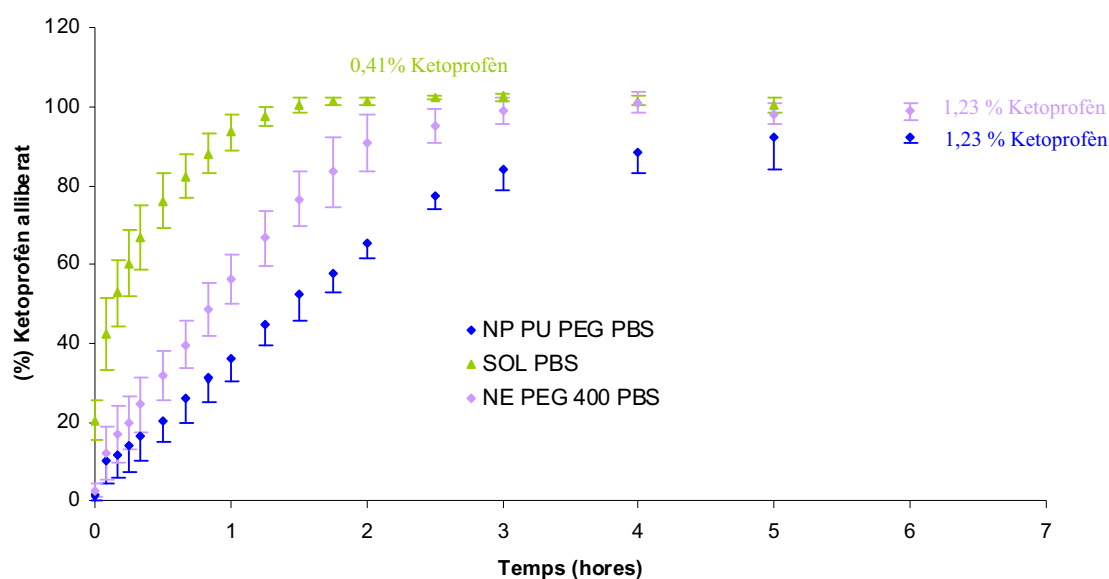
**Taula XXXIV: Aplicació de l'equació matemàtica de diferents models cinètics als perfils d'alliberació obtinguts per a la nano-emulsió i la suspensió de nanopartícules en aigua.**

Models de cessió		NE PEG 400	NP PU PEG
Ordre zero	$K_0$ (%·h <sup>-1</sup> )	44,305±2,486	41,600±3,198
	$r^2$	0,9991	0,9990
Primer ordre	$K_1$ (h <sup>-1</sup> )	2,617±0,839	1,238±0,737
	$r^2$	0,7948	0,8852
Higuchi	$K_H$ (%·h <sup>-1/2</sup> )	64,405±4,569	71,372±9,082
	$r^2$	0,9670	0,9787

Considerant els resultats de la taula XXXIV l'alliberació de ketoprofèn sembla complir una cinètica d'ordre zero en ambdues composicions estudiades amb un valor del residual al quadrat de 0,999. Si es compararen els valors de les constants cinètiques ( $K_0$ ) obtingudes per al procés de difusió del ketoprofèn en la nano-emulsió i la suspensió de nanopartícules, l'alliberació del ketoprofèn cap a la solució receptora és lleugerament més lenta des de les nanopartícules ( $K_0=41,60$ ) que des de la nano-emulsió ( $K_0=44,30$ ).

Els resultats es van analitzar mitjançant el test estadístic t-Student obtenint-se diferències estadísticament significatives entre ambdues composicions amb un valor de  $p < 0,05$ .

La figura 4.94 correspon als assaigs de les formulacions preparades amb PBS com a component aquós (NE PEG 400 PBS i NP PU PEG PBS). S'ha determinat també la cèssió de ketoprofèn des d'una solució de PBS a pH 7,4 (SOL PBS) que conté un 0,41% en pes de ketoprofèn. Aquest valor correspon a la concentració màxima de solubilització del fàrmac en la solució reguladora de fosfats.



**Fig.4.94:** Perfils d'alliberació del ketoprofèn en la solució receptora, corresponents a les composicions en les que s'ha utilitzat PBS a pH 7,4 com a fase externa.

D'acord amb els perfils d'alliberació observats, pràcticament la totalitat del ketoprofèn solubilitzat en cadascuna de les composicions estudiades ha difós cap a la solució receptora en finalitzar l'assaig exceptuant el cas de la formulació corresponent a nanopartícules de PU PEG. A diferència dels estudis en els que es va emprar aigua com a component aquós per a la preparació de les formulacions, en PBS, s'han observat diferències importants en la velocitat d'alliberació del ketoprofèn entre les composicions estudiades. Així, en el cas de la solució de PBS, en transcórrer un període de temps molt curt (1,5 h) ja s'ha alliberat el 100% de ketoprofèn mentre que per a aconseguir que difongui el 100% de fàrmac en el cas de la nano-emulsió han de transcórrer 3 hores. Cal destacar no obstant, que la concentració de ketoprofèn solubilitzada en la solució de PBS és força inferior a la concentració de fàrmac incorporada tant en les nanopartícules com en la nano-emulsió. El perfil d'alliberació

més lent correspon a les nanopartícules de PU PEG, alliberant-se a les 6 hores un 85% del fàrmac solubilitzat.

La taula XXXV correspon a l'aplicació dels models cinètics d'ordre zero, primer ordre i Higuchi. S'han detallat els valors de les constants cinètiques d'alliberació i del coeficient de correlació al quadrat.

**Taula XXXV:** Aplicació de l'equació matemàtica de diferents models cinètics als perfils d'alliberació del ketoprofèn obtinguts per a la nano-emulsió i la suspensió de nanopartícules preparades amb PBS pH 7,4.

Models de cessió		NE PEG 400	NP PU PEG PBS
Ordre zero	$K_0$ (%·h <sup>-1</sup> )	<b>43,842±4,145</b>	<b>30,743±2,336</b>
	$r^2$	<b>0,9981</b>	<b>0,9959</b>
Primer ordre	$K_1$ (h <sup>-1</sup> )	1,353±0,4680	1,156±0,373
	$r^2$	0,8999	0,8590
Higuchi	$K_H$ (%·h <sup>-1/2</sup> )	61,815±5,414	53,842±2,965
	$r^2$	0,9605	0,9602

Considerant els valors de r obtinguts per a cadascun dels models cinètics estudiats, el model que millor explicaria el comportament de les nanopartícules de PU PEG i la nano-emulsió amb PEG 400 és l'ordre zero. Els valors de les constants cinètiques ( $K_0$ ) per a la nano-emulsió amb PEG 400 i les nanopartícules de PU PEG indiquen que el ketoprofèn difon més ràpidament cap a la solució receptora des de les gotes de nano-emulsió ( $K_0=43,84$ ). Les diferències van ser estadísticament significatives amb un valor de  $p < 0,0001$  d'acord amb els resultats del test estadístic t-Student.

Quan es comparen les constants cinètiques d'ordre zero que defineixen els perfils d'alliberació del ketoprofèn obtinguts per a les dispersions preparades en aigua i en PBS no s'observen diferències estadísticament significatives en el cas de la nano-emulsió O/W. En canvi, entre les composicions corresponents a nanopartícules les diferències en la velocitat de difusió del fàrmac són estadísticament significatives amb una  $p < 0,0001$  (t-Student). El ketoprofèn s'alliberaria més lentament de les nanopartícules quan s'empra com a medi de suspensió PBS a pH 7,4. Quan les nanopartícules es troben en aigua, la difusió s'esdevé més ràpidament degut a les diferències de solubilitat entre l'aigua i el PBS present en el compartiment receptor (solubilitat del ketoprofèn en aigua < solubilitat en PBS).

#### **4.2.2.9. Resum de la preparació i caracterització de nanopartícules de poliuretà i poliurea obtingudes a partir de nano-emulsions O/W:**

- **Formació de nanopartícules de poliuretà:**

S'ha aconseguit la formació de nanopartícules de PU a partir de la reacció de polimerització entre l'IPDI i el tensioactiu sense necessitat d'addicionar components amb grups diol a la formulació.

Les nanopartícules amb Tween 80 presenten un diàmetre de partícula superior a les obtingudes amb Cremophor EL quan es mantenen les mateixes condicions de polimerització.

L'increment de la concentració d'IPDI suposa un augment del diàmetre de partícula per a relacions molars IPDI/Tensioactiu inferiors a 1 en el sistema amb Cremophor EL. A partir d'aquesta relació molar el diàmetre de partícula es manté constant. En el sistema amb Tween 80 no s'han pogut estudiar relacions molars superiors a 1. En aquest sistema s'ha observat un increment del diàmetre de partícula en augmentar la concentració d'IPDI per a totes les concentracions de monòmer estudiades.

En el sistema amb Cremophor EL la polidispersitat tendeix a disminuir en augmentar la concentració d'IPDI.

S'ha observat una disminució del diàmetre de partícula en augmentar la relació O/T per al sistema amb Cremophor EL.

- **Formació de nanopartícules de poliuretà amb PEG (PU PEG):**

Quan s'incorpora polietilenglicol a les composicions, tant el tensioactiu com el PEG 400 poden intervenir en el procés de polimerització. Les nanopartícules resultants podrien estar constituïdes d'unitats d'uretà que provenen de la reacció amb el tensioactiu i d'unitats d'uretà derivades de la reacció amb el PEG .

S'han obtingut novament nanopartícules més petites quan s'utilitza Cremophor EL com a tensioactiu. En el sistema amb Cremophor EL s'ha observat també que la mida de partícula es redueix en disminuir la concentració de tensioactiu com ja s'havia constatat per a les nanopartícules de PU.

En el sistema amb Tween 80 la incorporació del polietilenglicol suposa la formació de nanopartícules de mida més petita mentre que en el sistema amb Cremophor EL s'observa la tendència contrària (si hi ha PEG 400 es formen nanopartícules més grans). Pel que fa a les nano-emulsions inicials, no es van observar diferències entre la nano-emulsió preparada amb PEG i sense en el sistema amb Tween 80. En el sistema amb Cremophor EL les nano-emulsions que contenien PEG 400 eren d'una mida lleugerament superior.

### **Influència de la concentració d'IPDI/PEG 400**

En el **sistema amb Tween 80**, la incorporació de PEG 400 a les formulacions no afecta pràcticament al diàmetre de gota de les nano-emulsions inicials en comparació a la nano-emulsió preparada sense PEG 400. Tot i això, s'ha observat un petit increment de la mida de les gotes a mesura que augmenta la concentració de PEG 400.

En relació a la formació de nanopartícules de PU PEG amb Tween 80, l'augment de la concentració d'IPDI i de PEG 400 comporta un increment del diàmetre de partícula. Al seu torn la polidispersitat tendeix a disminuir.

És necessària una concentració mínima d'IPDI de 0,02 mmol/g per a evitar que quedin gotes de nano-emulsió sense polimeritzar.

La concentració òptima per a la preparació de nanopartícules de PU PEG amb Tween 80 com a tensioactiu ha sigut de 0,02 mmol/g. Per a aquesta concentració es va obtenir una mida de partícula de 72,11 nm i una polidispersitat de 0,121.

Les nanopartícules de PU PEG són de mida notablement inferior a les de PU.

Les nanopartícules de PU PEG obtingudes en el sistema amb Tween 80 són esfèriques, molt homogènies i amb una coberta polimèrica molt ben estructurada i definida.

En el **sistema amb Cremophor EL** no s'han observat diferències rellevants en la mida de partícula de les composicions en augmentar la concentració d'IPDI/PEG 400.

En relació a la polidispersitat es va observar que anava augmentant a mesura que incrementava la concentració d'IPDI i de PEG 400 fins mantenir-se constant, tendència que ja s'havia observat en la preparació de nanopartícules sense PEG 400 (PU).

Les nanopartícules de mida més gran (52,20) però amb una polidispersitat més baixa (0,142) van correspondre a la concentració d'IPDI i PEG 400 de 0,1 mmol/g.

En el sistema amb Cremophor EL, el diàmetre de partícula quan s'utilitza PEG 400, és superior al de les nanopartícules preparades sense biomaterial per a totes les concentracions estudiades.

Els estudis amb TEM van posar de manifest que les nanopartícules preparades amb Cremophor EL com a tensioactiu, a diferència de les nanopartícules que contenen Tween 80, eren poc homogènies, de forma irregular i amb un embolcall polimèric molt poc definit.

### **Influència del pes molecular del PEG**

El pes molecular del PEG influeix en la mida de les nanopartícules de PU PEG.

El diàmetre de les nanopartícules de PU PEG augmenta amb el pes molecular del PEG utilitzat, resultats que concorden amb els estudis de Bouchemal et al. (2004).

Independentment del pes molecular, l'augment de la concentració d'IPDI suposa un increment del diàmetre de partícula, com ja s'havia observat anteriorment.

### **Influència de la temperatura**

En augmentar la temperatura de polimerització, el diàmetre de les nanopartícules de PU PEG augmenta i la polidispersitat del sistema decreix.

És necessari aplicar una temperatura superior a 65°C per obtenir un sistema de baixa polidispersitat, ja que a temperatures inferiors coexisteixen les gotes de nano-emulsió i les nanopartícules.

