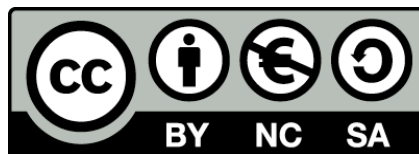




UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Ús de biopolimers en la preparació de formes d'alliberament modificat de lisinat d'ibuprofè

Francesc Caballero Gobern



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.

This doctoral thesis is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA, TECNOLOGIA FARMACÈUTICA, I  
FISICOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORAT DE RECERCA, DESENVOLUPAMENT I  
CONTROL DE MEDICAMENTS

**ÚS DE BIOPOLIMERS EN LA PREPARACIÓ DE FORMES  
D'ALLIBERAMENT MODIFICAT DE LISINAT D'IBUPROFÈ**

FRANCESC CABALLERO GOBERN

BARCELONA 2021



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT DE RECERCA, DESENVOLUPAMENT I  
CONTROL DE MEDICAMENTS

**ÚS DE BIOPOLIMERS EN LA PREPARACIÓ DE FORMES  
D'ALLIBERAMENT MODIFICAT DE LISINAT D'IBUPROFÈ**

Memòria presentada per Francesc Caballero Govern per optar al títol de doctor per la  
Universitat de Barcelona

Directors de tesi

Dra. Montserrat Miñarro Carmona  
(Universitat de Barcelona)

Dr. Josep Ramon Ticó Grau  
(Universitat de Barcelona)

Doctorand

Francesc Caballero Govern

2021





## AGRAÏMENTS

Més enllà de l'experimentació i la dissertació científica que es descriu en aquesta tesi, com en qualsevol treball de llarga durada i aquest puc assegurar que ho ha estat, darrere sempre hi ha una història singular no relatada al cos del treball però no per això menys transcendent i que no és altra que la de les circumstàncies i les persones que hi han influït d'una manera o altra i per les que vull deixar constància del meu agraïment.

Als meus directors, la Dra. Montse Miñarro i el Dr. Josep Ramon Ticó, per la seva amistat, recolzament incondicional i per facilitar-me les coses. Amb la Montse vam ser companys de feina a Laboratoris Salvat, jo llavors era un farmacèutic novell acabat de llicenciar que tot just m'iniciava al món de la indústria, mai he oblidat la seva guia i suport professional quan sovint jo em trobava desorientat i en territoris per mi desconeguts. Tampoc oblidaré quan cada matinada em passava a recollir a casa meva per anar a treballar només com a gest d'amistat i de bona voluntat amb un company de feina, i és que per tesis i agraïments que hi escrigui mai li podré pagar aquest gest absolutament desinteressat i que tant em va ajudar. El trajecte, no obstant, no s'acabava aquí, a la sortida de treballar anàvem cap a la Facultat de Farmàcia, la nostra segona feina d'aquells dies. El primer que fèiem, ja tard, era anar a dinar al bar de la Facultat a on gairebé a diari compartíem taula amb el Dr. Josep Ramon Ticó i amb el que recordo entranyables tertúlies de l'actualitat social i acadèmica del moment, carregades d'humor intel·ligent. Certament, mai oblidaré aquells moments ni l'especial companyia dels qui els compartíem. Gràcies per aquells moments, per acceptar la direcció de la tesi, pels vostres consells i revisió de la feina.

Al Dr. Josep M<sup>a</sup> Suñé, ell ha estat un dels elements essencials, també artífex d'aquest treball, per a mi tot un referent personal i professional. Vaig tenir el privilegi de tenir-lo de professor a l'assignatura de Tecnologia Farmacèutica, allà em va obrir tot un món de possibilitats desconegudes per mi fins aquell moment, amb la seva passió i manera de transmetre el coneixement a l'aula, algú que coneix bé i estima la professió, sens dubte i sempre ho he dit, potser el professor i una de les persones que més ha influït en la meua visió i vocació per la professió farmacèutica a la indústria. Quan li vaig plantejar de fer la tesi, no només no va dubtar a acceptar-me al seu grup de recerca, també em va guiar en la selecció de la temàtica, en establir les línies directrius i el plantejament tècnic d'inici, de fet, ell va ser qui em va suggerir de treballar amb el lisinat d'ibuprofè. Vull deixar constància que al llarg de tots aquests anys s'ha preocupat sempre de saber l'estat del treball i he tingut la sort de poder comptar amb el seu recolzament i tenir-lo al costat sempre que l'he necessitat.

El meu agraïment sincer a la Dra. Ana Calpena per donar-me idees de millora durant les comissions de seguiment, oferir-me el seu ajut incondicional per resoldre qualsevol qüestió científica, programes de tractament gràfic i estadístic, així com donar-me suport durant els tràmits de presentació. Gràcies Ana per estar al cas de què tot anés bé.

A la Dra. Mercè Foradada. A ella li dec moltíssimes coses que no cabrien en aquestes línies i van molt més enllà d'aquest treball, ella és qui em va empènyer a iniciar el projecte, promovent-lo gairebé d'amagat perquè no m'hi pogués negar. Per la seva proximitat, amiga, esposa i companya de viatge, ha estat ella la que ha hagut de suportar la part més fosca del treball, experiments fallits, frustracions, moments de desànim i incerteses de tota mena, però sempre ha estat al meu costat per compartir-ho en tot moment, bona coneixedora del meu caràcter, de les meves virtuts i defectes i sobretot amb qui poder discutir en el mateix llenguatge científic per buscar solucions als problemes tècnics i donar sortida a qüestions tan pràctiques com les cerques de bibliografia o la pròpia redacció de la tesi. Sense la seva contribució aquesta tesi no s'hauria ni tan sols iniciat.

Vull deixar constància també de persones que fora del món acadèmic han contribuït de manera rellevant aquest treball.

En primer lloc a la meua sogra, la Maria Sellabona, a ella li dec entre altres moltes coses i ensenyaments que m'han resultat útils a la vida i per a poder fer front a aquest treball, la traducció al català de la

paraula "beads". Aquesta és la paraula anglesa amb què la literatura científica es refereix a les esferes d'alginat, un dels eixos d'aquesta tesi. Alguns diccionaris ho traduïen com a "perles" però per a mi no acabava de ser això. No podia deixar de pensar en quina paraula equivalent en català podia fer servir per la redacció del treball, quan la Maria em va dir: "*això que fas tu són granes*" i ho vaig veure clar, no em va ser necessari consultar cap lingüista, "granes" aquest és el mot català amb que traduiria allò que la comunitat científica anomena "beads".

Vull agrair molt especialment al meu fill Carles Caballero la seva contribució en la finalització d'aquest treball que ha acabat resultant imprescindible. A les seves hores lliures i de vacances, ha estat un dels meus suports al laboratori, vetllant per la preparació de reactius, fer les extraccions de mostra i mesures de manera puntual i precisa durant els llargs estudis d'inflament i d'alliberament i tot i estar en plena adolescència, m'ha demostrat un esperit crític i científic propis d'un adult, aportant idees i solucions de manera sorprenent per millorar els processos i l'organització dels experiments al laboratori. Espero que aquesta inversió de temps li hagi servit per formar-se i li sigui útil per poder decidir amb més criteri i per tant, de manera més lliure, quin vol que sigui el seu futur professional.

A la meua filla Ingrid Caballero, el meu agraïment per la seva alegria i energia de cada dia, ella també forma part de les persones que m'han ensenyat a on rau la importància real de les coses, per la seva curta edat no ha pogut contribuir encara a la part material d'aquest treball, i certament sé que ho hauria fet perquè no ha deixat d'insistir que volia fer-ho.

Agraeixo als meus pares Francesc i Antònia haver-me inculcat els valors de la justícia, la constància i el treball en la consecució d'un objectiu i per llunyà i inassolible que pugui semblar tot és possible. A les meves germanes M<sup>a</sup> Antònia, Montse i Sara, les paraules d'ànim i el recolzament rebut tota la vida. Vull dedicar especialment aquest treball a la memòria del meu pare Francesc i de la meua sogra Maria, sé que haurien gaudit molt podent compartir amb mi la seva finalització.

Hores d'ara tothom ja deu saber quina ha estat la seva contribució real al treball i és per això que més enllà de qualsevol compromís, vull agrair sincerament a tots i sense excepció els que d'alguna manera o altra hi han contribuït, fins i tot aquells que potser no en són prou conscients, però que amb un detall, un petit gest o consell potser desapercebuts, potser per a ells insignificant, m'han obert un nou horitzó i una oportunitat de seguir endavant. El recorregut ha estat llarg en el temps i no em voldria deixar a ningú i per això tampoc no faré cap llistat de noms. Sempre he pensat que les persones allà a on demostren el que són realment és en els petits detalls, aquells que ningú veu i passen desapercebuts per la majoria però que sempre sumen i fan que el balanç sigui finalment positiu. A tots moltes gràcies.

“Viatgers en el temps, exploradors  
dels confins del coneixement”

*A la meva esposa Mercè i als meus fills Carles i Ingrid*



## RESUM

El propòsit del present treball, és l'estudi de l'ús dels biopolímers alginat i chitosan per a la formulació d'hidrogels basats en xarxes polimèriques i xarxes polimèriques interpenetrants, com a matrius per a la microencapsulació de lisinat d'ibuprofè amb l'objecte de modular les propietats d'alliberament del fàrmac en funció d'estímuls externs com el pH. S'ha caracteritzat i optimitzat el mètode de preparació, les matrius obtingudes i els paràmetres que regeixen l'alliberament del lisinat d'ibuprofè, tant pel que fa al lloc selectiu (intestí) evitant l'alliberament gàstric, així com altres funcions de la microencapsulació que poden resultar útils, com l'emascament del seu sabor o la millora de l'estabilitat.