Per a la temperatura de 70±2°C es va aconseguir la formació de les nanopartícules de PU PEG de menor diàmetre (75 nm) dins dels sistemes de baixa polidispersitat ( $P < 0,150$ ).

L'evolució del procés de polimerització s'ha pogut observar determinant el diàmetre de partícula amb el temps. Aquests estudis han posat de manifest que la reacció de polimerització transcorre més lentament com més baixa és la temperatura. Així, a 70°C la reacció de polimerització finalitza a les 3 hores mentre que a 82°C el procés acaba en el transcurs de 30 minuts produint-se un creixement molt ràpid del diàmetre de partícula en un període molt curt de temps.



**Influència de la concentració O/T**

La mida de les nanopartícules de PU PEG disminueix amb la relació O/T, obtenint-se les nanopartícules de mida més petita amb la relació en pes O/T: 15/85 (71,70 nm). En les nano-emulsions inicials es va observar l'efecte invers, gotes més grans com més elevada és la concentració d'oli i més baixa és la concentració de tensioactiu.

La disminució de la concentració del tensioactiu comporta un augment de la polidispersitat tant en les nano-emulsions com en les nanopartícules.

Per a la relació O/T: 10/90 es van obtenir les nanopartícules de menor diàmetre amb la mínima concentració de tensioactiu necessària per obtenir un sistema de baixa polidispersitat.

- **Formació de nanopartícules de poliurea amb lisina (PUR lys)**

S'ha aconseguit la formació de nanopartícules de baixa polidispersitat de poliurea emprant com a biomaterial la lisina en sistemes del tipus aigua/tensioactiu no iònic/component oliós.

Les nanopartícules de PUR lys preparades amb **Tween 80** com a tensioactiu són de mida superior a les obtingudes amb Cremophor EL.

En el sistema amb Tween 80, la utilització de la lys com a biomaterial suposa una reducció important del diàmetre de partícula en relació a les nanopartícules de PU PEG i de PU preparades a la mateixa concentració de monòmer i tensioactiu i a les mateixes condicions de polimerització.

La incorporació de la lys en les nano-emulsions es va reflexar amb una disminució del diàmetre de les gotes.

Tant el tensioactiu com la lisina intervenen en el procés de polimerització. L'embolcall polimèric podria estar constituït conjuntament d'unitats de poliuretà i poliurea.

L'augment de la polidispersitat en relació a les nanopartícules de PU suggeriria la presència simultània dels dos tipus de nanopartícules: PU i PUR lys.

En el sistema amb **Cremophor EL**, la disminució de la concentració de tensioactiu comporta una reducció del diàmetre de les nanopartícules de PUR lys. Les nanopartícules de mida més petita, 37 nm, s'obtenen per la relació O/T: 30/70.

La incorporació de la lys a les formulacions no suposa un increment del diàmetre de gota de les nano-emulsions prèvies.

El diàmetre de partícula obtingut quan s'utilitza lys com a biomaterial es correspon pràcticament amb el diàmetre de les nanopartícules preparades sense biomaterial. No obstant, els valors de la polidispersitat per les nanopartícules de PUR lys van ser més elevats.

Tenint en compte la polidispersitat, a la suspensió de nanopartícules podrien trobar-se nanopartícules de PUR lys i de PU conjuntament.

Els resultats obtinguts no evidencien la implicació real de la lisina en el procés de polimerització ja que no s'observa una modificació de la mida de partícula en relació a les nanopartícules de PU. Per aquest motiu es va desestimar el sistema amb Cremophor EL per la preparació de nanopartícules de PUR lys.

### **Influència de la concentració d'IPDI/lys**

El diàmetre de les nanopartícules de PUR lys preparades amb Tween 80 augmenta amb la concentració d'IPDI i de lys.

Les nanopartícules de PUR lys són de mida més petita que les nanopartícules de PU i de PU PEG preparades de la mateixa manera.

Les nanopartícules més petites (50 nm) i amb una polidispersitat  $< 0,150$  es van obtenir amb la concentració de 0,04 mmol/g d'IPDI i de 0,02 mmol/g de lys.

### **Influència de la temperatura**

El diàmetre de les nanopartícules de PUR lys augmenta amb la temperatura al mateix temps que la polidispersitat del sistema disminueix.

Es requereix una temperatura mínima de 66°C per a obtenir nanopartícules de baixa polidispersitat.

La temperatura amb la qual es van obtenir nanopartícules de PUR lys de mida més petita amb una polidispersitat adequada ( $< 0,150$ ) va ser de  $70 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Tot i contenir el doble de concentració d'IPDI, les nanopartícules de PUR lys presenten un diàmetre més petit que les nanopartícules de PU PEG.

### **Influència de la concentració O/T**

La mida de les nanopartícules de PUR lys disminueix en augmentar la relació O/T però la polidispersitat augmenta.

Les nanopartícules amb un diàmetre més petit (56,36 nm) es van obtenir amb la relació O/T: 15/85 i les de mida més gran (97,30 nm) van correspondre a la relació de 0/100.

Tenint en compte els índex de polidispersitat, la relació O/T d'elecció per a la preparació de nanopartícules de PUR lys amb Tween 80 seria la de 10/90 ja que s'obtenen les nanopartícules de menor diàmetre amb una polidispersitat  $<0,150$ .

La disminució del diàmetre de partícula sembla ser deguda a la participació del tensioactiu en el procés de polimerització.

En les nano-emulsions prèvies, la mida de les gotes i la polidispersitat augmenta en incrementar la concentració d'oli i disminuir el percentatge en pes de tensioactiu.

La incorporació de lisina suposa una disminució del diàmetre de gota i un augment de la polidispersitat en relació a les nano-emulsions preparades sense biomaterial.

- **Formació de nanopartícules de poliurea amb biotina (PUR biot) i estreptavidina (PUR strep):**

S'ha aconseguit la formació de nanopartícules de poliurea utilitzant **biotina** com a biomaterial.

La relació estequiomètrica entre l'IPDI i el biomaterial de 2:1 no ha sigut adequada per a la preparació d'aquestes nanopartícules ja que part de la nano-emulsió quedava sense polimeritzar.

Amb la relació estequiomètrica IPDI: biotina de 4:1 es va aconseguir la formació de nanopartícules de 100 nm de diàmetre amb una polidispersitat  $< 0,100$ .

Les nanopartícules de PUR biot són de mida superior a les nanopartícules de PUR lys malgrat haver-se preparat amb la meitat de concentració de monòmer.

Les nanopartícules de PUR biot tenen un diàmetre més gran que les nanopartícules de PU per a la mateixa concentració d'IPDI. La incorporació de biotina suposa doncs un increment de la mida de partícula.

S'han obtingut nanopartícules de poliurea emprant una proteïna com és l'**estreptavidina** com a biomaterial. El diàmetre de les nanopartícules de PUR strep ha sigut de 69,43 nm i la polidispersitat de 0,133.

Les nanopartícules obtingudes van presentar una mida més petita que les nanopartícules de PUR biot (100 nm) i aquelles preparades sense biomaterial (83 nm).

- **Estabilitat de les nanopartícules de poliuretà i poliurea:**

Les nanopartícules de PU PEG i PUR lys en suspensió aquosa van presentar una bona estabilitat cinètica malgrat observar-se un augment del diàmetre de partícula durant els primers dies. La polidispersitat de les composicions va disminuir amb el temps fins a valors  $<0,100$ .

Les nanopartícules més estables corresponen a la relació en pes O/T: 5/95 tant per a les nanopartícules de PU PEG com per a les de PUR lys ja que no es modifica el diàmetre de partícula amb el temps.

Les nanopartícules de PUR biot i PUR strep en suspensió aquosa també presenten una bona estabilitat cinètica, observant-se inicialment un increment del diàmetre de partícula associat a fenòmens d'agregació però posteriorment la mida de partícula s'estabilitza.

La ultracentrifugació és una tècnica adequada per a separar i concentrar les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep en suspensió aquosa ja que el diàmetre de partícula no es va veure modificat durant el procés i la reconstitució va ser relativament fàcil.

La liofilització ha resultat ser un mètode eficaç per a incrementar l'estabilitat de les nanopartícules de PU PEG i de PUR lys ja que s'evita l'aparició de fenòmens d'agregació mantenint-se el diàmetre de partícula inicial durant com a mínim un període de 2 anys. La reconstitució de les mostres va ser fàcil i ràpida.

- **Caracterització estructural de les nanopartícules:**

#### **Caracterització per FT-IR**

Els estudis de caracterització mitjançant FT-IR han posat de manifest la finalització de la reacció de polimerització per la desaparició de la banda d'absorció característica del grup diisocianat de l'IPDI i la formació de nous grups funcionals associats als poliuretans i les poliurees.

La formació de polímers de poliuretà i poliurea ha quedat palesa per l'aparició de noves bandes d'absorció a  $1639\text{ cm}^{-1}$  per al grup carbonil de les urees, a  $1740\text{ cm}^{-1}$  per al grup carbonil dels uretans i a  $2800\text{ cm}^{-1}$  per al grup amida.

### **Caracterització per TEM**

Les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep són homogènies en relació al diàmetre de partícula, de forma arrodonina, isodiàmtriques i amb un embolcall polimèric ben definit i estructurat d'acord amb les imatges obtingudes per TEM.

Els diàmetres calculats per TEM de cadascuna de les nanopartícules estudiades pràcticament es van correspondre amb els valors que s'havien determinat per Dynamic Light Scattering.

En la caracterització per TEM, les nanopartícules amb un diàmetre més petit (50nm) van ser les de PUR lys i les de PU PEG preparades amb PEG 200 i les que presentaven un diàmetre més gran van ser les de PUR biot (95 nm). Aquests resultats estan en concordança amb els estudis realitzats en altres apartats on es van caracteritzar les nanopartícules per DLS.

### **Caracterització per AFM**

La caracterització per AFM ha permès observar la morfologia esfèrica de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep. En tots els casos estudiats es va obtenir una relació diàmetre/alçada  $<3$ .

L'aplanament de les nanopartícules es va atribuir a la diferent rigidesa de l'embolcall polimèric relacionada amb la proporció de segments rígids i flexibles en el polímer de PU o PUR.

Les anàlisis per contrast de fases han posat de manifest l'existència d'una població única de nanopartícules en la suspensió aquosa. L'embolcall polimèric d'aquestes nanopartícules es trobaria constituït conjuntament per unitats d'uretà fruit de la reacció entre l'IPDI i el Tween 80 i unitats d'uretà o urea que són conseqüència de la reacció de l'IPDI amb el PEG 400 o el biomaterial (lys, biot o strep).

El diàmetre de les nanopartícules estudiades determinat per AFM, exceptuant el cas de les nanopartícules de PUR lys, és superior al diàmetre obtingut per DLS. Malgrat aquesta diferència, s'ha mantingut l'ordre en relació a la mida de partícula. Així les nanopartícules amb un diàmetre més petit van ser les de PUR lys i les de mida més gran les de PUR biot. Les nanopartícules de PU PEG i PUR strep van presentar diàmetres de partícula similars.

S'ha observat per AFM la formació d'agregats constituïts per nanopartícules recobertes o immerses en diferents capes de tensioactiu i la presència de monocapes de Tween 80 amb un diàmetre comprès entre 2 i 20 nm en les diferents composicions.

### **Caracterització per Microscòpia confocal**

Els estudis de caracterització per microscòpia confocal de les nanopartícules de PUR biot han posat de manifest que la formació de nanopartícules de PUR biot no compromet el lloc d'unió entre la biotina i l'estreptavidina.

#### **• Incorporació i alliberació de ketoprofèn en les nanopartícules:**

La incorporació de ketoprofèn en les formulacions amb PEG 400 i lys implica una disminució del diàmetre de partícula tant en les nano-emulsions com en les nanopartícules.

La concentració màxima de ketoprofèn solubilitzat en nano-emulsions i nanopartícules s'incrementa quan s'utilitza PBS a pH 7,4 com a component aquós. Per a les nano-emulsions la capacitat de solubilització també augmenta quan s'incorpora l'aminoàcid lisina.

Es va aconseguir solubilitzar un màxim de l'1,1% en pes de ketoprofèn en nanopartícules i nano-emulsions preparades amb aigua i amb PEG 400. En formulacions preparades amb PBS, es va solubilitzar un 1,5% en pes de ketoprofèn.

En les composicions amb lys com a biomaterial, s'ha aconseguit solubilitzar una concentració superior de ketoprofèn en nano-emulsions que en nanopartícules, essent de l'1,41% i de l'1,73% en pes, en aigua i PBS respectivament. En les nanopartícules de PUR lys es va solubilitzar un 1,02% en pes en les composicions amb aigua i un 1,48% en aquelles constituïdes amb PBS.

No s'han observat diferències en la concentració màxima de ketoprofèn solubilitzada entre les nanopartícules de PUR lys i les de PU PEG però sí entre les nano-emulsions, aconseguint incorporar concentracions superiors de fàrmac en les nano-emulsions amb lys com a biomaterial.

Es va aconseguir encapsular un 95% de ketoprofèn en NP de PU PEG preparades amb aigua. L'eficiència d'encapsulació és més baixa per a les nanopartícules de PUR lys que per les de PU PEG quan s'empra com a component aquós l'aigua, aconseguint un màxim del 88,57% de fàrmac incorporat. L'eficiència d'encapsulació, per a totes les

composicions estudiades, disminueix quan es selecciona com a component aquós el PBS.

El ketoprofèn és capaç d'alliberar-se tant de les nano-emulsions O/W com de les nanopartícules de PU PEG.

S'ha observat un retard a l'alliberació del fàrmac des de les nano-emulsions i nanopartícules respecte a la solució de PBS.

El procés de difusió del ketoprofèn des de les composicions cap a la solució receptora és més lent per a les nanopartícules de PU PEG que per a les nano-emulsions tant en aigua com en PBS.

La utilització de PBS com a medi de suspensió de les nanopartícules comporta un retard de l'alliberació del fàrmac cap a la solució receptora.

El model cinètic que millor s'ajusta a l'alliberació del ketoprofèn des de les nanopartícules de PU PEG i la nano-emulsió amb PEG 400 correspon a un ordre zero.

## **5. CONCLUSIONS**

---



## 5. CONCLUSIONS

- Mitjançant estudis de comportament fàsic s'han identificat regions on es formen nano-emulsions O/W amb una elevada concentració d'aigua (90% i 95% en pes) i components utilitzats per a la preparació de nanopartícules en sistemes ternaris del tipus aigua/ tensioactiu no iònic/component oliós i sistemes pseudoternaris constituïts per aigua/ tensioactiu/ co-tensioactiu/ component oliós. Aquestes nano-emulsions O/W presenten una mida de gota compresa entre 13 i 42 nm, una elevada estabilitat cinètica i una baixa polidispersitat que les fa apropiades per a ser utilitzades com a sistemes d'alliberació controlada de fàrmacs i com a medi de polimerització per l'elaboració de nanopartícules polimèriques.
- Les composicions preparades amb Tween 80 presenten una mida de gota més petita que aquelles que contenen Cremophor EL. La presència del co-tensioactiu Lutrol F68 en les composicions actua incrementant notablement el diàmetre de les gotes de les nano-emulsions degut a la disposició que adopta aquest tensioactiu polimèric en la interfície oli/aigua.
- El diàmetre de gota augmenta amb la concentració oli/tensioactiu atribuït a la formació d'un menor nombre de gotes i de mida més gran. La polidispersitat del sistema tendeix a incrementar-se amb la relació oli/tensioactiu en els sistemes sense co-tensioactiu polimèric.
- S'ha aconseguit incrementar notablement la solubilitat del ketoprofèn en nano-emulsions amb una elevada concentració d'aigua. Les concentracions màximes de ketoprofèn solubilitzades en aquestes composicions es troben compreses entre 1,22% i 1,67% en pes. S'han solubilitzat concentracions de fàrmac superiors en les composicions en les quals s'ha emprat Cremophor EL com a tensioactiu no iònic.
- El diàmetre de gota de les nano-emulsions disminueix en incorporar el principi actiu suggerint que el ketoprofèn es situa a la interfície de les gotes enlloc d'estar solubilitzat al seu interior i per tant, actuaria augmentant el radi de curvatura.

Aquesta localització preferent a la interfície de les gotes de la fase interna es manifesta amb un augment considerable de l'estabilitat del sistema.

- La determinació de la pèrdua transepidèrmica d'aigua i de la cromaticitat després d'aplicar les nano-emulsions sobre la pell han permès constatar que les composicions no comporten una alteració de l'estructura de la capa còrnia de la pell ni provoquen l'aparició d'eritema malgrat les concentracions de tensioactiu emprades. Per tant, són adequades per a ser administrades per via tòpica ja que preserven la funció barrera de la pell i són ben tolerades.
- Els estudis de permeació cutània *ex vivo* han posat de manifest la funció dels tensioactius Tween 80 i Lutrol F68 com a possibles agents potenciadors de la permeació de ketoprofèn, ja que s'han obtingut quantitats de fàrmac acumulades i velocitats de permeació més elevades en les composicions que els contenen. Per a la composició amb Tween 80 i Lutrol F127, tant la quantitat de ketoprofen permat com el flux de permeació són similars als resultats obtinguts amb un gel comercialitzat que conté etanol com a agent potenciador de la permeació i presenta una major concentració de principi actiu incorporat.
- Els estudis de cessió del fàrmac han posat de manifest que el ketoprofèn és capaç d'alliberar-se de les nano-emulsions seguint una cinètica d'ordre zero.
- S'ha aconseguit la formació de nano-emulsions O/W, a les quals se'ls ha incorporat polietilenglicol (PEG), lisina (lys), biotina (biot) o estreptavidina (strep) adequades per a l'obtenció de nanopartícules de poliuretà i poliurea. Únicament, s'ha observat una disminució significativa de la mida de les gotes en les composicions que contenen lisina com a biomaterial (sistema amb Tween 80).
- S'han obtingut nanopartícules de poliuretà (PU), poliuretà amb polietilenglicol (PU PEG), poliurea amb lisina (PUR lys), poliurea amb biotina (PUR biot) i poliurea amb estreptavidina (PUR strep) amb un diàmetre de partícula  $\leq 100$  nm i una baixa polidispersitat a partir de nano-emulsions de fase externa aquosa en sistemes aigua/ tensioactiu no iònic/component oliós. Aquestes partícules es formen quan les composicions es sotmeten a temperatures  $>55^{\circ}\text{C}$  a partir de la reacció de polimerització que es produeix entre el diisocianat d'isoforona (IPDI)

solubilitzat a les gotes d'oli de la nano-emulsió i un component amb grups hidroxil (tensioactiu, PEG 400) o amino (lys, biot o strep) que es trobaria localitzat a la interfície de les gotes.

- Els factors que influeixen en el procés de polimerització han estat: tipus i concentració de tensioactiu; presència, tipus i concentració de biomaterial (PEG, lys, biotina, estreptavidina); concentració de monòmer (IPDI) i temperatura de polimerització.
- Els grups hidroxil presents en el tensioactiu són capaços de reaccionar amb el diisocianat i formar nanopartícules de poliuretà (PU) sense necessitat d'addicionar components amb grups OH o amina a la formulació. Per a aquestes partícules un augment de la concentració d'IPDI suposa un increment del diàmetre de partícula en composicions amb Tween 80. En mescles amb Cremophor EL el diàmetre de gota s'estabilitza quan s'assoleix una relació molar IPDI/Cremophor EL >1 independentment de l'increment de la concentració de monòmer.
- La concentració O/T òptima per a la formació de nanopartícules de PU PEG i PUR lys és de de 10/90, ja que per a aquesta relació en pes s'aconsegueix la formació de nanopartícules de menor diàmetre amb la mínima concentració de tensioactiu necessària per a obtenir un sistema de baixa polidispersitat.
- Les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep en suspensió aquosa presenten una elevada estabilitat cinètica. La liofilització és un mètode eficaç per a incrementar l'estabilitat de les nanopartícules de PU PEG i PUR.
- Els estudis de caracterització mitjançant FT-IR han posat de manifest la finalització de la reacció de polimerització per la desaparició de la banda d'absorció característica del grup diisocianat de l'IPDI i la formació de nous grups funcionals associats als poliuretans i les poliurees. La formació de polímers de poliuretà i poliurea ha quedat palesa per l'aparició de noves bandes d'absorció a  $1639\text{ cm}^{-1}$  per al grup carbonil de les urees, a  $1740\text{ cm}^{-1}$  per al grup carbonil dels uretans i a  $2800\text{ cm}^{-1}$  per al grup amida.

- La caracterització mitjançant AFM ha permès constatar la morfologia esfèrica de les nanopartícules de PU PEG, PUR lys, PUR biot i PUR strep. Les anàlisis per contrast de fases han posat de manifest que cadascun dels sistemes de nanopartícules està constituït per una única població de partícules estructuralment idèntiques. En els estudis realitzats mitjançant microscòpia confocal s'ha observat que la formació de nanopartícules de PUR biot no compromet el lloc d'unió entre la biotina i l'estreptavidina.
- S'han aconseguit incorporar concentracions elevades de ketoprofèn, compreses entre l'1% i l'1,5% en pes, en nanopartícules de PU PEG i PUR lys en suspensió aquosa amb una eficiència d'encapsulació  $\geq 80$  %. El ketoprofèn adsorbit a les nanopartícules és capaç d'alliberar-se, observant-se un retard de l'alliberació del fàrmac des de les nanopartícules en relació a la nano-emulsió i a una solució de PBS a pH 7,4. El perfil d'alliberació obtingut per a les nanopartícules es correspon amb un model cinètic d'ordre zero.

## **6. BIBLIOGRAFIA**

---

## 6. BIBLIOGRAFIA

### A

- Abhijit A.D., Nagarsenker M.S. Parenteral microemulsions: An overview. *International Journal of Pharmaceutics* 355, 19-30, 2008.
- Abismaïl B., Canselier J.P., Wilhelm A.M., Delmas H., Gourdon G. Emulsification by ultrasound: drop size distribution and stability. *Ultrasonics Sonochemistry* 6, 75-83, 1999.
- Aboubakar M., Puisieux F., Couvreur P., Deyme M., Vauthier C. Study of the mechanism of insulin encapsulation in poly(isobutylcyanoacrylate) nanocapsules obtained by interfacial polymerization. *Journal of Biomedical Materials Research* 47, 568-576, 1999.
- Albery W.J., Guy R.H. Percutaneous absorption: transport in the dermis. *International Journal of Pharmaceutics* 15, 125-148, 1983.
- Al Khouri Fallouh N., Roblot-Treupel L., Fessi H., Devissaguet J. Ph., Puisieux F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 28, 125-132, 1986.
- Alexandridis P., Hatton T.A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modelling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 96, 1-46, 1995.
- Alipa, Europena Aliphatic Isocyanate Producers Association. Properties, Hazards and safety Information for IPDI, 2005.
- Alléman, E.; Doelker, E.; Gurny, R. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process, influence of process parameters on particle size. *International Journal of Pharmaceutics* 87, 247-253, 1992.
- Alves-Pereira M., Furtado-Mosqueira V.C., Carneiro-Vilela J.M., Spangler-Andrade M, Andrade-Ramaldes G., Nascimento-Cardoso V. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with <sup>99m</sup>Tc Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33, 42-51, 2008.

- Amselsem Sh., Friedman D. Submicron emulsions as drug carriers for topical administration. In Benita S. ed. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Harwood Academia Publishers, London, pp.153-173, 1998.
  
- Anton N., Gayet P., Benoit J.P., Saulnier P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: An investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion. *International Journal of Pharmaceutics* 344, 44-52, 2007.
  
- Anton N, Benoit J.P, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release* 128, 185-199, 2008.
  
- Anton N., Saulnier P, Gaillard C., Porcher E, Vrignaud S, Benoit J.P. Aqueous-Core Lipid Nanocapsules for Encapsulating Fragile Hydrophilic and/or Lipophilic Molecules. *Langmuir* 25 (9), 11413-11419, 2009.
  
- Antonietti M, Landfester K. Polyreactions in miniemulsions. *Progress in Polymer Science* 27, 689-757, 2002.
  
- Arias J.L, Ruiz A., López-Viota M., Delgado A.V. Poly(alkylcyanoacrylate) colloidal particles as vehicles for antitumour drug delivery: A comparative study. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 62 (1), 64-70, 2008.
  
- Aronson J.K. Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions, 15th ed., pag. 1016, 2006.
  
- Ashford M. Bioavailability - physicochemical and dosage form factors. In Aulton M.E. ed. *The Science of Dosage Form Design*, pp 234-256, Churchill Livingstone, 2004.
  
- Ashida K. *Polyurethane and related foams: Chemistry and Technology*. CRC Press, Taylor & Francis group. Boca Raton, 2007.
  
- Asua J.M. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science* 27 (7), 1238-1346, 2002.
  
- Avgoustakis K. Pegylated poly(lactide) and poly(lactide-coglycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current Drug Delivery* 1(4), 321-333, 2004.

**B**

- Bachelder E.M., Beaudette T.T., Broaders K.E., Paramonov S.E., Dashe J., Fréchet J.M.J. Acid-Degradable Polyurethane Particles for Protein-Based Vaccines: Biological Evaluation and in Vitro Analysis of Particle Degradation Products. *Molecular Pharmaceutics* 5, 876-884, 2008.
- Badawi A.A., El-Laithy H.M., El Qidra R.K., El Mofty H., El dally M. Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery. *Archives of Pharmacal Research* 31, 1040-1049, 2008.
- Bali V., Ali M., Ali J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe. *Colloids and Surface: Biointerfaces* 76 (2), 410-420, 2010.
- Bannister L.H., Berry M.M., Collins P. Dyson M., Dussek J.E., Fergusson M.W.J, eds. *Anatomía de Gray* 38<sup>a</sup>. Edición, Vol.1. Ediciones Harcourt, Madrid pp 376- 400, 2001.
- Barichello J.M., Morishita M., Takayama K., Nagai T.. Encapsulation of hydrophilic and lipophilic drugs in PLGA nanoparticles by the nanoprecipitation method. *Drug Development Industrial Pharmacy* 25, 471-476,1999.
- Barrère M., Landfester K. High molecular weight polyurethane and polymer hybrid particles in aqueous miniemulsion. *Macromolecules* 36, 5119-5125, 2003.
- BASFa. Butlletí tècnic del Cremophor<sup>®</sup> EL, 2008.
- BASFb. Butlletí tècnic del Lutrol<sup>®</sup> F68, 2008.
- BASFc. Butlletí tècnic del Lutrol<sup>®</sup> F127, 2008
- BASFd. Butlletí tècnic del Cremophor WO7<sup>®</sup>, 2010.
- Bazile D., Prud'homme C., Bassoullet M., Marlard M., Spenlehauer G., Veillard M. Stealth Me PEG-PLA nanoparticles avoid uptake by the mononuclear phagocyte system. *Journal of Pharmaceutical Science* 84, 493-498, 1995.
- Behan N., Birkinshaw C., Clarke N., Poly *n*-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation. *Biomaterials* 22, 1353-1344, 2001.