Els resultats mostren de manera clara la capacitat dels hidrogels d'alginat entrecuats amb calci per retenir el lisinat d'ibuprofè de forma efectiva, protegir-lo durant el trànsit gàstric i propiciar el seu alliberament a pH intestinal. L'estabilització de les matrius amb un policatió com el chitosan, inicialment no semblava aportar millores significatives a les característiques ni d'inflament de les matrius, ni d'alliberament, no obstant, amb la modificació i optimització del mètode de preparació, s'han obtingut matrius en forma de *granes* molt resistents al medi intestinal. Les matrius obtingudes, alliberen el fàrmac de forma lenta i amb potencial utilitat per a l'obtenció de formes farmacèutiques destinades a l'alliberament colònic del lisinat d'ibuprofè i per tant, amb possible aplicació pel tractament de malalties inflamatòries intestinals o per la prevenció de determinades tipologies de càncer de còlon.

Els resultats permeten evidenciar, no només les interaccions entre els biopolímers alginat i chitosan i la seva influència en funció de les seves proporcions sobre les propietats d'inflament de les matrius i els perfils d'alliberament del lisinat d'ibuprofè, sinó també, com el propi lisinat d'ibuprofè interacciona amb els biopolímers, esdevenint part estructural de les matrius i un element més de modulació de les seves propietats, convertint-se en un ingredient funcional dins la pròpia formulació, a més del seu paper com a principi actiu.

S'ha demostrat la idoneïtat dels biopolímers per a l'encapsulació del lisinat d'ibuprofè en granes d'alginat i granes mixtes d'alginat-chitosan d'alliberament modificat i sensibles al pH del medi.

## SUMMARY

The purpose of the present work, is to study the use of alginate and chitosan biopolymers for the formulation of hydrogels based on polymeric networks and interpenetrating polymeric networks, as matrices for the microencapsulation of ibuprofen lysinate, with the aim to modulate the drug-releasing properties depending on external stimuli such as pH. The preparation method, the matrices obtained and the parameters that affect the release of ibuprofen lysinate, have been characterized and optimized, both in terms of selective site (intestine) avoiding gastric release, as well as, other functions where microencapsulation may be useful, such as flavour masking or stability improvement.

The results clearly show the ability of alginate-calcium cross-linked hydrogels for an effective entrapment of ibuprofen lysinate, protecting it across the gastric transit and promoting the release at intestinal pH. The stabilisation with a polycation such as chitosan, initially did not seem to significantly contribute to the swelling or release characteristics of the matrixes, however, with the modification and optimisation of the method of preparation, matrixes in form of beads highly resistant to the intestinal media have been obtained. The obtained matrixes, release the drug in a slow way and with potential utility for obtaining pharmaceutical dosage forms intended for colonic release of Ibuprofen lysinate and therefore, with possible application in the treatment of inflammatory intestinal disease or the prevention of certain colorectal cancer typologies.

The results make evident, not only the interaction between the studied biopolymers and the influence of their different proportions on the swelling properties of the matrixes and the release profiles of ibuprofen lysinate, but also, how ibuprofen lysinate itself, interacts with the biopolymers, becoming structural part of the matrixes and one additional element for the modulation of their properties, acting as a functional ingredient in the formulation beyond its role as active substance.

The suitability of biopolymers for the encapsulation of ibuprofen lysinate in alginate and mixed alginate-chitosan beads of modified release and pH sensitive, has been demonstrated.

# Índex

	Pàg
<b>PART BIBLIOGRÀFICA</b>	<b>1</b>
<b>1. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS (DRUG DELIVERY SYSTEMS)</b>	<b>3</b>
<b>1.1. Introducció</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Microencapsulació</b>	<b>4</b>
1.2.1. Definicions i terminologia emprada a la microencapsulació	5
1.2.2. Funcions del procés d'encapsulació	7
1.2.3. Mètodes de microencapsulació	9
1.2.3.1. <i>Encapsulació per mètodes químics i fisicoquímics</i>	9
Coacervació	9
Mètode d'incompatibilitat polímer-polímer	10
Mètode de polimerització interfacial	11
Mètode de polimerització <i>in situ</i>	11
1.2.3.2. <i>Encapsulació per mètodes físics</i>	11
Spray drying	11
Liofilització	12
<i>Spray-cooling</i>	12
Emulsió	12
Extrusió	12
1.2.4. Caracterització de microcàpsules	12
<b>2. ELS HIDROGELS</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Introducció</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Arquitectura dels hidrogels</b>	<b>16</b>
2.2.1. Estructures polimèriques-IPNs	17
2.2.1.1. <i>Classificació de les IPNs</i>	17
2.2.1.2. <i>Propietats de les IPNs</i>	18
<b>2.3. Factors que afecten l'inflament dels hidrogels</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Propietats mecàniques dels hidrogels</b>	<b>19</b>
<b>2.5. Perfils i sistemes d'alliberament de fàrmacs a partir d'hidrogels</b>	<b>20</b>
<b>2.6. Mecanismes que controlen l'alliberament de fàrmacs en els hidrogels</b>	<b>21</b>
2.6.1. Sistemes controlats per difusió	21
2.6.1.1. <i>Reservori (sistemes de membrana)</i>	21
2.6.1.2. <i>Matriu (sistemes matricials monolítics)</i>	22
2.6.2. Sistemes controlats químicament	22
2.6.2.1. <i>Sistemes biodegradables i bioerosionables</i>	22
2.6.2.2. <i>Sistemes de cadena penjant</i>	23
2.6.3. Sistemes activats per solvent	23
2.6.3.1. <i>Sistemes controlats osmòticament</i>	23
2.6.3.2. <i>Sistemes controlats per inflament</i>	23



<b>3. POLÍMERS INTEL·LIGENTS (SMART POLYMERS)</b>	<b>25</b>
<b>3.1. Introducció</b>	<b>25</b>
<b>3.2. Polimers sensibles a estímuls externs</b>	<b>28</b>
3.2.1. Polímers sensibles a la temperatura	28
3.2.2. Polímers sensibles al pH	29
3.2.3. Polímers activats per solvents	31
3.2.4. Polímers sensibles als potencials redox	31
3.2.5. Polímers sensibles a la llum	32
3.2.6. Polímers sensibles als camps electromagnètics	32
3.2.7. Polímers sensibles als ions	33
3.2.8. Polímers sensibles als ultrasons	33
3.2.9. Polímers sensibles a la glucosa	33
<b>4. ELS BIOPOLÍMERS</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Introducció</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Els alginats</b>	<b>38</b>
4.2.1. Definició i obtenció	38
4.2.2. Estructura química	40
4.2.3. Propietats químiques i fisicoquímiques	41
4.2.4. Formació de gels	42
4.2.5. Gelificació ionotròpica	44
4.2.6. Sensibilitat al pH	45
4.2.7. Aplicacions biomèdiques i farmacèutiques	46
4.2.8. Obtenció de microesferes d'alginat	46
<b>4.3. Chitosan</b>	<b>47</b>
4.3.1. Definició i obtenció	47
4.3.2. Estructura química	50
4.3.3. Propietats químiques i fisicoquímiques	50
4.3.4. Propietats biològiques	51
4.3.5. Formació de gels de chitosan	51
4.3.6. Aplicacions biomèdiques i farmacèutiques	53
<b>4.4. Aplicacions dels gels mixtes d'alginat i chitosan</b>	<b>55</b>
<b>5. ANTIINFLAMATORIS NO ESTEROÏDALS (AINEs)</b>	<b>57</b>
<b>5.1. Introducció</b>	<b>57</b>
<b>5.2. Mecanisme d'acció</b>	<b>58</b>
<b>5.3. Lisinat d'ibuprofè</b>	<b>61</b>
5.3.1. Característiques generals	62
5.3.2. Estructura química	63
5.3.3. Propietats químiques i fisicoquímiques	63
5.3.4. Aspectes farmacològics i clínics	64
5.3.4.1. <i>Farmacodinàmica</i>	64
5.3.4.2. <i>Farmacocinètica</i>	65
5.3.4.3. <i>Indicacions</i>	66
5.3.4.4. <i>Formes farmacèutiques</i>	66
5.3.4.5. <i>Posologia i forma d'administració</i>	66
5.3.4.6. <i>Avantatges del lisinat d'ibuprofè</i>	67

<b>5.4. Nous horitzons terapèutics pels AINEs</b>	67
5.4.1. Els AINEs en el tractament del càncer	67
5.4.2. Mecanisme d'acció antitumoral dels AINEs	68
5.4.3. Els AINEs i el càncer de còlon	69
5.4.4. L'ibuprofè per la prevenció del càncer de còlon	70
<b>6. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS DE LOCALITZACIÓ ESPECÍFICA</b>	71
<b>6.1. Introducció</b>	71
<b>6.2. Sistemes d'alliberament colònic</b>	71
<b>6.3. Sistemes d'alliberament colònic controlats per pH</b>	72
<b>7. QUALITAT PER DISSENY (QbD), ESPAIS DE DISSENY I DISSENY D'EXPERIMENTS</b>	75
<b>7.1. Introducció</b>	75
<b>7.2. Elements i eines que utilitza la QbD</b>	76
7.2.1. Atributs crítics de qualitat (CQAs)	76
7.2.2. Avaluació i gestió de riscos de qualitat (QRM)	76
7.2.3. Tecnologia Analítica de Procés (PAT)	78
<b>7.3. Disseny d'experiments (DoE)</b>	79
7.3.1. Dissenys factorials	79
7.3.2. Disseny de tractaments	81
<b>PART EXPERIMENTAL</b>	83
<b>1. HIPÒTESI DE TREBALL</b>	85
<b>1.1. Diagrama de flux del treball experimental</b>	88
<b>2. MATERIALS</b>	89
<b>2.1. Substàncies i reactius</b>	91
2.1.1. Lisinat d'ibuprofè	91
2.1.2. Alginat sòdic	91
2.1.3. Clorur de calci dihidrat	92
2.1.4. Chitosan	92
2.1.5. Lisina	93
2.1.6. Àcid acètic	93
2.1.7. Dihidrogen fosfat potàssic	93
2.1.8. Hidrogen fosfat disòdic	93
<b>2.2. Solucions reguladores de pH</b>	94
2.2.1. Solucions utilitzades en els estudis d'inflament i d'alliberament	94
2.2.1.1 <i>Simulació de medi gàstric pH 1,2</i>	94
2.2.1.2 <i>Simulació de medi intestinal pH 6,4</i>	94
2.2.1.3 <i>Simulació de pH intestinal pH 7,4</i>	94
2.2.2. Solució utilitzada en els estudis d'encapsulament	94