- Bendfelt E., Serup J., Menné T. Effect of barrier perturbation on cutaneous salicylic acid penetration in human skin: *in vivo* pharmacokinetics using microdialysis and non-invasive quantification of barrier function. *British Journal of Dermatology* 140, 739-748, 1999.
- Benita S., Levy M.J. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82, 1069-1071, 1993.
- Berne B., Pecora R. Light Scattering and fluctuations. In Wiley and sons ed. *Dynamic Light Scattering with applications to Chemistry, Biology and Physics*, New York, 1-10, 2000.
- Bhalla H.L., Menon M.R., Gopal N.G.S. Radiation Sterilization of Polyethylene glycols. *International Journal of Pharmaceutics* 351-355, 1983.
- Bielinska A.U., Janczak K.W., Landers J.L., Makidon P., Sower L.E., Peterson J.W., Baker Jr JR. Mucosal immunization with a novel nanoemulsion-based recombinant anthrax protective antigen vaccine protects against *Bacillus anthracis* spore challenge. *Infection and Immunity* 75, 4020-4029, 2007.
- Bil M., Ryszkowska J., Wozniak P., Kurzydłowski K.J., Lewandowska-Szumiel M. Optimization of the structure of polyurethanes for bone tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, *in press*, 2009.
- Binks B.P. Emulsions: Recent Advances in Understanding. In Binks B.P ed. *Moderns Aspects of Emulsion Science*, The Royal Society of Chemistry, pp 1- 48, Cambridge, 1998.
- Bodmeier R., Maincent P. Polymeric Dispersions as Drug Carriers. In Lieberman H.A, Rieger M., Banker G.S. eds. *Pharmaceutical dosage forms: disperse systems*, v 3, 2<sup>o</sup>ed. Marcel Dekker, New York, pp 87-128, 1998.
- Bouchemal K, Briançon S., Perrier E., Fessi H., Bonnet I., zydowick N. Synthesis and characterization of polyurethane and poly (ether urethane) nanocapsules using a new technique of interfacial polycondensation combined to spontaneous emulsification. *International Journal of Pharmaceutics* 269, 89-100, 2004.
- Bouchemal K., Briançon S., Fessi H., Chevalier Y., Bonnet I., Perrier E. Simultaneous emulsification and interfacial polycondensation for the preparation of colloidal suspensions of nanocapsules. *Materials Science and Engineering C* 26, 472-480, 2006.

- 
- Boudad H., Legrand P., Lebas G., Cheron M., Duchêne D., Ponchel G.G. combined hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and pol(alkylcyanoacrylate)nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *International Journal of Pharmaceutics* 218, 113-124, 2001.
  - Bourrel M., Schechter R.S. *Microemulsions and related systems*. Surfactant Science Series v 30. Marcel Dekker, New York, 1988.
  - Box G.E., Hunter J.S, Hunter W.O. *Estadística para investigadores* 2ªed. Ed Reverté S.A., Barcelona, 2008.
  - British Pharmacopeia, 2010.
  - Buszello K., Müller B.W. Emulsions as Drug Delivery Systems. In Nielloud F., Marti-Mestres G. eds. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. Drugs and the Pharmaceutical Sciences v 105. Marcel Dekker, New York, pp 191-228, 2000.

## C

- Calvo P, Remuñan-López, vila-Jato J.L., Alonso M.J. Development of positively charged colloidal drug carriers: chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid and Polymer Science* 275, 46-53, 1997.
- Candau F. Polymerization in microemulsions. In P. Kumar, K.L Mittal eds. *Handbook of Microemulsion Science and Technology*. Marcel Dekker Inc, New York, pp 679-712, 1999.
- Cappel M.J., Kreuter J. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery: I. Polysorbates. *International Journal of Pharmaceutics* 143-153, 1991.
- Cappel M.J., Kreuter J. Effect of nonionic surfactants on transdermal drug delivery : II. Poloxamer and poloxamine surfactants. *International Journal of Pharmaceutics* 69, 155-167, 1991.
- Carmignani C., Rossi S., Saettone M.F. , Burgalassi S. Ophthalmic Vehicles Containing Polymer-Solubilized Tropicamide “In Vitro/In Vivo”. *Evaluation Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28 (1), 101-105, 2002.
- Catálogo de Medicamentos, Colección Consejo Plus, Consejo General de Colegios de Farmacéuticos, Madrid, 2009.

- Chambin O., Bevenan B., Teillaud E. Pig skin as an animal model for in-vitro percutaneous absorption studies: Prediction of Percutaneous Penetration 38, 111-116, 1993.
- Chandra R., Rustgi R. Biodegradable polymers. Progress in Polymer Science 23, 1273-1335, 1998.
- Chauvierre C., Labarre D., Couvreur P., Vauthier C.; A radical emulsion polymerization of alkylcyanoacrylate initiated by the redox system dextran-cerium IV in acidic aqueous conditions. Macromolecules 36, 6018-6027, 2003.
- Cho Y.J., Choi H.K. Enhancement of percutaneous absorption of ketoprofen: effect of vehicles and adhesive matrix. International Journal of Pharmaceutics 169, 95-104, 1998.
- Clarke C.W, Aldons P.M. Isophorone diisocyanate induced respiratory disease (IPDI). Australian and New Zealand Journal of medicine 11 (3), 290-292, 1981.
- Constantinides P.P., Tustian A., Kessler D. Tocol emulsions for drug solubilisation and parenteral delivery. Advanced Drug Delivery Reviews 56, 1243-1255, 2004.
- Constantinides P.P, Han J., Davis S.S., Advances in the Use of Tocols as Drug Delivery Vehicles. Expert Review. Pharmaceutical Research 23 (2), 243-255, 2006.
- Constantinides P.P, Chaubal M.V., Shorr R. Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. Advanced Drug Delivery Reviews 60, 757-767, 2008.
- Couvreur P., Kante B., Roland M., Cuiot P., Bauduin P, Speiser P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers : preparation, morphological and sorptive properties. Journal of Pharmacy and Pharmacology 31 (5), 331-332, 1979.
- Couvreur P., Vauthier C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. Journal of Controlled Release, 17, 187-198, 1991.
- Crespy D., Stark M., Hoffmann- Richter C., Ziener U., Landfester K. Polymeric nanoreactors for hydrophilic reagents synthesized by interfacial polycondensation on miniemulsion droplets. Macromolecules 40, 3122-3135, 2007.
- Curdy C., Naik A., Kalia Y. N., Alberti I., Guy R. H. Non-invasive assessment of the effect of formulation excipients on stratum corneum barrier function in vivo. International Journal of Pharmaceutics 271, 251-256, 2004.

## D

- Da Silva G R., Ayres E., Orefice R.L., Moura S.A.L., Cara D.C., Cunha Jr A..S. Controlled release dexamethasone acetate from biodegradable and biocompatible polyurethane and polyurethane nanocomposite. *Journal of Drug Targeting* 17 (5), 374-383, 2009.
- de la Fuente M., Raviña M., Paolicelli P., Sanchez A, Seijo B., Alonso M.J. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 100-117, 2010.
- De Jahere F., Doelker E., Gurny R. Nanoparticles. In Mathiowith E.ed. *Encyclopedia of Controlled Drug Delivery volume 2*. John Wiley and Sons New York, pp 641-662, 1999.
- Delgado- Charro B., Iglesias- Vila G., Blanco- Méndez J., López-Quintela A., Marty J.P., Guy R.H. Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion system. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 43, 37,-42, 1997.
- Deminiere B., Colin A., Leal-Calderon F., Bibette J. Lifetime and destruction of concentrated emulsions undergoing coalescence. In ( Binks, B.P., eds.), *Modern Aspects of Emulsion Science*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 261-291, 1998.
- Díaz Marcos J. Aplicacions amb tècniques SPM a la unitat de tècniques nanomètriques. Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona.
- Dierling A.M., Cui Zh. Targeting primaquine into liver using chyclomicron emulsions for potential vivax nmalaria therapy. *International Journal of Pharmaceutics* 303, 143-152, 2005.
- Douglas S.J., Illum L., Davis S.S., Kreuter J. Particle size and size distribution of poly (butyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 101, 149-157, 1984.
- Durand A., Marie E. Macromolecular surfactants for miniemulsion polymerization. *Advances in Colloid and Interface Science* 150, 90-105, 2009.
- Durrieu V., Gandini A., Naceur Belgacem M., BlayoA, Eiselé G., Putaux J.L. Preparation of aqueous anionic poly-(urethane-urea) dispersions: Influence of the nature and proportion of the urethane groups on the dispersion and polymer properties. *Journal of Applied Polymer Science* 94, 700-710, 2004.

- Dwyer C., Viebke Ch., Meadows J., Propofol induced micelle formation in aqueous block copolymer solutions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 254, 23-30, 2005.

### E

- El-Aasser M.S., Miller C.M. Preparation of latexes using miniemulsions droplets. In: Asua J.M.(Eds). *Polymeric dispersions: Principles and applications*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 109-126, 1997.

- El Aasser M.S. Lack C.D. Choi, Y.T., Min t.I., Vanderhoff, J.W, Fowkes, F.M. Interfacial aspects of miniemulsions and miniemulsion polymers. *Colloids and Surfaces* 12, 79-97, 1984.

- Elias P.M. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *Journal of Controlled Release* 15 (3), 199-208, 1991.

- Engels F.K., Mathot R.A.A., Verweij J. Alternative drug formulations of docetaxel: a review. *Anti-Cancer Drugs* 18, 95-103, 2007.

### F

- Fang J.Y., Leu Y.L., Wang Y.Y., Tsai Y.H. In vitro topical application and in vivo pharmacodynamic evaluation of nonivamide hydrogels using Wistar rat as an animal model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 15, 417-423, 2002.

- Fang J.Y., Hwang T.L., Fang C.L, Chiu H.C. In vitro and in vivo evaluations of the efficacy and safety of skin permeation enhancers using flurbiprofen as a model drug. *International Journal of Pharmaceutics* 255, 153-166, 2003.

- Fattal E., Vauthier C. Drug Delivery: Nanoparticles. In: Swarbrick J. (ed.) *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 3<sup>rd</sup> ed*. Informa Healthcare, New York, pp 1183-1199, 2007.

- Fessi H., Devissaguet J.P., Puisieux, F. Procédé De Préparation De Systèmes Colloïdaux Dispersables D'une Substance Sous Forme De Nanoparticules. French Patent 2.608.988, 1986.

- Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J.P., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. *International Journal of Pharmaceutics* 55, R1-R4, 1989.

- 
- Finsy R. Particle Sizing by Quasi\_Elastic Light Scattering. *Advances in Colloid and Interface Science* 52, 79-143, 1994.
  
  - Fontana G., Pitarresi G., Tomarchio V., Carlisi B., San Biagio P.L. Preparation, characterization and in vitro antimicrobial activity of ampicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 19, 1009-1017, 1997.
  
  - Fontana, G., Licciardi M., Mansueto S., Schillaci D., Giammona G. Amoxicillin-loaded polyethylcyanoacrylate nanoparticles: Influence of PEG coating on the particle size, drug release rate and phagocytic uptake. *Biomaterials* 22, 2857-2865, 2001.
  
  - Forgiarini A., Esquena J., González C., Solans C. Formation of nano-emulsions by low energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir* 17, 2076-2083, 2001.
  
  - Förster T., Rybinski V., Wadle A. Influence of microemulsion phases on the preparation of fine-disperse emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 58, 119-149, 1995.
  
  - Freitag S., Trong I.L, Klumb L.A.Chu V., Chilkoti A., Stayton P.S., Stenkamp R.E. X-ray crystallographic studies of streptavidin mutants binding to biotin. *Biomolecular Engineering* 16, 13-19, 1999.
  
  - Frère Y., Danicher L., Gramain P., Preparation of polyurethane microcapsules by interfacial polycondensation. *European Polymer Journal* 34, 193-199, 1998.
  
  - Fresta M., Cavallarot G., Giammonat G., Wehrli E.; Puglisi G. Preparation and characterization of poly-ethyl-2-cyanoacrylate nanocapsules containing antiepileptic drugs. *Biomaterials* 17, 751-758, 1996.
  
  - Friberg S.E., Buraczewska I. Microemulsions in water-potassium oleate-benzene system. *Progress in Colloids and Polymer Science* 63, 1-9, 1978.
  
  - Friedman D.I., Schwarz J.S., Weisspapir M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and non-steroidal antiinflammatory drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84 (3), 324-329,1995.
  
  - Friend D.R. In vitro skin permeation techniques. *Journal of Controlled Release* 18 (3) 235-248, 1992.

- Fritzen-Garcia M.B., Zanetti-Ramos B.G., Schweitzer de Oliveira C., Soldi V., Pasa A.A., Creczynski-Pasa T.B. Atomic force microscopy imaging of polyurethane nanoparticles onto different solid substrates. *Materials Science and Engineering C* 29, 405-409, 2009.

### G

- Gallardo M., Couarraze G, Denizot B., Treupel L., Couvreur P., Puisieux F. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics* 100, 55-64, 1993.

- Gasco M.R, Trotta M. Nanoparticles from microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 29, 267-268, 1986.

- Gaudin F., Sintes- Zydowicz N. Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerisation in miniemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 331, 133-142, 2008.

- Gelderblom H., Verweij, J., Nooter K., Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *European Journal of Cancer* 37, 1590-1598, 2001.

- Gennes P.G. Polymers at an interface: a simplified view. *Advances in Colloid and Interface Science* 27, 189-209, 1987.

- Godin B., Touitou E. Transdermal skin delivery: Predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Advanced Drug delivery Reviews* 59, 1152-1161, 2007.

- González Ferreiro M., Tillman L., Hardee G., Bodmeier R.. Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *International Journal of Pharmaceutics* 239(1-2), 47-59, 2002.

- Goodwin D.A., Mearns C.F. Advances in pretargeting biotechnology. *Biotechnology Advances* 19, 435-450, 2001.

- Goto S., Uchida T., Lee Ch.K., Yasukate T, Zhang J.B. Effect of various vehicles on ketoprofen permeation across excised hairless mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 82 (9), 959-963, 1993.

- 
- Grad S., Kupcsik L., Gorna K., Gogolewski S, Alini M. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials* 24, 5163,5171, 2003.
  
  - Graf A., Ablinger E., Peters S., Zimmer A., Hook S., Rades T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. *International Journal of Pharmaceutics* 350, 351-360, 2008.
  
  - Graf A., Jack k.S., Whittaker A.K., Hook S.M., Rades T. Protein delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 33, 434-444, 2008.
  
  - Graf A., Rades T. Hook S.M. Oral insulin delivery using nanoparticles based on microemulsions with different structure-types: Optimisation and in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 37, 53-61, 2009.
  
  - Gray G.M., Yardley H.J. Lipid compositions of cells isolated from pig, human and rat epidermal. *Journal of Lipid Research* 16, 434-440, 1975.
  
  - Gref, R., Minamitake Y, Peracchia M.T., Trubetskoy V., Torchilin V., Langer R. Biodegradable long-circulating nanospheres. *Science* 263, 1600-1603, 1994.
  
  - Gref R., Domb A., Quellec P., Blunk T., Müller R.H., Verbavatz J.M., Langer R. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres. *Advanced Drug Delivery Reviews* 16, 215-233, 1995.
  
  - Gref R., Lück M., Quellec P., Marchand M., Dellacherie E., Harnish S., Blunk T., Müller R.H. "Stealth" corona-core nanoparticles surfaced modified by polyethylene glycol (PEG): influences of the corona (PEG chain length and surface density) and of the core composition on phagocytic uptake and plasma protein adsorption. *Colloids and Surfaces B* 18 (3-4), 301-313, 2000.
  
  - Gref R., Couvreur P., Barrat G., Mysiakine E. Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling. *Biomaterials* 24, 4529-4537, 2003.
  
  - Guantillake P. A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells and Materials* 5, 1-16, 2003.



- Guan J., Fujimoto K.L., Sacks M.S., Wagner W.R., Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications. *Biomaterials* 26, 3961-3971, 2005.
- Guelcher S.A. Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine. *Tissue Engineering: Part B* 14 (1), 3-17, 2008.
- Gursoy R.N., Benita S. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drugs. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 58 (3), 173-182, 2004.
- Gutiérrez J.M, González C., Maestro A., Solè I., Pey C.M., Nolla J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. *Current opinion in Colloid & Interface Science* 13, 245–251, 2008.

## H

- Hagigit T., Abdulrazik M., Orucov F., Valamanesh F., Lambert M., Lambert G., Behar-Cohen F., Benita S. Topical and intravitreal administration of cationic nanoemulsions to deliver antisense oligonucleotides directed towards VEGF KDR receptors to the eye. *Journal of controlled Release* 145 (3), 297-305, 2010.
- Hadgraft J., Guy R.H. Feasibility Assessment in Topical and Transdermal Delivery: Mathematical Models and In Vitro Studies. In Guy R.H, Hadgraft eds. *Transdermal Drug delivery 2<sup>a</sup> ed.*, Marcel Dekker, Inc. *Drugs and The Pharmaceutical Sciences* v132, pp 1-23, 2003.
- Hans M.L., Lowman A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* 6, 319-327, 2002.
- Hanson, W.A. Theoretical concepts. *Handbook of Dissolution testing*, Pharmaceutical Technology Publications, Oregon, p 4, 1989.
- He L., Wang G.L., Zhang Q. An alternative praclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. *International Journal of Pharmaceutics* 250, 45-50, 2003.
- Henkel, Informació tècnica del n-Butyl cyanoacrylate, Indermil™ Tissue Adhesive, 2003.

- 
- Higuchi T. Physical chemical analysis of percutaneous absorption process. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 11, 85-97, 1960.
  - Higuchi W.J., Misra J. Physical degradation of emulsions via the molecular diffusion route and the possible preventing thereof. *Journal of Pharmaceutical Science* 51, 459-566, 1962.
  - Hinkelman K, Kempthorne O. *Design and Analysis of Experiments 1*. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley & sons eds, Hoboken, New Jersey, 2008.
  - Hoeller S., Sperger A., Valenta C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *International Journal of Pharmaceutics* 370, 181-186, 2009.
  - Howard G.T. Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 49, 245-252, 2002.
  - Holm. R., Porter Ch. J.H., Edwards G.A., Müllertza A., Kristensen H.G., Charman W.N. Examination of oral absorption and lymphatic transport of halofantrine in a triple-cannulated canine model after administration in self-microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) containing structured triglycerides. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 20, 91-97, 2003.
  - Holmberg K., Jönson B., Kronberg B., Lindman B. Phase Behaviour of concentrated surfactant Systems. In John Wiley & sons eds. *Surfactants and polymers in aqueous solution*, pp 67-95, 2003.
  - Hong K., Park S. Preparation of polyurethane microcapsules with different soft segments and their characteristics. *Reactive and Functional Polymers* 42, 193–200, 1999.
  - Huang H., Zhang H., Li J., Cheng Sh., Hu F., Tan B. Miniemulsion copolymerization of styrene and butyl acrylate initiated by redox system at lower temperature-preparation and polymerization of miniemulsion. *Journal of Applied Polymer science* 68 (12), 2029-2039, 1998.
  - Huang Ch.Y., Chen Ch. M., Lee Y.D. Synthesis of high loading and encapsulation efficient praclitaxel-loaded poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion. *International Journal of pharmaceutics* 338, 267-275, 2007.

- Huang Y.B., Wang R.J., Chang J.Sh., Tsai Y.H, Wu P.C. Evaluation of ketoprofen formulation via penetration rate and irritation in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* 339, 47-51, 2007.

- Huang M. H., Huang Ch. Y.; Lin S. Ch., Chen J.H., Ku Ch.Ch., Chou A.H., Liu Sh. J., Chen H.W., Chong P., Leng Ch.H. Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single-dose, novel nanoemulsion-formulated pandemic influenza vaccine. *Microbes and Infection* 11, 654-660, 2009.

- Huynh N.T., Passirani C., Saulnier P, Benoit J.P. Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine. *International Journal of Pharmaceutics* 379, 201-209, 2009.

- Huynh T.T., Padois K., Sonvico F., Rossi A., Zani F., Pirot F., Doury J., Falson F. Characterization of a polyurethane-based controlled release system for local delivery of chlorhexidine diacetate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74, 255-264, 2010.

## I

- Ibrahim S.S., Awad G. A.S., Geneidi A., Mortada N. Comparative effects of different cosurfactants on sterile prednisolone acetate ocular submicron emulsions stability and release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 69, 225-231, 2009.

- Illan E., Amselen S., Weisspapier M., Schwarz J., Yogev A., Zawoznik E., Friedman D. Improved oral delivery of desmopressin via a novel vehicle: mucoadhesive submicron emulsion. *Pharmaceutical Research* 13, 1083-1087, 1996.

- Illum L., Hunneyball I.H., Davis S.S. The effect of hydrophilic coating on the uptake of colloidal particles by the liver and peritoneal macrophages. *International Journal of Pharmaceutics* 29, 53-65, 1986.

- Inactive ingredient search for approved drug products,”polysorbate 80” and “polyoxyl 35 castor oil”. United States Food and Drug Administration, 2010 (22 abril), <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index/cfm>.

- INRS, Institut National de Recherche et de Sécurité, Fiche Toxicologique n°166, 2009.

- Ionescu. *Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes*. Rapra Technology, 2005.

- 
- Izquierdo P., Esquena J., Tadros Th F., Dederen C., Garcia M.J., Azemar N., Solans C. Optimization of Nano-emulsion Preparation by Low-Energy Methods in an Ionic Surfactant System. *Langmuir* 18, 26-30, 2002.
  - Izquierdo P, Esquena J., Tadros T.F., Dederen J.C., Feng J., Garcia-Celma M.J., Azemar N., Solans C. Phase behaviour and Nano-emulsion Formation by the Phase Inversion Temperature Method. *Langmuir* 20, 6594-6598, 2004.
  - Izquierdo P., wiechers J.W., Escribano E., Garcia-Celma M.J., Tadros T.F., Esquena J., dederen J.C., Solans C. A study on the Influence of Emulsion Droplet Size on the Skin Penetration of Tetracaine. *Skin Pharmacology and Physiology* 20 (5), 263-270, 2007.

## J

- Jabbari E, Khakpour M. Morphology of and release behaviour from porous polyurethane microspheres. *Biomaterials* 21, 2073-2089, 2000.
- Jacobi U, Taube H:, Schäfer UF, Sterry W., Lademann J. Comparision of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the Stratum courneum. *Journal of Controlled Release* 103, 61-71, 2005.
- Jacobi U., Kaiser M., Toll R., Mangelsdorf S., Audring H., Otberg N., Sterry W., Lademann J. Porcine ear skin: an *in vitro* model for human skin. *Skin Research and Technology* 13, 19-24, 2007.
- Jiao J. Polyoxyethylated non-ionic surfactants and their applications in topical ocular drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 1663-1673, 2008.
- Johnsen H. MS., Schmid R.B. Preparation of polyurethane nanocapsules by miniemulsion polyaddition. *Journal of microencapsulation* 24:8, 731 - 742, 2007.
- Jumaa M., Müller B. W. The effect of oil components and homogenization conditions on the physicochemical properties and stability of parenteral fat emulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 163, 81-89, 1998.

### K

- Kabalnov AS. Can Micelles Mediate a Mass Transfer between Oil Droplets?. *Langmuir* 10 (3), 680-684, 1994.
- Kabalnov A.S. Coalescence in Emulsions. In ( Binks, B.P., eds.), *Modern Aspects of Emulsion Science*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 205-260, 1998.
- Kalia Y.N., Pirot F, Guy R.H. Homogeneous Transport in a Heterogeneous Membrane: Water Diffusion Across Human Stratum Corneum In Vivo. *Biophysical Journal* 71, 2692-2700, 1996.
- Kang B.K., Lee J.S., Chon S.K., Jeong S.Y., Yuk S.H., Khanga G, Lee H.B., Cho S. H. Development of self-microemulsifying drug delivery Systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics* 274, 65-73, 2004.
- Kan P., Chen Zh.B., Kung R.Y., Lee Ch.J., Chu I.M. Study on the formulation of o/w emulsion as carriers for lipophilic drugs. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 15, 117-125, 1999.
- Katsumoto Y, Ushiki H, Graciaa A, Lachaise J. Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: I. Hard sphere interaction and bound water on miniemulsion droplets. *Journal of Physics-Condensed Matter* 12, 249-264, 2000.
- Katsumoto Y, Ushiki H, Mendioboure B, Graciaa A, Lachaise J. Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: II. Growth mechanism of miniemulsion droplets. *Journal of Physics-Condensed Matter* 12, 3569-3583, 2000.
- Kentish S., Wooster T.J., Ashokkumar M., Balachandran S., Mawson R., Simons L.. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 170-175, 2008.
- Kim J.Y., Ku Y.S. Enhanced absorption of indomethacin after oral or rectal administration of a self-emulsifying system containing indomethacin to rats. *International Journal of Pharmaceutics* 194 (1), 81-89, 2000.
- Kimura T, Takeda K., Kageyn A., Toda M., Kurpsaki Y., Nakayama T. Intestinal absorption of dolichol from emulsions and liposomes in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 463-466, 1989.