<b>3. MÈTODES</b>	95
<b>3.1. Equips i tècniques instrumentals</b>	97
3.1.1. Espectrofotòmetre UV-VIS	97
3.1.2. Microscopi electrònic de rastreig (SEM)	97
3.1.3. Ressonància magnètica nuclear (RMN)	97
3.1.4. Difracció per raigs X	97
3.1.5. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)	98
3.1.6. Equip de dissolució	98
<b>3.2. Altres equips i utilitatge involucrat a la preparació de les granes</b>	98
3.2.1. Balances	98
3.2.2. Micropipetes	98
3.2.3. Bany d'ultrasons	98
3.2.4. pH-metre	98
3.2.5. Agitador magnètic	99
3.2.6. Cistells	99
3.2.7. Software utilitzat	99
3.2.8. Dispositiu d'extrusió	99
<b>3.3. Caracterització dels materials a utilitzar en la preparació de granes</b>	99
<b>3.4. Avaluació i posta apunt del mètode de preparació de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè</b>	100
3.4.1 Preparació de granes d'alginat (placebo)	100
3.4.1.1. Solucions de polímer	100
3.4.1.2. Solucions de clorur de calci	100
3.4.1.3. Preparació bany de gelificació	100
3.4.1.4. Caracterització del procés i les granes obtingudes	101
3.4.2. Granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè encapsulat	101
3.4.2.1 Proves de càrrega	102
3.4.2.2. Temps de coagulació	103
3.4.2.3. Concentració de polímer	103
3.4.2.3. Definició dels límits de l'espai de disseny	103
<b>3.5. Mètode analític per a la determinació del lisinat d'ibuprofè</b>	103
3.5.1. Espectre UV-VIS	103
3.5.2 Descripció del mètode analític	103
3.5.2.1. Preparació de la solució estàndard	104
3.5.2.2. Preparació de la solució problema	104
3.5.3. Validació del mètode espectrofotomètric	104
3.5.3.1. Especificitat	104
3.5.3.2. Linealitat	105
3.5.3.3. Exactitud	105
3.5.3.4. Precisió (repetibilitat)	105
<b>3.6. Caracterització de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè encapsulat i optimització del mètode de preparació</b>	106
3.6.1. Disseny d'experiments (DoE)	106
3.6.2. Determinació de la quantitat de fàrmac encapsulada	108
3.6.3. Determinació de l'eficiència d'encapsulament	108
3.6.4. Anàlisi estadística	109

3.6.5. Efecte del pH del bany de gelificació	109
3.6.6. Característiques d'inflament de les granes	110
3.6.7. Avaluació de l'alliberament estàtic del lisinat d'ibuprofè	111
3.6.8. Avaluació de l'alliberament dinàmic del lisinat d'ibuprofè	111
3.6.8.1. Alliberament sense canvi de pH	111
3.6.8.2. Alliberament amb canvi de pH	111
3.6.9. Estabilitat de les granes	112
3.6.10. Morfologia de les granes obtingudes	112
<b>3.7. Preparació de granes mixtes d'alginat i chitosan amb el mètode de la gelificació ionotròpica mixta</b>	<b>112</b>
3.7.1. Fonament del mètode	112
3.7.2. Mètode de preparació de granes mixtes placebo amb chitosan al 0,5% i 1%	112
3.7.3. Obtenció i caracterització de granes mixtes amb lisinat d'ibuprofè	113
3.7.4. Determinació de l'eficiència d'encapsulament	113
<b>3.8. Granes d'alginat amb recobriment doble de chitosan i d'alginat</b>	<b>114</b>
3.8.1. Procediment de preparació	114
3.8.2. Caracterització de les granes	114
<b>3.9. Granes mixtes d'alginat-chitosan preparades amb prebarreja de polímers</b>	<b>115</b>
3.9.1 Mètode de preparació	115
3.9.1.1. Descripció del mètode de preparació	116
3.9.1.2. Procediment de preparació de les granes	116
3.9.2. Preparació de granes placebo	116
3.9.3. Preparació de granes mixtes amb lisinat d'ibuprofè	116
3.9.4. Preparació de granes de lisina	117
3.9.5. Avaluació del mètode de preparació	117
3.9.6. Grau d'inflament de les granes placebo i de les granes de lisina	117
3.9.7. Cinètica d'alliberament i del grau d'inflament en les granes que contenen lisinat d'ibuprofè	118
<b>4. RESULTATS I DISCUSSIÓ</b>	<b>119</b>
<b>4.1. Caracterització dels materials a utilitzar en la preparació de microesferes</b>	<b>121</b>
4.1.1. Lisinat d'ibuprofè	121
4.1.1.1. Nomenclatura	121
4.1.1.2 Estructura	122
4.1.1.3 Propietats generals	122
4.1.1.4 Identificació i caracterització	122
4.1.2. Alginat de sodi	126
4.1.2.1. Nomenclatura	126
4.1.2.2 Estructura	126
4.1.2.3 Propietats generals	126
4.1.2.4 Identificació i caracterització	127
4.1.3. Chitosan	130
4.1.3.1. Nomenclatura	130
4.1.3.2. Estructura	130
4.1.3.3. Propietats generals	130
4.1.3.4. Identificació i caracterització	131

<b>4.2. Avaluació i posta a punt del mètode de preparació de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè</b>	135
4.2.1. Granes d'alginat (placebo)	135
4.2.2. Granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè	136
4.2.2.1. Proves de càrrega	136
4.2.2.2. Temps de coagulació	137
4.2.2.3. Concentració de polímer	139
<b>4.3. Mètode analític per a la determinació del lisinat d'ibuprofè</b>	143
4.3.1. Validació del mètode espectrofotomètric per a la determinació del lisinat d'ibuprofè en matrius biopolimèriques	143
4.3.1.1. Especificitat	143
4.3.1.2. Linealitat	145
4.3.1.3 Exactitud	148
4.3.1.4. Precisió (Repetibilitat)	149
4.3.1.5. Resultats de validació	151
<b>4.4. Caracterització de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè i optimització del mètode de preparació</b>	153
4.4.1. Fàrmac encapsulat i eficiència d'encapsulament	153
4.4.2. Resultats estadístics	154
4.4.2.1. Càrrega de fàrmac	155
4.4.2.2. Eficiència d'encapsulament	155
4.4.3. Efecte del pH	158
4.4.4. Característiques d'inflament de les granes	159
4.4.5. Alliberament del lisinat d'ibuprofè	161
4.4.5.1. Alliberament estàtic	161
4.4.5.2. Alliberaments dinàmics	162
4.4.5.3. Influència del pH en l'alliberament del lisinat d'ibuprofè	164
4.4.5.4. Alliberament amb canvi de pH	166
4.4.6. Estabilitat de les granes	171
4.4.7. Morfologia	172
<b>4.5. Granes mixtes d'alginat-chitosan</b>	175
4.5.1. Obtenció i caracterització de granes placebo d'alginat-chitosan	175
4.5.1.1 Mida de les granes	176
4.5.2 Obtenció i caracterització de granes mixtes alginat-chitosan amb lisinat d'ibuprofè encapsulat	176
4.5.2.1. Mida de les granes obtingudes	177
4.5.2.2. Granes obtingudes amb Alginat 2% i chitosan 0,5%	177
4.5.2.3. Granes obtingudes amb Alginat 2% i chitosan 1%	179
4.5.3 Granes d'alginat amb doble recobriment de chitosan i d'alginat	183
4.5.3.1. Granes obtingudes amb Alginat 2%, recobriment de chitosan 0,5% i recobriment d'alginat 0,2%	185
4.5.3.2. Granes obtingudes amb Alginat 2%, recobriment de chitosan 1,0 % i recobriment d'alginat 0,2%	186
<b>4.6. Granes mixtes d'alginat-chitosan preparades amb pre-barreja de polímers</b>	191
4.6.1 Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 90:10	192
4.6.1.1. Cinètica d'inflament	193
4.6.1.2. Cinètica d'alliberament	195

4.6.2. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 80:20	196
4.6.2.1. <i>Cinètica d'inflament</i>	196
4.6.2.2. <i>Cinètica d'alliberament</i>	197
4.6.3. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 70:30	198
4.6.3.1. <i>Cinètica d'inflament</i>	198
4.6.3.2. <i>Cinètica d'alliberament</i>	199
4.6.4. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 60:40	200
4.6.4.1. <i>Cinètica d'inflament</i>	200
4.6.4.2. <i>Cinètica d'alliberament</i>	201
4.6.5. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 50:50	202
4.6.5.1. <i>Cinètica d'inflament</i>	202
4.6.5.2. <i>Cinètica d'alliberament</i>	203
4.6.6. Influència de la lisina	209
4.6.7. Físicoquímica del comportament de les matrius polimèriques	210
4.6.7.1 <i>Valor de pKa de les diferents entitats químiques</i>	210
4.6.7.2. <i>Estat d'ionització en funció del pH</i>	210
4.6.7.3. <i>Anàlisi de les corbes d'alliberament. Models matemàtics i mecànica dels hidrogels</i>	213
4.6.7.4. <i>La funció sigmoïdal de Boltzman</i>	218
4.6.8. Alliberament colònic del lisinat d'ibuprofè	222
<b>CONCLUSIONS</b>	225
<b>PUBLICACIONS I COMUNICACIONS</b>	229
<b>REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES</b>	243



## RELACIÓ DE TAULES

**Taula 1:** Paràmetres utilitzats per la caracterització de microcàpsules

**Taula 2 :** Monòmers i polímers que son sensibles al pH

**Taula 3:** Valors de viscositat típica (dinàmica) per solucions de chitosan (1% p/v) en diferents àcids

**Taula 4:** Especificacions de farmacopea pel chitosan

**Taula 5:** Característiques i aplicacions farmacèutiques de l'alginat i el chitosan

**Taula 6:** Classificació dels AINEs

**Taula 7:** Valors de  $Cl_{50}$  del AINEs sobre les diferents isoformes de COX

**Taula 8:** Classificació del defecte segons la repercussió en el sistema i/o usuari. Severitat (S)

**Taula 9:** Classificació de la freqüència. Probabilitat de l'ocurrència del defecte (P)

**Taula 10:** Classificació de la facilitat de detecció del defecte (D)

**Taula 11:** Variables codificades. Descripció i valors

**Taula 12:** Matriu experimental amb codificació dels nivells experimentals per les variables independents

**Taula 13:** Proporcions alginat : chitosan, contingut de les diferents solucions de polímer

**Taula 14:** Resultats d'assajos químics i fisicoquímics realitzats sobre el lisinat d'ibuprofè utilitzat

**Taula 15:** Resultats d'assajos químics i fisicoquímics realitzats sobre l'alginat sòdic utilitzat

**Taula 16:** Resultats d'assajos químics i fisicoquímics realitzats sobre el chitosan utilitzat

**Taula 17:** Influència de la càrrega de fàrmac en la formació de les granes

**Taula 18:** Influència del temps de coagulació en la formació i estabilitat de les granes

**Taula 19:** Capacitat del procediment per a l'obtenció de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè (17% p/v)

**Taula 20:** Resultats obtinguts en l'estudi d'especificitat del mètode

**Taula 21:** Resultats de linealitat i factor de resposta

**Taula 22:** Valors d'Absorbància per a cadascun dels replicats

**Taula 23:** Resultats estudi de l'exactitud

**Taula 24:** Resultats de la precisió del sistema

**Taula 25:** Resultats de la precisió del mètode

**Taula 26:** Resultats de la precisió intermitja

**Taula 27:** Resum dels paràmetres de validació del mètode espectrofotomètric

**Taula 28:** Variables codificades. Descripció i valor

**Taula 29:** Matriu experimental i respostes observades



**Taula 30:** Interacció entre variables

**Taula 31:** Resultats de fàrmac encapsulat i eficiència d'encapsulament

**Taula 32:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps

**Taula 33:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes d'alginat i aplicant el model Ritger-Peppas sobre el 60% d'alliberament en el tram a pH = 6,8

**Taula 34:** Resultats de quantitat de fàrmac a diferents temps d'emmagatzematge a temperatura ambient

**Taula 35:** Variació percentual del contingut de fàrmac respecte el contingut inicial

**Taula 36:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes de nucli mixt

**Taula 37:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes amb doble recobriments

**Taula 38:** Possibles interaccions dels components quan tots es troben solubilitzats en el medi

**Taula 39:** Anàlisi de les corbes d'inflament de les granes que contenen lisinat d'ibuprofè

**Taula 40:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes mixtes preparades amb pre-barreja de polímers a diferents proporcions.

**Taula 41:** Resultats d'encapsulament

**Taula 42:** Equacions obtingudes del tractament per regressió lineal dels resultats de pH 6,8

**Taula 43:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de la corba d'alliberament a pHs intestinals (pH = 6,8 i 7,4)

**Taula 44:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes mixtes d'alginat- chitosan a diferents proporcions i aplicant el model de funció sigmoïdal de Boltzmann

**Taula 45:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes d'alginat i aplicant el model de funció sigmoïdal de Boltzmann

## RELACIÓ DE FIGURES

**Figura 1:** Classificació d'estructures obtingudes per processos de microencapsulació

**Figura 2:** Diagrama de flux del procés d'obtenció d'algins

**Figura 3:** Estructures moleculars dels sucres derivats de l'àcid urònic que componen els algins

**Figura 4:** Blocs homomèrics que componen els algins

**Figura 5:** Gradació de la flexibilitat de les estructures d'alginat en funció de la seva composició

**Figura 6:** Representació dels possibles entrecreuaments entre els ions de calci i les diferents cadenes d'alginat

**Figura 7:** Diagrama de flux del procediment d'obtenció del quitosan

**Figura 8:** Estructura molecular del quitosan

**Figura 9:** Esquema dels derivats de l'àcid araquidònic produïts per acció enzimàtica de les ciclooxigenases

**Figura 10:** Estructura molecular del lisinat d'ibuprofè

**Figura 11:** Esquema preparació granes

**Figura 12:** Esquema y variables en la preparació de les granes

**Figura 13:** Cistell d'acer utilitzat per fer l'avaluació de l'inflament

**Figura 14:** Diagrama preparació granes mixtes alginat-quitosan amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 15:** Diagrama preparació granes d'alginat amb recobriment doble de quitosan i d'alginat

**Figura 16:** Diagrama preparació de granes mixtes preparades amb pre-barreja de polímers

**Figura 17:** Espectre RMN del lisinat d'ibuprofè

**Figura 18:** Difractograma de Raigs X del lisinat d'ibuprofè

**Figura 19:** Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) del lisinat d'ibuprofè

**Figura 20:** Espectre RMN de l'alginat sòdic

**Figura 21:** Difractograma de Raigs X de l'alginat sòdic

**Figura 22:** Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) de l'alginat sòdic

**Figura 23:** Espectre RMN del quitosan

**Figura 24:** Difractograma de Raigs X del quitosan

**Figura 25:** Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) del quitosan

**Figura 26:** Influència del temps d'enduriment en l'alliberament estàtic

**Figura 27:** Percentatges acumulats de la distribució de mides en funció de la concentració de polímer

**Figura 28:** Espectre d'absorció UV-VIS del lisinat d'ibuprofè

**Figura 29:** Espectre d'absorció UV-VIS del lisinat d'ibuprofè, de l'alginat sòdic i del quitosan

**Figura 30:** Recta de regressió lineal (a). Residuals (b)

**Figura 31:** Quantitat de fàrmac encapsulat en funció de les concentracions de polímer i de la concentració de clorur de calci

**Figura 32:** Eficiència d'encapsulament en funció de les concentracions de polímer i de la concentració de clorur de calci

**Figura 33:** Resultats d'inflament de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè obtingudes a diferents pHs

**Figura 34:** Perfil d'alliberament estàtic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat (2%) i CaCl<sub>2</sub> (4%)

**Figura 35:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat obtingudes amb diferents concentracions de polímer

**Figura 36:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat obtingudes amb diferents concentracions de CaCl<sub>2</sub>

**Figura 37:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat i CaCl<sub>2</sub> sotmeses a diferents temps d'enduriment

**Figura 38:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat (2%) i CaCl<sub>2</sub> (4%) a pH gàstric i pH intestinal

**Figura 39:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè amb canvi de pH a partir de granes d'alginat (2%) i CaCl<sub>2</sub> (4%) obtingudes a diferents pHs del medi de gelificació

**Figura 40:** Interaccions electrostàtiques entre cadenes

**Figura 41:** Micrografies (SEM) de granes d'alginat 2% obtingudes amb diferent concentració de CaCl<sub>2</sub>. a) 1% CaCl<sub>2</sub> b) 2% CaCl<sub>2</sub> c) 2% CaCl<sub>2</sub> d) 4% CaCl<sub>2</sub>

**Figura 42:** Micrografies (SEM) de granes d'alginat 2% i CaCl<sub>2</sub> 4% obtingudes a diferent pH a) pH = 6 b) pH = 2

**Figura 43:** Distribució de la mida de granes placebo mixtes d'alginat i chitosan

**Figura 44:** Distribució de la mida de granes amb lisinat d'ibuprofè mixtes d'alginat i chitosan

**Figura 45:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH – chitosan 0,5%

**Figura 46:** Cinètica d'alliberament amb canvi de pH – chitosan 0,5%

**Figura 47:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH – chitosan 1%

**Figura 48:** Cinètica d'alliberament amb canvi de pH – chitosan 1%

**Figura 49:** Esquema d'hipòtesi de comportament de les granes amb doble recobriment chitosan –alginat

**Figura 50:** Diàmetre de les granes amb doble recobriment

**Figura 51:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 0,5 %

**Figura 52:** Cinètica d'alliberament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 0,5 %

**Figura 53:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 1,0 %

**Figura 54:** Cinètica d'alliberament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 1,0 %

**Figura 55:** Distribució de mides de les granes placebo amb les diferents proporcions alginat : chitosan

**Figura 56:** Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 90:10

**Figura 57:** Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 90:10 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 58:** Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 90:10 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 59:** Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 80:20

**Figura 60:** Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 80:20 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 61:** Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 80:20 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 62:** Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 70:30

**Figura 63:** Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 70:30 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 64:** Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 70:30 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 65:** Perfil d'inflament de granes placebo de proporció alginat- chitosan 60:40

**Figura 66:** Perfil d'inflament de granes de proporció alginat- chitosan 60:40 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 67:** Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 60:40 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 68:** Perfil d'inflament de granes placebo de proporció alginat- chitosan 50:50

**Figura 69:** Perfil d'inflament de granes de proporció alginat- chitosan 50:50 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 70:** Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 50:50 amb lisinat d'ibuprofè