- 
- Klang Sh., Benita S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug Carriers for intravenous administration. In Simon Benita eds. *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, editorial Ciutat, pp 119-152, 1998.
  - Koga K., Takarada N., Takada K. Nano-sized water-in-oil-in-water emulsion enhances intestinal absorption of calcein, a high solubility and low permeability compound. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 74 (2), 223-232, 2010.
  - Kogan A., Garti N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Advances in Colloids and Interface Science* 123-126, 369-385, 2006.
  - Kompaore F., Dupont Ch., Marty J.P. In vivo evaluation in man by two noninvasive methods of the stratum corneum barrier function after physical and chemical modifications *International Journal of Cosmetic Science* 13 (6), 293-302, 1991.
  - Kotyla T., Kuo F., Moolchandani V., Wilson T., Nicolosi R. Increased bioavailability of a transdermal application of a nano-sized emulsion preparation. *International Journal of Pharmaceutics* 347, 144-148, 2008.
  - Krauel K., Davies N.M., Hook S., Rades, T. Using different structure types of microemulsions for the preparation of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles by interfacial polymerization. *Journal of Controlled Release* 106, 76-87, 2005.
  - Kreuter J. Nanoparticles as Drug Delivery Systems. In Singh Nawla H. ed. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. American Scientific Publishers v 7, pp 161-180, 2004.
  - Król P. *Linear Polyurethanes. Synthesis Methods, Chemical Structures, Properties and Applications*. VSP ed., Leiden 2008.
  - Konica Minolta. *Precise Color Communication*, 2007.
  - Kumari A., Yadav S.K., Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 75, 1–18, 2010.
  - Kumar M., Misra A., Babbar A.K., Mishra A.K., Mishra P., Pathak K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *International Journal of Pharmaceutics* 358 (1-2), 285-291, 2008.

- Kunieda H., Shinoda K. Evaluation of the hydrophile-lipophile balance (HLB) of nonionic surfactants. I. Multisurfactant Systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 107 (1), 107-121, 1985.
- Kunieda H., Hanno K., Yamaguchi S., Shinoda K. The three-phase behavior of a brine/ionic surfactant/nonionic surfactant/oil system: Evaluation of the hydrophile-lipophile balance (HLB) of ionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* 107 (1), 129-137, 1985.
- Kwon S.M, Nam H.Y., Nam T, Park K., Lee S., Kim K., Kwon I.Ch., Kim J.c, Kang D, Park J.H., Jeong S.Y. In vivo time-dependent gene expression of cationic lipid-based emulsion as a stable and biocompatible non-viral gene carrier. *Journal of Controlled Release* 128, 89–97, 2008.

## L

- Lamba N.M.K., Woodhouse K.A., Cooper S.L. Polyurethanes in biomedical applications. In Lamba N.M.K., Woodhouse K.A., Cooper S.L (eds.). *Polyurethanes in Biomedical Applications*, CRC Press, Boca Raton, pp 205-255, 1998.
- Lambert G., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Gulik A., Couvreur P. Polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules containing an aqueous core as a novel colloidal carrier for the delivery of oligonucleotides. *Pharmaceutical Research* 17, 707-714, 2000.
- Lan P.N., Corneillie S., Schacht E., Davies M. And Shard A. Synthesis and characterization of segmented polyurethanes based on amphiphilic polyether diols. *Biomaterials* 17, 2273-2280, 1996.
- Landfester K., Bechthold N., Tiarks F., Antonietti.M. Formulation and stability mechanisms of polymerizable miniemulsions. *Macromolecules* 32, 5222-5228, 1999.
- Landfester K., Tiarks F. Hentze H.P., Antonietti M. Polyaddition in miniemulsions: A new route to polymer dispersions. *Macromolecular Chemistry and Physics* 201, 1-5, 2000.
- Landfester K. Miniemulsions for Nanoparticle Synthesis. *Topics in Current Chemistry* 227, 75-123, 2003.
- Landfester K., Eisenblätter J., Rothe R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. *Journal of Coatings Technology Research* 1, 65–68, 2004.

- 
- Landfester K. Synthesis of Colloidal Particles in Miniemulsions. Annual Review of Material Research 36, 231-279, 2006.
  - Landfester K., Musyanovych A., Mailänder V. From Polymeric Particles to Multifunctional Nanocapsules for Biomedical Applications Using de Miniemulsion Process. Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 48, 493-515, 2009.
  - Lawrence, M.J., Rees G.D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews 45, 89-121, 2000.
  - Lee G.W.J, Tadros Th.F. Formation and stability of emulsions produced by dilution of emulsifiable concentrates. Part I. An investigation of the dispersion on dilution of emulsifiable concentrates containing cationic and non-ionic surfactants. Colloids and Surfaces 5, 105-115, 1982.
  - Lee P.J., Langer R., Shastri V.P. Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs. Pharmaceutical Research 20, 264-269, 2002.
  - Legen I., Kracun M., SalobirM, Kerc J. The evaluation of some pharmaceutically acceptable excipients as permeation enhancers for amoxicillin. International Journal of Pharmaceutics 308, 84-89, 2006.
  - Legrand P., Lesieur S., Bochot A., Gref R., Raatjes W., Barratt G., Vauthier C. Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. International Journal of Pharmaceutics 344, 33-43, 2007.
  - Lehmann, L., Keipert, S., Gloor M. Effects of microemulsions on the stratum corneum and Hydrocortisone penetration. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 52, 129-136, 2001.
  - *Lehninger: Principios de Bioquímica* 5ªed. Cox M.M., Nelson D.L. eds. Ediciones Omega, Barcelona, 2009.
  - Leong T.S.H., Wooster T.J., Kentish S.E., Ashokkumar M. Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification. Ultrasonics Sonochemistry 16, 721-727, 2009.
  - Levin J., Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: an overview. Journal of Controlled Release 103, 291-299, 2005.



- Li L., Tan I.B. Preparation and properties of mixed micelles made of Pluronic polymer and PEG-PE. *Journal of Colloid and Interface Science* 317, 326–331, 2008.
- Li J., Nie Sh., Yang X., Wang Ch., Cui Sh., Pan W. Optimization of tocol emulsion for the intravenous delivery of clarithromycin. *International Journal of Pharmaceutics* 356, 282-290, 2008.
- Liang M., Davies N.M., Toth I. Increasing entrapment of peptides within poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles prepared from water-in-oil microemulsions by copolymerization. *International Journal of Pharmaceutics* 362, 141, 146, 2008.
- Lifshitz I.M., Slyozov V.V. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 19, 35-50, 1961.
- Lindqvist Y, Schneider G. Protein-biotin interactions. *Current Opinion in Structural Biology* 6, 798-803, 1996.
- Lin Ee Sh., Duan X., Liew J-, Nguyen Q.D. Droplet size and stability of nano-emulsions produced by the temperature phase inversion method. *Chemical Engineering Journal* 140, 626-631, 2008.
- Liu J., Kim A. Y, Wang L. Q., Palmer B.J., Chen Y.L., Bruinsma P., Bunker B.C., Exarhos G.J., Graff G:L., Rieke P.C., Fryxell G.E.,Virden J.W., Tarasevich B.J, Chick L.A. Self-assembly in the synthesis of ceramic materials and composites. *Advances in Colloid and Interface Science* 69, 131-10, 1996.
- Liu W., Sun D., Li C., Liu Q., Xu J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. *Journal of Colloid and Interface Science* 303, 557–563, 2006.
- Liu Ch-H., Yu Sh.Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, 509-515, 2010.
- Loth H. Vehicular influence on transdermal drug penetration. *International Journal of Pharmaceutics* 68 (1-3), 1-10, 1991.
- Lu Y., Wang Y.J., Tang X. Formulation and thermal sterile stability of a less painful intravenous clarithromycin emulsion containing vitamin E. *International Journal of Pharmaceutics* 346, 47-56, 2008.

## M

- Magonov S.N, Yerina N.A. Visualization of nanostructures with atomic force microscopy. In Yao N., Wang Z.L eds. *Handbook of Microscopy for Nanotechnology*. Kluwer Academic Publishers, New York, 113-154, 2005.
- Makidon P.E., Bielinska A.U., Nigavekar S.S., Janczak K.W., Knowlton J., Scott A.J., Mank N., Cao Z., Rathinavelu S., Beer M.R., Wilkinson J.E., Blanco L.P., Landers J.J., Baker J.R.J., Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine, *PLoS one* 3 (8), e2954, 2008.
- Malmsten M. Emulsions. In Malmsten M. ed. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. Drugs and the Pharmaceutical Sciences v. 122, Marcel Dekker Inc., pp. 161-200, New York , 2002.
- Malvern Instruments Ltd. Zetasizer Nano ZS User Manual. Size Theory 13.1-13.8, Worcestershire 2003.
- Martimprey H., Vauthier C., Malvy C., Couvreur P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71 (3), 490-504, 2009.
- Marszall, L. HLB of non-ionic surfactants: PIT and EIP methods. In Shick M.J ed. *Nonionic surfactants Physical chemistry*. Surfactant Science Series v 23, Marcel Dekker, New York, pp 493-547, 1987.
- *Martindale The Complete Drug reference*. 36<sup>th</sup> ed. Sweetman S.C ed. Pharmaceutical press, London, Chicago, 2009.
- Marty J.J., Oppenheim R.C., Speiser P. Nanoparticles: a new colloidal drug delivery systems. *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 53, 17-23, 1978.
- McClements D.J. Ultrasonic determination of depletion flocculation in oil-in-water emulsions containing a non-ionic surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 90 (1), 25-35, 1994.
- Merck Informació tècnica del diisocianat d'isoforona, 2010.

- Miñana- Pérez M., Gutron C., Zundel C., Andérez J.M., Salager J. Miniemulsion formation by transitional inversion. *Journal of Dispersion Science and Technology* 20, 893-905, 1999.
- Moghimi S.M., Hunter A. Ch. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. *Trends in Biotechnology* 18, 412-420, 2000.
- Moghimi S.M., Szebenil J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research* 42, 463-478, 2003.
- Moinard-Checot D., Chevalier, Y., Briançon S., Fessi H., Guinebretière S. Nanoparticles for drug delivery: review of formulation and process difficulties illustrated by the emulsion-diffusion process. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 6 (9-10), 2664-2681, 2006.
- Montasser I., Fessi H., Coleman A.W. Atomic force microscopy imaging of novel type of polymeric colloidal nanostructures. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 54, 281-284, 2002.
- Montasser I, Briançon S., Fessi H. The effect of monomers on the formulation of polymeric nanocapsules based on polyureas and polyamides. *International Journal of Pharmaceutics* 335 (1-2), 176-179, 2007.
- Montgomery D. *Design and Analysis of Experiments*, 7th Edition. Wiley and Sons eds., New York, 2010.
- Morales D. Gutierrez J.M., Garcia-Celma M.J., Solans C. A study of the relation between microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir* 19, 7196-7200, 2003.
- Mora-Huertas C.E., Fessi H., Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 385, 113-142, 2010.
- Moser K., Kriwet K., Naik A., kalia Y.N., Guy R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 52, 103-112, 2001.
- Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V., Patel P., Aminabhavi T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release* 125 (3), 193-209, 2008.

- Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima. Preparation of Poly (DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *International Journal of Pharmaceutics* 187 (2), 143-152, 1999.

## N

- Nakajima H., Tomomasa S., Okabe M. Preparation of nano-emulsions *Recueil des resumes*. In: Premier congres mondial de l'emulsion, Paris, vol.1, p.63, 1993.

- Nakajima H. Microemulsions in cosmetic. *Industrial Applications of Microemulsions*. In Solans C, Kunieda H., eds. *Surfactant Science Series*, Marcel Dekker, New York, Vol. 66, 175-197, 1997.

- Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 32, 762-798, 2007.

- Nicolaos G., Crauste-Manciet S., Farinotti R., Brossard D. Improvement of cefpodoxime proxetil oral absorption in rats by an oil-in-water submicron emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 263 (1-2), 165-171, 2003.

- Nicolas J., Couvreur P. Synthesis of poly(alkylcyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 111-127, 2009.

- Nilsson, G.E. Measurement of water exchange through skin. *Medical and Biological Engineering and Computing* 15, 209-218, 1977.

- Nobs L., Buchegger F., Gurny R., Allemann E. biodegradable nanoparticles for direct or two-step tumor immunotargeting. *Bioconjugate Chemistry* 17, 139-145, 2006.

- Nokhodchi A., Shokri J, Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D., Ghafourian T., Barzegar-Jalali M. The enhancement effect of surfactants on the penetration of lorazepam through rat skin. *International Journal of Pharmaceutics* 250, 359-369, 2003.

- Noolandi J., Shi A.Ch., Linse P. Theory of Phase Behaviour of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)- Poly (oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* 29, 5907-5919, 1996.

- Nordén T.P., Siekmann B., Lundquist S., Malmsten M. Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 13, 393-401, 2001.

### O

- Okaba H., Suzuki E., Saitoh T., Takayama K., Nagai T. Development of novel transdermal system containing d-limonene and ethanol as absorption enhancers. *Journal of Controlled Release* 32(3), 243-247, 1994.

- Ouzineb K., Lord C., Lesauze N., Graillat C., Tanguy P.A., McKenna T. Homogenisation devices for the production of miniemulsions. *Chemical Engineering Science* 61(9), 2994-3000, 2006.