**Figura 71:** Valors d'inflament màxim i temps al que s'assoleix en funció de la diferent proporció de polímer

**Figura 72:** Valors d'àrea sota la corba temps-inflament en funció de la concentració de polímer

**Figura 73:** Cinètica d'inflament a pH =1,2 de granes d'alginat-chitosan de proporció 70:30 amb lisina encapsulada

**Figura 74:** Cinètica d'inflament a pH =7,4 de granes d'alginat-chitosan de proporció 70:30 amb lisina encapsulada

**Figura 75:** Estats d'ionització i pKas. Encerclades les formes majoritàries al pH de treball. pH > 5

**Figura 76:** Representació gràfica de la funció sigmoïdal de Boltzmann

**ABREVIACIONS**

AINE: Antiinflamatori no esteroïdeu

AMFE: Anàlisi modal d'errors i efectes

AUC : Àrea sota la corba

Bloc G: Bloc d'àcid manurònic

Bloc M: Bloc d'àcid gulurònic

Bloc MG: Bloc mixt d'àcid manurònic i d'àcid gulurònic

BSA: Albúmina sèrica bovina

COX: Ciclooxygenasa

CQA: Atributs crítics de Qualitat

CV : Coeficient de Variació o desviació estàndard relativa

DDS: Drug Delivery System

DE: Desviació estàndard

DoE: Disseny d'experiments

DSC: Calorimetria Diferencial de Rastreig

EE: Eficiència d'encapsulament

IBU-L: Lisinat d'ibuprofè

ICH: Conferència Internacional d'harmonització

IPN: Xarxa polimèrica interpenetrant

$I_{max}$  : Màxim inflament

LCST: Temperatura crítica inferior de solució

OTC: Over the Counter. Que no requereix prescripció mèdica

PAT: Tecnologia analítica de procés

$P_f$ : Pes final

$P_i$  : Pes inicial

Q: Quantitat de fàrmac o de polímer medicat

QbD: Qualitat per disseny

QRM: Gestió de riscos de qualitat

RMN: Ressonància Magnètica Nuclear

$t_n$  : Temps del darrer punt mesurable

$t_{max}$  : Temps de màxim inflament

$t_{x\%}$  : Temps en el que s'ha alliberat un X% de fàrmac

**PART BIBLIOGRÀFICA**



## 1. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS (*DRUG DELIVERY SYSTEMS*)

### 1.1. Introducció

Podem definir els sistemes d'alliberament de fàrmacs, en anglès *Drug Delivery Systems* (DDS), com aquelles formulacions o dispositius que permeten la introducció de substàncies terapèutiques a l'organisme millorant-ne la seva eficàcia i seguretat mitjançant el control de la velocitat, del moment i del lloc en què es produeix l'alliberament del fàrmac. Aquest procés inclou l'administració del producte terapèutic, l'alliberament dels principis actius continguts, i el posterior transport d'aquests a través de les biomembranes fins el lloc d'acció o diana terapèutica. El terme substància terapèutica inclou també agents com els utilitzats en teràpia gènica que indueixen la producció "*in vivo*" dels agents terapèutics actius (Jain, 2008).

El sistema d'alliberament de fàrmacs és una interfase entre el pacient i el fàrmac. Pot ser una formulació del fàrmac per a ser administrada amb propòsits terapèutics o bé un dispositiu físic utilitzat per l'alliberament del fàrmac.

Si bé aquestes característiques poden ser compartides també pel que anomenem formes farmacèutiques convencionals, és a dir, la millora de l'eficàcia i la seguretat d'un determinat tractament, així com un relatiu control sobre la manera com es produeix el trànsit del fàrmac per l'organisme en el procés d'alliberament, absorció, distribució, metabolisme i excreció (LADME), en el cas dels *sistemes d'alliberament de fàrmacs*, la modulació del procés LADME es produeix de manera parametritzada i programada des de la concepció de la formulació i el seu disseny esdevé un fi en si mateix en aquest tipus de formulacions.

Els sistemes d'alliberament de fàrmacs ofereixen d'entrada una sèrie d'avantatges respecte els sistemes convencionals i tot i no tractar-se d'un concepte nou, el seu estudi dins l'àmbit científic i més concretament dins l'àmbit farmacèutic ha estat en els darrers temps objecte de gran interès, el que es posa de manifest en l'elevat nombre de treballs que actualment es publiquen en aquesta àrea de coneixement.

A banda de les potencials millores terapèutiques que suposa el desenvolupament de sistemes d'alliberament de fàrmacs, existeixen altres elements que fan que aquest sigui un camp d'interès i en constant creixement dins l'àmbit de la tecnologia farmacèutica. D'una banda, la irrupció de nous tipus de teràpies i agents terapèutics, com la immunoteràpia amb anticossos monoclonals, la teràpia gènica o la teràpia cel·lular, han generat la necessitat de dissenyar noves maneres d'administrar aquests agents terapèutics perquè puguin fer la seva funció d'una manera eficient i adequada en els pacients a què es destinen. Per altra banda, les dificultats creixents per trobar noves dianes terapèutiques i per tant, la dificultat de desenvolupar nous fàrmacs que representin una innovació real, juntament amb els elevats costos que suposa avui dia portar un nou fàrmac al mercat, han propiciat l'estudi de fàrmacs ja existents, amb perfils farmacològics i toxicològics perfectament establerts, per a noves aplicacions, per millorar-ne significativament la seva eficàcia i reduir-ne els efectes secundaris. En definitiva, es tracta de donar una nova oportunitat a fàrmacs que ja es troben en el mercat, en base a una concepció diferent de la seva utilització. Aquest procés passa sovint per la utilització d'aquests fàrmacs mitjançant sistemes d'administració innovadors i que superen algunes de les limitacions existents donant com a resultat una major comoditat pel pacient, una millor adherència als tractaments i un millor control de la malaltia a què es destinen i en definitiva creant un nou producte d'interès terapèutic a partir d'un fàrmac ja existent (Irvine i col., 2018).



Entre els avantatges que presenten els sistemes d'alliberament de fàrmacs podem destacar:

- 1.- Eviten l'absorció variable del fàrmac i la fluctuació excessiva dels seus nivells plasmàtics.
- 2.- Eviten la interferència àcida de l'estomac protegint el fàrmac i evitant la seva degradació.
- 3.- Faciliten el trànsit de macromolècules a través de la membrana epitelial del l'intestí prim.
- 4.- Permeten superar limitacions de solubilitat als diferents pHs del tracte digestiu.
- 5.- Permeten evitar l'efecte de primer pas i la inactivació del fàrmac.
- 6.- Actuen com a protectors de l'organisme incrementant la tolerància local i mitigant efectes no desitjats com la irritació gastrointestinal.
- 7.- Facilitació d'arribada al teixit diana per fàrmacs dirigits a un òrgan específic.
- 8.- Permeten millorar l'adherència als tractaments al facilitar l'administració per determinades vies (p.e. la oral) o reduir el nombre d'aplicacions del tractament (p.e. sistemes implantables).
- 9.- Permeten la modulació de l'alliberament del fàrmac en funció de determinats estímuls externs o del propi organisme, com variacions de temperatura, pH, camps electromagnètics i concentració de glucosa en sang entre molts altres.

Els materials i estratègies tecnològiques mitjançant les quals es formulen els sistemes d'alliberament de fàrmacs, són múltiples i diverses i poden anar des de dispositius físics fins a dispositius o composicions de naturalesa físico-química. En aquest sentit, les formulacions galèniques constituïrien un ampli ventall d'estratègies i materials per a la preparació de sistemes d'alliberament de fàrmacs, la descripció i discussió en profunditat de les quals s'escapa de l'àmbit d'aquest treball. No obstant, per la seva naturalesa, importància i utilitat en diferents estratègies d'alliberament de fàrmacs i matrius, destaquen els hidrogels, com a materials o estructures base sobre les quals dissenyar un sistema d'alliberament de fàrmacs i la microencapsulació, com a tècnica específica sobre la que treballar aquests hidrogels en relació amb l'agent terapèutic que han de vehicular.

## 1.2. Microencapsulació

El terme microencapsulació es refereix als processos mitjançant els quals petites gotes o partícules són envoltades o recobertes per una pel·lícula continua d'un material polimèric per a produir càpsules que van des de rangs inferior al micròmetre fins a diversos mil·límetres (Bansode i col., 2010). Simplificant, podem dir que una microcàpsula és una petita esfera amb una paret uniforme que l'envolta. El material intern d'una microcàpsula s'anomena nucli, fase interna o farciment, mentre que la paret exterior s'anomena coberta, recobriment o membrana.

Tot i que el terme *microencapsulació* s'ha utilitzat de manera genèrica per anomenar processos que donen com a resultat petites esferes amb un agent encapsulat dins seu sense precisar molt la mida d'aquestes esferes, la irrupció de les nanotecnologies i amb elles, la producció de càpsules cada cop més petites ha propiciat l'ús del terme *nanoencapsulació* per referir processos d'encapsulació amb els que s'obtenen càpsules de diàmetre inferior a 1µm. El rang de mida a escala micro o nano té importància a nivell de la via d'administració en què es podran utilitzar les càpsules obtingudes, en considerar-se les partícules de diàmetre inferior a 1µm, és a dir dintre de l'escala *nano*, com a aptes per a ser administrades per via intravenosa sense risc d'embolisme ja que els capil·lars més petits de l'organisme tenen un diàmetre de 4 µm (Sheetal i col., 2009).

La microencapsulació, és una tècnica que comprèn diversos processos pel desenvolupament de formulacions que incorporen substàncies sòlides, líquides o gasoses mitjançant una matriu o sistema de recobriment continu que les confina dins d'una estructura o partícula com a medi

de protecció, l'alliberament de les quals es pot veure modificat amb l'objecte d'actuar en llocs i moments predeterminats, i/o durant un període de temps i a una velocitat d'alliberament establerts (Suave i col. 2006).

La microencapsulació, és un mètode abastament utilitzat en aplicacions farmacèutiques per l'alliberament controlat de substàncies bioactives.

Les microcàpsules poden ser tant un sòlid com un pols fluid, o bé estar suspeses en aigua, depenent de les aplicacions i l'estabilitat de la pròpia càpsula i dels ingredients encapsulats. La seva superfície pot ser rugosa o llisa (Bansode i col., 2009). Des d'un punt de vista de la distribució del nucli, la morfologia de les microcàpsules pot ser mononuclear, polinuclear o matricial (Gibbs i col., 1999; Benita, 1996).

### 1.2.1. Definicions i terminologia emprada a la microencapsulació

A la literatura científica trobem diversos termes referits a les partícules resultants dels processos de microencapsulació. Així, es parla de micropartícules, microesferes, microcàpsules o granes (*beads*) que en molts casos s'utilitzen de manera indistinta per a definir conceptes que si bé en un sentit ampli poden ser equivalents, en un sentit més estricte defineixen estructures conceptualment diferents. Alguns investigadors han fet propostes de classificació davant la creixent diversitat de sistemes en els que es pot encapsular un agent. És per aquest motiu que s'ha considerat fer una revisió dels diferents criteris utilitzats a la literatura per definir les partícules resultants dels processos de microencapsulació i unificar-los en una nomenclatura definida que serà la utilitzada en el context d'aquest treball, ja sigui per definir el producte resultant dels diferents experiments o bé per situar-lo en relació altres estructures similars. Entre els diferents tipus de sistemes d'alliberament i microcàpsules existents s'han seleccionat aquells que guarden una relació més propera amb el present treball.

**Microencapsulació** : Procediment tecnològic per incloure una entitat química o biològica dins una partícula de fins a 2 mm de mida màxima en alguns dels seus eixos.

**Micropartícula**: Partícula dins el rang definit com a micro (diàmetre entre 1  $\mu\text{m}$  i 2 mm).

**Microcàpsula**: Càpsula d'entre 1  $\mu\text{m}$  i 2 mm amb un nucli sòlid o líquid i un recobriment extern (Singh i col., 2010). Alguns autors consideren la microcàpsula només dins el rang *micro* és a dir  $\leq 1$  mm, mentre que el que supera aquest diàmetre s'hauria de considerar com a macrocàpsules. Dins l'àmbit d'aquest treball considerem adequat parlar de microcàpsula malgrat en alguns casos es superi aquest lílindar d'1 mm establert per alguns dels autors. Aquest criteri l'apliquem degut a què els processos de microencapsulació sovint no són homogenis en quant al seu resultat i un mateix procés sota diferents condicions, o inclús en un mateix lot, pot originar càpsules amb una dispersió de diàmetres que poden anar des del rang del centenar de micròmetres fins més d'un miler de micròmetres. Considerem, per tant, fer referència a microcàpsules sempre que siguin el resultat d'un procés típic de microencapsulació i no tant per un límit numèric predeterminat.

**Microesfera**: Micropartícula consistent només en el nucli sense recobriment. En un sentit estricte el terme microesfera correspondria a partícules esfèriques buides, no obstant a la pràctica, els termes microcàpsula i microesfera s'utilitzen sovint com a sinònims (Kumar, 2000). Dins l'àmbit d'aquest treball definim les microesferes com a partícules esfèriques que van des de 1  $\mu\text{m}$  fins a 2 mm de diàmetre, formades per una matriu amb o sense principi actiu "encapsulat" i sense recobriment.

**Grana (bead):** El terme 'bead' és utilitzat amb freqüència a la literatura científica sobretot per definir microesferes formades amb biopolímers. No s'ha trobat una traducció de significat exacte en llengua catalana i s'ha optat per traduir-ho com a 'grana' en ser aquesta una terminologia de significat similar al 'bead' anglès. Segons alguns autors, es refereix a una petita partícula esfèrica de mida superior al que es considera escala micro. Si la microesfera es considera fins a 1000 µm, el terme grana (bead) serviria per definir aquelles partícules esfèriques que superen aquest diàmetre (Singh i col., 2010).

Dins l'àmbit d'aquest treball parlem de microesferes i granes com a sinònims en tant que l'escala en que ens mourem inclou esferes de diàmetres entre els 500 µm i els 1700 µm. Alguns autors acoten el terme afegint-hi el prefix micro, així tindriem *microgranes* o *microbeads* per diferenciar les granes que es troben en una escala micro.

**Nanopartícula:** Partícula dins l'escala definida com a nano (diàmetre < 1 µm). Alguns autors parlen també d'escala molecular quan la partícula té dimensions dins l'escala de la molècula que encapsula, seria el cas de les ciclodextrines, nanotúbuls o alguns liposomes.

**Nanocàpsula:** Càpsula dins el rang definit com a nano (diàmetre < 1 µm). Formada per un nucli i una coberta.

**Nanoesfera:** Nanopartícula dins el rang nano consistent només en un nucli sòlid sense recobriment.

**Liposoma:** Nanopartícula esfèrica (vesiculosa) de diàmetre habitualment entre 80 i 300 nm formada per una membrana fosfolipídica.

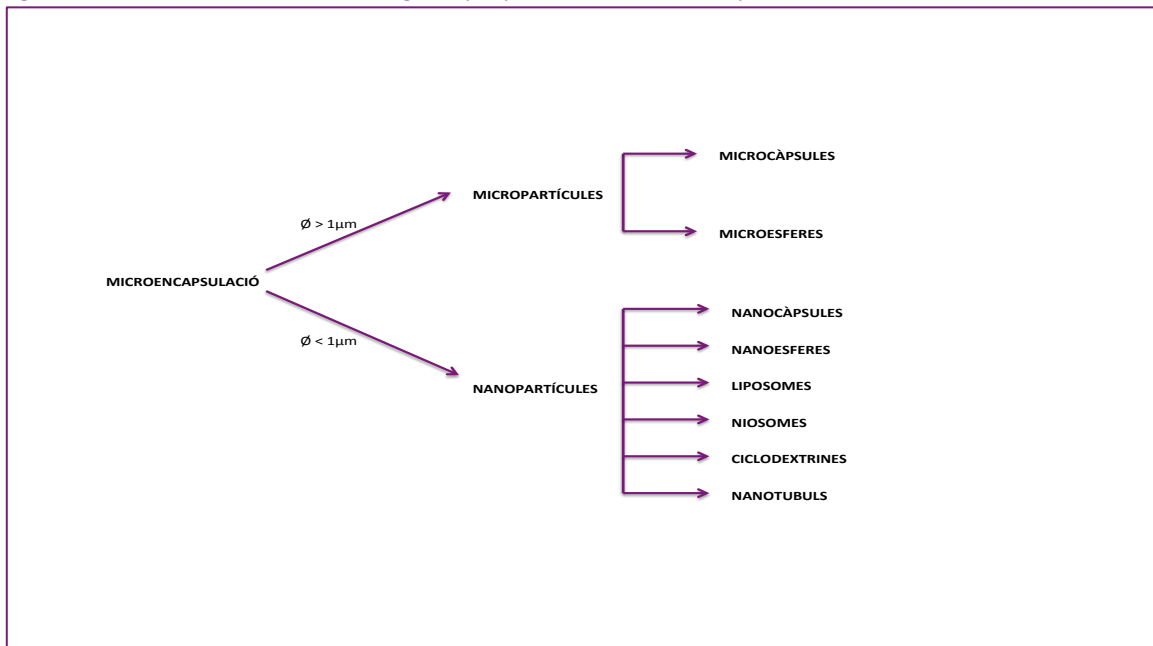
**Niosoma:** Similar a liposoma però les seves membranes estan formades per molècules amfifíliques sintètiques (detergents).

**Dendrimers:** són polímers ramificats amb una estructura de tipus fractal o arborescent

**Nanotúbuls de carboni:** Estructures cilíndriques formades per grafè que poden incorporar molècules al seu interior i transportar-les a l'interior de les cèl·lules a través de diversos mecanismes.

**Ciclodextrines:** Oligosacàrids obtinguts per la degradació enzimàtica del midó i estructura cristal·lina amb forma toroïdal capaços de complexar i per tant encapsular molècules a la seva cavitat interna. Es parla d'encapsulació molecular.

Dins l'àmbit d'aquest treball el terme grana o microesfera s'han utilitzat indistintament per descriure les partícules esfèriques d'alginat obtingudes *in situ* per gelificació ionotròpica amb calci sense cap recobriment extern, mentre que el terme microcàpsula s'ha reservat per definir les microesferes amb nucli d'alginat o nucli mixt d'alginat estabilitzat amb un policatió (chitosan) i a més amb capes de recobriment extern d'aquest nucli.

**Figura 1:** Classificació d'estructures obtingudes per processos de microencapsulació

### 1.2.2. Funcions del procés d'encapsulació

Moltes de les funcions perseguides en un sistema d'alliberament de fàrmacs només es poden assolir si el fàrmac es confina dintre del sistema fins que arriba al seu lloc d'acció a on serà alliberat seguint un determinat patró de temps i velocitat d'alliberament i sovint en funció de paràmetres externs que actuïn com a activadors i/o moduladors de l'alliberament. Una manera efectiva d'assolir aquest confinament és mitjançant processos d'encapsulació.

L'encapsulació esdevé en aquest context una forma de protecció de l'agent bioactiu contingut respecte el medi que l'envolta que pot ser advers i destructiu, mentre que per altra banda ha de permetre que l'intercanvi sigui efectiu, és a dir, que les molècules bioactives passin de fora cap a dins i/o de dins cap a fora de la membrana (Gibbs i col., 1999). Alguns fàrmacs són inestables en el medi o bé poden interaccionar amb altres agents químics coexistents en el mateix o en la pròpia formulació causant efectes no desitjats (Wilson i Shah, 2007). L'encapsulació pot millorar el temps de retenció del fàrmac en el medi i permetre l'alliberament a intervals de temps específics pre-definits.

Les microcàpsules haurien de protegir l'ingredient actiu del medi que l'envolta fins el moment adequat d'acció o l'estímul d'activació. És en aquest moment que el material contingut ha de poder superar la membrana, i això pot succeir mitjançant diversos sistemes que inclouen el trencament de la càpsula, el seu inflament, la seva dissolució, canvis de pH o de temperatura. La microencapsulació obre la porta a un ampli ventall de possibilitats tecnològiques i d'aplicacions en els sistemes d'alliberament de fàrmacs, l'estudi de la seva tècnica d'obtenció així com els materials que les componen, permet el control sobre aspectes i propietats de les mateixes que en determinaran la seva funcionalitat i utilitat en un determinat àmbit. La microencapsulació permet controlar la mida de les càpsules, el que aporta versatilitat, control sobre la resistència mecànica, i control sobre la permeabilitat.

S'han encapsulat una gran varietat d'elements de diversa naturalesa i funcions i que anirien des de saboritzants, colorants, fàrmacs, enzims, bacteries, llevats o cèl·lules.