- Owens III D.E., Peppas N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 307, 93-102, 2006.

### P

- Paiphansiri U., Julia Dausend J., Musyanovych A., Mailänder V., Landfester K. Fluorescent Polyurethane Nanocapsules Prepared via Inverse Miniemulsion: Surface Functionalization for Use as Biocarriers. *Macromolecular Bioscience* 9, 575-584, 2009.

- Pan H., Han J., Chen W., Yao M., Lu W. Targeting to tumor necrotic regions with biotinylated antibody and streptavidin modified liposomes. *Journal of Controlled Release* 125, 228-235, 2008.

- Paolino D., Ventura C.A., Nisticò S., Puglisi G., Fresta M. Lecithin microemulsions for the topical administration of ketoprofen: percutaneous adsorption through human skin and in vivo human skin tolerability. *International Journal of Pharmaceutics* 244, 21-31, 2002.

- Peracchia M.T., Vauthier C., Passirani C., Couvreur P., Labarre D. Complement consumption by poly(ethylene glycol) in different conformations chemically coupled to poly(isobutyl 2-cyanoacrylate) nanoparticles. *Life Sciences* 61, 749-761, 1997.

- Pey C.M., Maestro A.; Solé I., González C., Solans C., Gutiérrez J.M. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a

factorial design study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 288, (1-3), 144-150, 2006.

- Pinnagoda, R.A. Tupker, T. Agner and J. Serup, Occupational, guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the standardization group of the european society of contact dermatitis. *Contact Dermatitis* 22 (3), 164–178, 1990.

- Pinnagoda J., Tupker R.A. Measurement of the TEWL. In: Serup J., Jemec GBE , eds. *Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin*. Boca Raton, FL: CRC Press, 173-178, 1995.

- Pinto-Reis C., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 2 (1), 8-21, 2006.

- Pinto-Reis C., Ribeiro A.J., Veiga F., Neufeld R.J., Damgé C. Polyelectrolyte biomaterial interactions provide nanoparticulate carrier for oral insulin delivery. *Drug Delivery* 15 (2), 127-139, 2008.

- Pitaksuteepong T., Davies N.M., Tucker I.G., Rades T. Factors influencing the entrapment of hydrophilic compounds in nanocapsules prepared by interfacial polymerisation of water-in-oil microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 53, 335-342, 2002.

- Podlogar F., Bešter Rogač M., Gašperlin M. The effect of internal structure of selected water–Tween 40<sup>®</sup>–Imwitor 308<sup>®</sup>–IPM microemulsions on ketoprofen release. *International Journal of Pharmaceutics* 302, 68-77, 2005.

- Porras M, Solans C, González C., Gutiérrez J.M. Properties of water-in –oil (W/O) nano-emulsions prepared by a low-enregy emulsification method. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 324, 181-188, 2008.

- Portar M.R. *Handbook of surfactants*, Blackie Academic and professional, Chapman & Hall, 168-187, 1994.

- Priborsky J., Muhlbachova E. Evaluation of in vitro percutaneous absorption across human skin and animal models. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 42, 468-472, 1990.

- Primo F.L., Macaroff P.P., Lacava Z.G.M., Azevedo R.B., Morais P.C., Tedesco A.C. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and

development of magnetic nanoemulsion: a new candidate for cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 310, 2838-2840, 2007a.

- Primo F.L., Michieletto L., Rodrigues M., Macaroff P., Morais P.C., Lacava Z.G.M., Bentley M.V., Tedesco A.C. Magnetic nanoemulsions as drug delivery systems for Foscan<sup>®</sup>: skin permeation and retention *in vitro* assays for topical application in photodynamic therapy (PDT) of skin cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 311, 354-357, 2007b.

- Primo F.L., Rodrigues M.M.A., Simioni R. A., Maria V.L.B. Bentley M.V.L.B., Morais P.C, Tedesco A.C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 320, 211-214, 2008.

- Protein Data Bank (RCSB). Imatge structural 3D de l'estreptavidina unida a la biotina.

- Puglia C, Blasi P, Rizza L., Schoubben A, Bonina F., Rossi C., Ricci M. Lipid nanoparticles for prolonged topical delivery: an *in vitro* and *in vivo* investigation. *International Journal of Pharmaceutics* 357, 295-304, 2008.

Puglia C., Rizza L., Drescsler M., Bonina F. Nanoemulsions as vehicles for topical administration of glycyrrhetic acid : Characterization and *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Delivery* 17 (3), 123-129, 2010.

- Puglisi G., Fresta M., Giammona G., Ventura C.A.. Influence of the preparation conditions on poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsule formation. *International Journal of Pharmaceutics* 125, 283-287, 1995.

## Q

- Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Doelker, E.; Fessi, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification–diffusion technique. *Pharmaceutical Research* 15, 1056-1062, 1998.

- Quintanar-Guerrero, D.; Alléman, E.; Fessi, H.; Doelker, E. Pseudolatex preparation using a novel emulsion–diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International Journal of Pharmaceutics* 188, 155-164, 1999.

**R**

- Rang M.J., Miller C.A. Spontaneous Emulsification of Oils Containing Hydrocarbon, Nonionic Surfactant, and Oleyl Alcohol. *Journal of Colloid and Interface Science* 209, 179-192, 1999.
- Rapoport N. Stabilization and activation of Pluronic micelles for tumor-targeted drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 16, 93-111, 1999.
- *Real Farmacopea Española*, Tercera edición, 2005.
- Redlich C.A., Karol M.H. Diisocyanate asthma: clinical aspects and immunopathogenesis. *International Immunopharmacology* 2, 213-224, 2002.
- Rhee Y.S., Choi J.G, Park E.S., Chi S.Ch. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 228, 161-170, 2001.
- Rolland A., Wagner N., Shroot B., Schaefer H. Site-specific drug delivery to pilosebaceous structures using polymeric microspheres: *Pharmaceutical Research* 10 (2), 1738-1744, 1993.
- Roser M., Fischer D., Kissel Th. Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres.II: effect of surfaces charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 46, 255-263, 1998.
- Rosevear F.B. Liquid crystals: The Mesomorphic Phases of Surfactant Compositions. *Journal of the Society of Cosmetics Chemists* 19, 581-594, 1968.
- Roskos K.V., Guy R.H. Assessment of Skin Barrier Function Using Transepidermal Water Loss: Effect of Age. *Pharmaceutical Research* 6: 949-953, 1989.
- Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller P, eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. J. Pharmaceutical Press and American Pharmaceutical association, 6<sup>th</sup> edition, 2009.

**S**

- Sadurní N., Solans C., Azemar N., García-Celma M.J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 26, 438-445, 2005.



- Sadurní N. Tesi doctoral: Estudi de la formació de nano-emulsions de fase externa aquosa i solubilització de fàrmacs lipòfils, Universitat de Barcelona, 2006.
- Sagitani H. Making homogeneous and fine droplet O/W emulsions using nonionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 58 (6), 738-743, 1981.
- Sagitani H. Phase Inversion and D-Phase Emulsification. In Friberg S., Lindman B., eds. *Organized Solutions, Surfactants in Science and Technology* v 44 (Marcel Dekker), 259,271, 1992.
- Santander-Ortega M.J., Csaba N., Alonso M.J., Ortega-Vinuesa J.L, Bastos-González D. Stability and physicochemical characteristics of PLGA, PLGA: poloxamer and PLGA: poloxamine blend nanoparticles: A comparative study. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering aspects* 296, 132- 140, 2007.
- Santerre J.P., Woodhouse K., Laroche G., Labow R.S. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials. *Biomaterials* 26, 7457-7470, 2005.
- Santos-Magalhães N.S., Pontes A., Pereira V.M.W., Caetano M.N.P. Colloidal Carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *International Journal of Pharmaceutics* 208, 71-80, 2000.
- Santos-Magalhães N.S., Furtado-Mosqueira V.C. Nanotechnology applied to the treatment of malaria. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 560–575, 2010.
- Sarkar D., Yang J.C., Gupta A. S., Lopina S.T. Synthesis and Characterization of L-tyrosine based polyurethanes for biomaterial applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 21, 2008.
- Sarmiento B., Ribeiro A.J., Veiga F., Ferreira D.C., Neufeld R.J.. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7 (8), 2833-2841, 2007.
- Sarpotdar P.P., Zatz J.L. Evaluation of penetration enhancement of lidocaine by non-ionic surfactants through hairless mouse skin in vitro. *Journal of Pharmaceutical Science* 75, 176-181, 1986.

- 
- Schmolka, I. R. Poloxamers in the Pharmaceutical Industry. In Tarcha, P.J, eds., *Polymers for controlled drug delivery*. CRC press, Boca Ratón, 189-208, 1991.
  - Schwarz J.S., Weisspapir M.R., Friedman, D.I., Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. *Pharmaceutical Research* v 12, 687-692, 1995.
  - Scott R.C., Kwon G.S. Polysorbate 80 and Cremophor EL Micelles Deaggregate and Solubilize Nystatin at the Core-Corona Interface. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94, 2345-2354, 2005.
  - Scheuplein R.J., Blank I.H. Permeability of the skin. *Physiological review* 51, 702-747, 1971.
  - Serup J., Agner T. Colorimetric quantification of erythema—a comparison of two colorimeters (Lange Micro Color and Minolta Chroma Meter CR-200) with a clinical scoring scheme and laser-Doppler flowmetry. *Clinical and Experimental Dermatology* 15, 267- 272, 1990.
  - Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. *Microscòpia Electrònica de Transmissió*, 2009.
  - Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. *Microscòpia Confocal*, 2009.
  - Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. *Espectroscòpia d'Infraroig*, 2009.
  - Shahi V., Zatz. J.L. Effect of formulation factors on penetration of hydrocortisone through mouse skin. *Journal of Pharmaceutical Science* 67, 789-792, 1979.
  - Shi Sh., Chen H., Cui Y., Tang X. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 373 (1-2), 147-155, 2009.
  - Shinoda K., Saito H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interface Science* 26, 70-74, 1968.
  - Shinoda K., Kunieda H. Conditions to produce so-called microemulsions: Factors to increase the mutual solubility of oil and water by solubilizer. *Journal of Colloid and Interface Science* 42(2), 381-387, 1973.
  - Shinoda K., Hanrin M., Kunieda H., Saito H. Principles of attaining ultra-low interfacial tension: The role of hydrophile—lipophile-balance of surfactant at oil/water interface. *Colloids and Surfaces* 2 (4), 301-314, 1981.

- Shokri J, Nokhodchi A., Dashbolaghi A, Hassan-Zadeh D., Ghafourian T., Barzegar-Jalali M. The effect of surfactants on the skin penetration of diazepam. *International Journal of Pharmaceutics* 228, 99-107, 2001.
  
- Shu Sh., Chen H., Cui Y., Tang X. Formulation, stability and degradation kinetics of intravenous cinnarizine lipid emulsion. *International Journal of Pharmaceutics* 373, 147-155, 2009.
  
- Simon G.A., Maibach Hi. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations. An overview. *Skin Pharmacology and Applied skin Physiology* 13, 229-234, 2000.
  
- Sigma Aldrich a, Informació tècnica de la biotina, 2008.
  
- Sigma Aldrich b, Informació tècnica de la L-lisina, 2009.
  
- Sigma Aldrich c, Informació tècnica de l'estreptavidina, 2008.
  
- Sing. A.J.F., Graacia A., Lachaise J., Brochette P., Salager J.L. Interactions and coalescence of nanodroplets in translucent O/W emulsions. *Colloids and Surfaces A. Physicochemical and Engineering Aspects* 152, 31-39, 1999.
  
- Singh K.K., Vingkar Sh.K. Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine. *International Journal of Pharmaceutics* 347 (1-2), 136-143, 2008.
  
- Sivak W.N., Pollack, I.F., Petoud S., Zamboni W.C., Zhang J., Beckman E.J. LDI-glycerol polyurethane implants exhibit controlled release of DB-67 and anti-tumor activity in vitro against malignant gliomas. *Acta Biomaterialia* 4, 852-862, 2008.
  
- Skarja GA, Woodhouse, KA. Synthesis and characterization of degradable polyurethane elastomers containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterial Science Polymer Edition* 9, 271-295, 1998.
  
- Smith E.W., Surber C., Maibach H.I. Topical Dermatological Vehicles: A Holistic Approach. In Bronaugh R.K., Maibach H.I. ed. *Percutaneous Absorption Drugs- Cosmetics- Mechanisms- Methodology 3<sup>ed</sup>* Drugs and the Pharmaceutical Sciences v 97. Marcel Dekker, pp 655-662, New York, 1999.

- 
- Snitzowska, M., Janicki, S., Dabrowska E., Zurowska-Pryczkowska K. Submicron emulsions as drug carrier. Studies on desestabilization of various drugs. *European Journal of Pharmaceutical Science* 12, 175-179, 2001.
  
  - Solans C., Pons R., Kunieda H. Overview of basic aspects of microemulsions. In Solans C., Kunieda H eds. *Industrial applications of microemulsions*. Marcel Dekker, New York, Surfactant science Series v 66, 1-19, 1997.
  
  - Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garcia-celma M.J. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 10, 102-111, 2005.
  
  - Solans C., Esquena J, Forgiarini A.M., Usón N., Morales D., Izquierdo P., Azemar N., García-Celma M.J. Nano-emulsions: Formation, Properties, and Applications. In Mittal K.L., Shah, Dinash O. eds. *Adsorption and Aggregation of surfactants in solution*. Marcel Dekker, New York, v 109, 525, 554, 2003.
  
  - Solè I., Maestro A., González C., Solans C., Gutiérrez J.M. Optimization of Nano-emulsion Preparation by Low-Energy Methods In an Ionic surfactant System. *Langmuir* 22, 8326-8332, 2006.
  
  - Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release* 70, 1-20, 2001.
  
  - Strickley R.G. Solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. *Pharmaceutical Research* 21 (2), 201-230, 2004.
  
  - Strickley, R. G. Solubilizing Excipients in Pharmaceutical Formulations. In Swarbrick J. ed. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* v 1, pp 3334 - 3366, 2006.
  
  - Subramanian B., Kuo F., Ada E, Koytla T., Wilson Th., Yoganathan S., Nicolosi R. Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. *International Immunopharmacology* 8, 1533-1539, 2008.
  
  - Sullivan C.O, Birkinshaw C. In vitro degradation of insulin-loaded poly (n-butylcyanoacrylate) nanoparticles. *Biomaterials* 25, 4375-4382, 2004.

### T

- Tadros Th., Izquierdo P., Esquena J., Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 108-109, 303-318, 2004.
- Tadros Th.F. Emulsions Science and Technology: A general Introduction. In Tadros T.F, ed. *Emulsion Science and Technology*, pp 1-55, Wokingham, 2009.
- Taisne L., Cabane.B. Emulsification and Ripening following a Temperature Quench. *Langmuir* 14 (17), 4744-4752, 1998.
- Takasu M., Kawaguchi H. Preparation of colored latex with polyurea shell by miniemulsion polymerization. *Colloids and Polymer Science* 283, 805-811, 2005.
- Tamilvanan S. Oil-in-water lipid emulsions: implications for parenteral and ocular delivering systems. *Progress in Lipid Research* 43, 489-533, 2004.
- Taylor P., Ottewill TH. The formation and ageing rates of oil-in-water miniemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 88, 303-316, 1994.
- Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 99, 175-185, 1995.
- Tettley Amlalo R.N.O. Doctoral Thesis: *In vitro* release of ketoprofen from proprietary and extemporaneously manufactured gels, Rhodes University, 2005.
- Tiarks F, Landfester K, Antonietti M. One-step Preparation of Polyurethane Dispersions by Miniemulsion Polyaddition. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*; vol.39; 2520-2524, 2001.
- Thomson T. Polyurethanes as specialty chemicals. Principles and applications. CRC press, 2005.
- Tije A.J., Verweij J., Loos W.J., Sparreboom A. Pharmacological Effects of Formulation Vehicles Implications for Cancer Chemotherapy. *Clinical Pharmacokinetic* 42 (7), 665-685, 2003.
- Toguchi H., Pgawa Y., Shimamoto T. effects of the physicochemical properties of the emulsion formulation on the bioavailability of ethyl 2-chloro-3-[4-(2-methyl-2-phenylpropyloxy)phenyl] propionate in rats. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 2797-2800, 1990.

- 
- Tomé D., Bos C. Lysine requirement through the human Life Cycle. The Journal of Nutrition 137, 6<sup>th</sup> Amino Acid Assessment Workshop, 1642S-1645S, 2007.
  - Torini L, Argillier J.F, Zydowicz N., Interfacial Polycondensation Encapsulation in Miniemulsion. *Macromolecules* 38, 3225-3236, 2005.
  - Trimaille Th., Chaix C., Pichot Ch., Delair Th. Polymer functionalized submicrometric emulsions as potential synthetic DNA vectors. *Journal of Colloid and Interface Science* 258, 135-145, 2003.
  - Trotta M., Gallarte M., Pattarino F., Carlotti M.E. Investigation of the phase behaviour of systems containing lecithin and 2-acyl lysolecithin derivates. *International Journal of Pharmaceutics* 190, 83-89, 1999.
  - Truong-Le V.L., Walsh S.M., Schweibert E., Mao H.Q., Guggino, W.B., August J.T., Leong K.W. gene transfer by DNA-gelatin nanospheres. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 361, 47-56, 1999.

## U

- Ugelstad J., El-Aasser M.S., Vanderhoff, J.W. Emulsion polymerization: initiation of polymerization in monomer droplets. *Journal of Polymer Science: Polymer letters edition* 11 (8), 503-513, 1973.
- Urbina-Villalba, Forgiarini A., Rahn K., Lozsán A. Influence of flocculation and coalescence on the evolution of the average radius of an O/W emulsion. Is a linear slope of  $\bar{R}^3$  vs. t an unmistakable signature of Ostwald ripening?. *Physical Chemistry Chemical Physics* 11, 11184-11105, 2009.
- Uson N. Tesi doctoral: Estudi de la formació de nano-emulsions de tipus aigua en oli, Universitat de Barcelona, 2003.
- Uson N., Garcia M.J., Solans C. Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil Systems prepared by a low energy emulsification method. *Colloids and surfaces A* 250, 415-421, 2004.
- USP 29 NF 24, 2006.

### V

- Vandamme Th.F. Microemulsion as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. *Progress in retinal and eye research*, 21, 15-34, 2002.
- Vauthier, C., Couvreur, P. Development of polysaccharide nanoparticles as novel drug carrier systems. In Wise, Trantolo, Cichon, Inyang, Stottmeister, Eds. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*, Marcel Dekker, Inc.: New York, 413-429, 2000.
- Vauthier C., Couvreur P. Development of nanoparticles made of polysaccharides as novel drug carrier systems. In D.L Wise ed. *Handbook of Pharmaceutical Controlled Release Technology*. Marcel Dekker, New York, pp 413-429, 2000.
- Vauthier C., Dubernet C., Fattal E., Pinto-Alphandary H., Couvreur P. Poly (alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 55, 519-548, 2003.
- Vauthier C.; Labarre D., Ponchel G. Design aspects of poly (alkylcyanoacrylate) nanoparticles for drug delivery. *Journal of Drug Targeting* 15 (10), 641-663, 2007.
- Vauthier C., Cabane B., Labarre D. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 466- 475, 2008.
- Vauthier C., Bouchemal K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research* 26 (5), 1025-1058, 2009.
- Vega E, Egea MA, Valls O, Espina M, García ML. Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophthalmic administration. *Journal of Pharmaceutical Science* 95 (11), 2393-2405, 2006.
- Verma D.D., Fahr A. Synergistic penetration enhancement effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporine. *Journal of Controlled Release* 97 (1), 55-66, 2004.
- Vermette P., Griesser H., Laroche G., Guidoin R. *Biomedical Applications of Polyurethanes*. Eureka.Com, Landes Bioscience. Georgetown, Texas, 2001.
- Verwey, E.S.W., Overweek, J.Th.G. *Theory of the Stability of Liophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam, 1948.

- Vyas T.K., Shahiwala A., Amiji M.M. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsions formulations, *International Journal of Pharmaceutics* 347 (1-2), 93-101, 2008.

- Vonarbourg A., Passirani C., Saulnier P., Benoit J.P. Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery Systems. *Biomaterials* 27, 4356-4373, 2006.

## W

- Wagner C. Theorie der Alterung von Niederschlägen durch Umlösen (Ostwald-Reifung). *Zeitschrift für Elektrochemie, Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 65 (7-8), 581-591, 1962.

- Wall D.S., Abel S.R. Therapeutic-interchange algorithm for multiple drug classes. *American Journal of Health-System Pharmacy* 53,1295-1296, 1996

- Walstra P., Emulsion stability. In Becher P. ed., *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 1 - 62, 1996.

- Walstra P., Smulders P.E.A. Emulsion formation. In Binks B.P ed. *Modern Aspects of Emulsion Science*. The Royal Society of Chemistry, pp 56-100, 1998.

- Watkinson A.C., Hadgraft J., Walters K.A., Brain K.R. Measurement of diffusional parameters in membranes using ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Cosmetic Science* 16: 199-210, 1994.

- Watnasirichaikul S., Davies N.M., Rades T., Tucker I.G. Preparation of Biodegradable Insulin Nanocapsules from Biocompatible Microemulsions. *Pharmaceutical Research* 17, 684-689, 2000.

- Watnasirichaikul S., Rades T., Tucker I.G, Davies N.M. Effects of formulation variables on characteristics of poly (ethylcyanoacrylate) nanocapsules prepared from w/o microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 235, 237-246, 2002.

- Weber C., Coester C., Kreuter J., Langer K. Dessolvation process and surface characterization of protein nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 194, 94-102, 2000.



- Weiss J., Coupland J.N. Brathwaite D., McClements D.J. Influence of molecular structure of hydrocarbon emulsion droplets solubilisation in nonionic surfactant micelles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 121, 53-60, 1997.
  
- Werth, P.W., Downing, D.T., Startum corneum: biological and biochemical considerations. In J, Hadgraft, R.H. Guy eds. *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*. Marcel Dekker, New York, 1-22, 1989.
  
- Wilhelmsen L. Ethics of clinical trials - The use of placebo. *European Journal of Clinical Pharmacology* 16 (5), 295-297, 1979.
  
- Williams A.C., Barry B.W. Penetration enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 603-618, 2004.
  
- Wretling A.J. The pharmacological basis for the use of fat emulsions in intravenous nutrition. *Acta chirurgica scandinavica. Supplementum* 325, 31-41, 1964.
  
- Wu M., Dellacherie E., Durand A.; Marie E. Poly (n-butyl cyanoacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization.2. PEG-based surfactants. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 69, 147-151, 2009.
  
- Wu P.Ch., Chang J.Sh., Huang Y.B., Chai Ch.Y., Tsai Y.H. Evaluation of percutaneous absorption and skin irritation of ketoprofen through rat skin: in vitro and in vivo study. *International Journal of Pharmaceutics* 222, 225-235, 2001.

## X

- Xu R. Light Scattering. The Rigorous Solution Mie Theory. In Particle Technology Series eds. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Kluwer Academic publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 66-69, 2002.

**Y**

- Yamakazi N., Du Y.Z., Nagai M., Omi S. Preparation of polyepoxide microcapsule via interfacial polyaddition reaction in W/O and O/W emulsion systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 29, 159-269, 2003.
- Yang H.J. Cho W. G., Park S.N. Stability of oil-in-water nano-emulsions prepared using the phase inversion composition method. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 15, 331-335, 2009.
- Youenang Piemi M.P., Korner D., Benita S., Marti J.P. Positively and negatively charges submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *Journal of Controlled Release* 58, 177-187, 1999.
- Yotsuyanagi T., Higuchi W.J., Ghanem A.H. Theoretical treatment of diffusional transport into and trough an oil-water emulsion with an interfacial barrier at the oil-water interface. *Journal of Pharmaceutical Science* 62, 40-43, 1973.

**Z**

- Zambaux, M.F.; Bonneauz, F.; Gref, R.; Maincent, P.; Dellacherie, E.; Alonso, M.J.; Labrude, P.; Vigneron, C. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *Journal of Controlled Release* 50, 31-40, 1998.
- Zana R. Micellization of amphiphiles: selected aspects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 123-124, 27-35, 1997.
- Zanetti-Ramos B.G., Lemos-Senna E., Soldi V., Borsali R., Cloutet E., Cramail H. Polyurethane nanoparticles from a natural polyol via miniemulsion technique. *Polymer* 47, 8080-8087, 2006.
- Zanetti-Ramos B.G, Lemos-Senna E., Cramail H., Cloutet E., Borsali R., Soldi V. The role of surfactant in the miniemulsion polymerization of biodegradable polyurethane nanoparticles. *Material Science and Engineering C*, 28 (4), 526-531, 2008.
- Zdrahala R.J., Zdrahala I.J. Biomedical Applications of Polyurethanes: A Review of Past Promises, Present Realities, and a Vibrant Future. *Journal of Biomaterials Applications* 14, 67-90, 1999.

- Zhang J.Y., Beckman E.J., Piesco N.P., Agarwal S. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials* 21, 1247-1258, 2000.
- Zhang J.Y., Beckman E.J., Hu J., Yang G.G., Agarwal S., Hollinger J.O. Synthesis, Biodegradability, and Biocompatibility of Lysine Diisocyanate- Glucose Polymers. *Tissue Engineering* 8, 771-785, 2002.
- Zhang H., Yao M., Morrison R.A., Chong S. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of p- glycoprotein substrate, digoxina in rats. *Archives of Pharmacal Research* 26, 768-772, 2003.
- Zhang Y., Zhu S., Yin L., Qian F., Tang C., Yin Ch. Preparation, characterization and biocompatibility of poly(ethylene glycol)-poly(n-butyl cyanoacrylate) nanocapsules with oil core via miniemulsion polymerization. *European Polymer Journal* 44, 1654-1661, 2008.
- Zhang J., Wu M., Yang J., Wu Q., Jin Zh. Anionic poly (lactic acid)- polyurethane micelles as potential drug delivery carriers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 337, 200-204, 2009.