A continuació s'enumeren algunes de les utilitats de la microencapsulació, tant en formes farmacèutiques convencionals, com també en els sistemes d'alliberament de fàrmacs (Bansode i col, 2009):

- 1.- Millorar les propietats del material encapsulat, emmascarant les característiques organolèptiques que poden resultar desagradables com l'olor, sabor o color.
- 2.- Transformar l'estat físic de les substàncies per millorar la manipulació del producte (manipular líquids com a sòlids o manipulació sense pols).
- 3.- Optimització de les formulacions per modular l'alliberament dels fàrmacs encapsulats.
- 4.- Estabilitzar la substància a encapsular allargant-ne així la seva vida útil evitant la seva degradació davant circumstàncies adverses del medi que l'envolta tant dins la pròpia formulació, com durant el seu trànsit fins el lloc d'acció un cop aquesta és administrada. L'encapsulació intenta evitar reaccions de degradació (hidròlisi, oxidació, fotodegradació..), humitat, interacció amb altres compostos, pH de l'estómac, enzims del tracte gastrointestinal.
- 5.- Reduir o eliminar efectes adversos provocats per algunes substàncies a encapsular i incrementar la seva tolerància general i local (per exemple, reduint la irritació gàstrica provocada pels AINEs).
- 6.- Modular la biodisponibilitat del fàrmac.
- 7.- Impedir la pèrdua de substàncies p.e. reduint la volatilitat o formació de pols.
- 8.- Immobilització de cèl·lules, microorganismes o enzims.
- 9.- Millorar la textura i l'aspecte visual de les formulacions per fer-les més atractives des d'un punt de vista del marketing.
- 10.- Optimitzar les característiques i rendiments en processos productius: Millorar la fluïdesa d'ingredients, evitar la formació de pols durant el procés, pal·liar la higroscopicitat, millorar la solubilitat i evitar les contaminacions creuades.
- 11.- Millorar la compatibilitat entre compostos no compatibles fent que puguin estar junts en una mateixa composició.

### 1.2.3. Mètodes de microencapsulació

Els mètodes existents de microencapsulació són múltiples i diversos, i per a la seva selecció cal tenir en compte aspectes com la naturalesa del material a encapsular, les seves propietats físico-químiques, així com també les característiques de l'agent encapsulant, la finalitat perseguida amb la microencapsulació, la mida i textura de les microcàpsules a obtenir i el mecanisme d'alliberament desitjat pel sistema. La disponibilitat de l'agent encapsulant idoni per un determinat tipus de procés pot resultar una limitació. També s'ha de considerar a l'hora de seleccionar un determinat procediment d'encapsulació, la finalitat del producte, si aquesta és merament experimental i puntual, o bé es persegueix una producció industrial per poder-ne fer una distribució comercial, en aquest cas, caldrà considerar aspectes com la facilitat per l'escalat industrial, el cost tant dels materials com del procés productiu proposat, així com que el procediment produeixi microcàpsules amb una estabilitat adequada i suficientment llarga com per permetre'n la comercialització.

Si bé, tal com s'ha esmentat, els mètodes de microencapsulació són diversos, en general tenen en comú la utilització d'un agent encapsulant sovint en estat líquid, dissolt o fos i d'altra banda un agent a encapsular que pot trobar-se en estat líquid formant gotes, en estat sòlid en forma de petites partícules o fins i tot en forma de gas. El material a encapsular s'ha de disposar en un medi adequat sobre el que s'addiciona el material encapsulant. Al final del procés es produeix una solidificació del sistema originant les microcàpsules (Venktesan et al., 2009).

Els mètodes de preparació de microcàpsules es classifiquen segons la naturalesa del procediment utilitzat, en general es tracta de procediments físics o físico-químics, tot i que també se'n utilitzen de químics com les reaccions de polimerització per produir *in situ* les cobertes de les microcàpsules o una combinació de tots dos (Benita, 1996).

S'han preparat microcàpsules utilitzant una gran varietat de substàncies químiques incloent els polímers naturals o biopolímers (Zuidam i Nedovic, 2010).

#### 1.2.3.1. Encapsulació per mètodes químics i físico-químics

Les microcàpsules produïdes mitjançant procediments químics i físico-químics, s'obtenen en recipients amb líquid sota agitació, i es poden classificar en diferents subgrups segons la tècnica encapsulant utilitzada.

#### Coacervació

La coacervació consisteix en la formació de petites gotes unides per forces hidrofòbiques, riques en polímer, viscoses i solvatades que es diferencien, separant-se de la fase de solvent pobre en polímer.

Existeixen dos mètodes de coacervació, d'una banda la *coacervació simple* que implica un agent de desolvatació per provocar la separació de fases i d'altra banda la *coacervació per complexació* que implica la complexació entre dos polímers de càrrega oposada.

#### Coacervació simple

La coacervació simple és un dels mètodes més antics de microencapsulació i es basa en l'obtenció d'un sistema col·loïdal a partir de dues fases líquides immiscibles, una fase de coacervat, la més concentrada i una fase de solució d'equilibri. La substància a encapsular es

dispersa en el medi i és important que no es dissolgui ni reaccioni amb aquest. La fase amb el coacervat (recobriment) es presenta com una fase dispersa amb petites gotes que acaben unint-se per coalescència formant una pel·lícula continua al voltant de la substància a encapsular.

En el cas dels biopolímers catiónics o aniònics s'utilitzen com a agents de desolvatació modificadors del pH del medi produint la precipitació mitjançant pH àcid quan es tracta de biopolímers aniònics o bé pH alcalí quan es tracta de biopolímers catiónics. Quan la solució de polímer entra en contacte amb el medi formen coacervats que es constitueixen en partícules insolubles en el medi (Nishimura i col., 1986).

#### *Coacervació per complexació*

Aquest mètode, també anomenat gelificació ionotròpica, es basa en la capacitat dels polímers hidrosolubles catiónics i aniònics per interaccionar amb l'aigua i formar una fase líquida rica en polímer (*coacervat*). La separació de fases es produeix quan solucions de dos col·loides es barregen en condicions adequades. El procés transcorre sota agitació continua en un procés global que inclou diversos passos (Jyothi i col., 2010). El primer pas, consisteix en dispersar el material del nucli en la solució aquosa. El pas següent implica l'addició d'un polímer o substància que actuï com a contraió, un polianió o policatió en funció del signe iònic de la substància prèviament dispersada. En aquestes condicions i mantenint un pH òptim perquè els grups funcionals ionitzables es trobin en la seva forma idònia, es forma el complex coacervat.

Els coacervats poden ser endurits fent-los reaccionar amb altres substàncies. Les càpsules obtingudes s'assequen donant lloc a un pols (Benita, 1996).

Les microcàpsules obtingudes mitjançant aquesta tecnologia es troben entre 20 i 800 µm de diàmetre que conté 80-90 % del pes de material del nucli (Gibbs i col., 1999).

#### *Mètode d'incompatibilitat polímer-polímer*

Aquest mètode es basa en la manca d'afinitat de dos polímers incompatibles que es dissolen en un solvent comú però que no es barregen en la solució resultant, per tant, es formen dues fases en el recipient, una rica en un dels polímers i l'altra rica en l'altre polímer. Aquest fenomen pot ser explotat per fer microcàpsules mitjançant l'ús d'un dels polímers incompatibles per actuar com a coberta de la càpsula (Benita, 1996). Aquest procés es duu a terme generalment utilitzant solvents orgànics i s'utilitza per l'encapsulació de sòlids amb un cert grau de solubilitat en aigua. Un exemple d'aquest procediment és la utilització d'una solució d'etil-cel·lulosa en ciclohexà i l'addició de polietilè de baix pes molecular en el sistema. El polietilè, és un polímer soluble en ciclohexà calent i incompatible amb etil-cel·lulosa; això indueix la separació de fases amb la formació d'una fase rica en etil-cel·lulosa i una fase rica en polietilè, llavors el nucli sòlid és dispersat en aquest sistema de dues fases.

L'etil-cel·lulosa, que és més polar que el polietilè, queda adsorbida en la superfície del nucli produint un fi recobriment que és solidificat (Benita, 1996).

Mitjançant aquest procediment s'obtenen càpsules sòlides d'un diàmetre entre 200 i 800 µm que poden ser utilitzades per emascarar sabor o modular l'alliberament de fàrmacs administrats per via oral (Lachman i col., 1986).

### Mètode de polimerització interfacial

La polimerització interfacial consisteix en encapsular diversos materials incloent solucions aquoses així com líquids i sòlids insolubles en aigua, mitjançant la formació de la coberta de la càpsula a la interfase de les gotes o partícules per polimerització de monòmers reactius.

Les reaccions de polimerització que es poden utilitzar per aquesta tècnica són variables. El procés inclou la dissolució d'un monòmer multifuncional en material del nucli líquid, la solució es dispersa amb la mida de gota desitjada dins una fase aquosa que conté l'agent dispersant, llavors es produeix una ràpida reacció de polimerització a la interfase que genera la coberta de la càpsula per addició d'un co-reactiu a la fase aquosa, habitualment una amina multifuncional (Salaün i col., 2011).

### Mètode de polimerització "in situ"

Aquest mètode està relacionat amb la polimerització interfacial, ja que les càpsules es produeixen degut a la polimerització de monòmers afegits al recipient d'encapsulació. No obstant, en la polimerització *in situ*, els agents reactius no s'afegeixen al material del nucli i la polimerització succeeix a la fase contínua, sobre la part de la interfase formada entre el material del nucli dispersat i la pròpia fase contínua. Quan la polimerització comença, es produeix un pre-polímer de baix pes molecular, que incrementa de mida i es diposita a la superfície del material nuclear que ha de ser encapsulat. A mida que la polimerització va produint més unions creuades es genera una coberta sòlida a la microcàpsula.

#### 1.2.3.2. Encapsulació per mètodes físics

Els mètodes físics d'encapsulació són els més estesos i utilitzats per la preparació de microcàpsules i impliquen la utilització de fenòmens mecànics per a produir les microcàpsules amb un contingut determinat en el seu nucli. Els principals medis per a l'obtenció de microcàpsules per mètodes físics són: per força centrífuga, extrusió, co-extrusió, formació d'esprais.

#### 'Spray-drying'

Es tracta d'un dels primers mètodes físics d'encapsulació que generalment s'efectua mitjançant l'emulsió o dispersió del material a encapsular en una solució concentrada (40-60 % p/p) de material de recobriments.

Aquest mètode consisteix en fer passar la solució en forma de petites gotes, d'entre 1 i 3 µm de diàmetre, dins una cambra a la temperatura adient per deshidratar-les de forma ràpida produint les microcàpsules ja assecades que quedaran en forma sòlida al fons de l'equip utilitzat. Una altra manera de produir microcàpsules mitjançant aquest mètode consisteix en atomitzar una mescla líquida a través d'un injector o dispositiu d'atomització cap a un recipient amb aire o gas calent de manera que el solvent s'evapori de manera instantània, originant les microcàpsules que sedimenten al fons del dispositiu (Zuim i Nedovic, 2010; Burgain, 2011).



## Liofilització

S'utilitza aquest mètode quan el material a encapsular és termolàbil, p.e. enzims o determinats microorganismes. En aquest cas es prepara la solució amb el material a encapsular i l'encapsulant, es congela i es procedeix a la sublimació de l'aigua a baixa temperatura aplicant el buit. Algunes substàncies no permeten la congelació i en aquest cas no es podrà dur a terme la liofilització i per tant, l'eliminació de l'aigua a través d'un procés de sublimació, sinó que s'haurà de fer l'evaporació de l'aigua mitjançant aplicació de buit, en aquest cas, aplicant temperatures més elevades, dins d'un rang permès.

### 'Spray-cooling'

Les microcàpsules obtingudes per aquest mètode precisen d'una matriu fosa que conté el producte a encapsular. Es fa passar el líquid de la matriu per un atomitzador que produeix gotes petites sobre un recipient al que s'injecta aire fred de manera que es produeix la solidificació de les partícules que contenen el material encapsulat. Per aplicar aquest mètode les matrius han de tenir un punt de fusió baix.

## Emulsió

La tècnica d'emulsió consisteix en preparar una emulsió on l'encapsulant i l'agent a encapsular es troben formant part de la fase interna dissolts o dispersats en un dissolvent amb solubilitat limitada a la fase externa. Generalment s'utilitzen dissolvents orgànics com el diclorometà. És important la utilització d'un tensioactiu per donar estabilitat a l'emulsió i evitar fenòmens de coalescència o agregació de partícules. El sistema es manté en agitació mentre es procedeix a l'evaporació del solvent orgànic formant-se les microcàpsules insolubles en el medi. Les emulsions poden ser O/W, W/O, W/O/W i O/W/O. La velocitat d'agitació permet modular la mida de les microcàpsules obtingudes (Kailasapathy, 2009).

## Extrusió

Per obtenir microcàpsules mitjançant aquest mètode és necessari disposar del material a encapsular en forma líquida on l'agent bioactiu pot trobar-s'hi dissolt o bé en suspensió. Aquest líquid es fa passar de manera forçada per un tub estret d'un diàmetre adequat al diàmetre de la mida de la microcàpsula que es vol obtenir. El líquid extruït es trenca formant gotes que en introduir-se dins el líquid amb el material de recobriment queden envoltades per aquest, configurant així la coberta externa quan es solidifica un cop evaporat el solvent a on es troba dissolta (Benita, 1996; Zuian i Nedovic, 2010; Vidhyalakshmi i col., 2009; Burgain i col., 2011).

### 1.2.4. Caracterització de microcàpsules

La caracterització de les microcàpsules obtingudes es pot dur a terme des de diferents perspectives, d'una banda la mera caracterització morfològica, recurrent per exemple a tècniques com la microscòpia electrònica per determinar el tipus de superfície i la seva porositat, determinació de la distribució i mida de les partícules així com les seves característiques reològiques.

Per altra banda es fa una caracterització més funcional, que inclou l'avaluació de la capacitat del procés per encapsular el fàrmac, s'avalua per tant la eficiència d'encapsulament i la

quantitat de fàrmac encapsulada, la caracterització del perfil d'alliberament de les substàncies encapsulades i la modulació d'aquest en funció de diferents estímuls o condicions del medi, com canvis de pH, canvis de temperatura, etc... associats també a l'avaluació de canvis estructurals de la membrana com pot ser el grau d'inflament o la contracció d'aquesta (Venkata i col., 2010).

**Taula 1:** Paràmetres utilitzats per la caracterització de microcàpsules

<b>PARÀMETRES A DETERMINAR</b>
Mida mitja de les microcàpsules
Distribució de mides
Morfologia de la superfície
Estructura interna
Concentració de fàrmac
Eficiència d'encapsulament
Perfil d'inflament
Perfil d'alliberament
Estabilitat de les microcàpsules



## 2. ELS HIDROGELS

### 2.1. Introducció

Els hidrogels són estructures tridimensionals en forma de xarxa constituïda per matrius polimèriques, aigua i un agent de reticulació. Per definició, es tracta de xarxes polimèriques amb propietats hidròfiles, el que permet que puguin imbuir aigua a la seva estructura (Peppas i col., 2000). La hidrofília de la xarxa ve donada per les propietats també hidròfiles dels monòmers que componen els polímers, no obstant, es poden utilitzar monòmers lipòfils amb la finalitat de regular les propietats de l'hidrogel per a algunes aplicacions específiques. Els hidrogels poden ser dissenyats per donar lloc a un ampli ventall de permeabilitats (Gehrke i col., 1997) i en conseqüència, han estat des de fa temps utilitzats com a vehicles d'alliberament de fàrmacs pel control i l'extensió de l'acció d'agents terapèutics.

Els hidrogels constitueixen un dels camps de recerca farmacèutica i biomèdica més importants a l'actualitat per les aplicacions potencials que se'n deriven, entre les que destaquen els sistemes d'alliberament de fàrmacs, els apòsits pel tractament de ferides, les lents de contacte, els òrgans bioartificials, els bioreactors, les membranes per biosensors i materials per a pells artificials.

Els hidrogels es caracteritzen per la seva capacitat de retenir elevades quantitats d'aigua a la seva estructura reticular, no es dissolen en el medi aquós i en general són resistent a la temperatura i pHs fisiològics. Els hidrogels presenten compatibilitat termodinàmica amb l'aigua, el que els hi permet inflar-se en el medi aquós. Degut a la seva consistència suau i l'elevat contingut en aigua, els hidrogels són estructures que presenten més similituds amb els teixits naturals que altres materials sintètics (Peppas i col., 2000), el que ha permès encapsular-hi i immobilitzar-hi de forma exitosa enzims i cèl·lules vives per fer bioreactors que actuïn com a òrgans bioartificials.

Per la formació d'un hidrogel és suficient la formació d'una xarxa de polímers entrecreuat d'alguna manera que es produeixi una estructura elàstica. Per tant, qualsevol tècnica capaç de propiciar l'entrecreuament d'un polímer pot ser utilitzada per formar un hidrogel.

Els polímers lineals poden entrecreuar-se per formar hidrogels de diverses maneres:

- 1.- Unint les seves cadenes polimèriques per reaccions químiques.
- 2.- Utilitzant radiació ionitzant per generar radicals lliures que poden recombinar-se com a unions creuades entre cadenes.
- 3.- Mitjançant interaccions físiques de formació cristal·lina, enxarxament o interaccions electrostàtiques com forces de Van der Waals o ponts d'hidrogen.

La naturalesa dels hidrogels pot ser sintètica, natural o mixta en funció de l'origen dels polímers que els componen. L'estructura de la xarxa i la naturalesa termodinàmica dels components d'aquestes xarxes juguen un paper clau en el comportament difusional, canvis de mida de la malla molecular, així com en l'estabilitat molecular dels agents bioactius incorporats (Peppas i col., 2000). Així, els hidrogels són xarxes polimèriques que poden preparar-se a partir de polímers sintètics i/o bé a partir de polímers naturals denominats biopolímers. Els polímers sintètics són generalment de naturalesa hidrofòbica i d'estructura forta quan es comparen amb els biopolímers i la seva resistència mecànica dona com a resultat estructures de

degradació lenta i per tant, més duradores. En canvi les propietats físiques dels hidrogels bipolimèrics són similars a les dels teixits biològics, originant estructures de consistència similar que a banda de poder absorbir elevades quantitats d'aigua, són biocompatibles i biodegradables, el que permet implantar-los sense una extracció quirúrgica posterior.

Un dels atractius dels hidrogels i objecte d'estudi en nombroses investigacions en els darrers anys, és el seu potencial per patir determinats canvis estructurals i de propietats físiques en funció de les condicions del medi on es troben. Això és degut a la propietat que tenen els gels d'experimentar canvis de transició de fase com a resposta a condicions externes com el pH, la força iònica, la presència de determinats ions o biomolècules, la temperatura, la llum, camps elèctrics, etc... La composició polimèrica del gel és la que determinarà la resposta a un o altres estímuls. Aquets gels polimèrics capaços de respondre a determinats estímuls externs es coneixen com a polímers intel·ligents "*smart-polymers*".

Aquest és un camp que encara té recorregut d'exploració des de l'àmbit científic per les nombroses possibilitats que ofereix en la modulació de l'alliberament de fàrmacs en funció de determinats estímuls o canvis fisiològics, però sobretot, pels inconvenients i reptes encara per resoldre a l'hora de donar una aplicació pràctica a aquest tipus de gels com pot ser entre molts d'altres, determinats casos de toxicitat, temps de resposta del polímer excessivament lents, manca de biodegradació i acumulació a l'organisme. Així, a l'actualitat ja s'han desenvolupat gels que podrien ser capaços de modular l'alliberament d'insulina en funció de la presència de glucosa al medi, mimetitzant el que succeiria en una situació fisiològica normal i aportant noves perspectives al control de la glucèmia en pacients diabètics. Altres tipus de gels donen resposta a canvis de llum el que permet controlar l'alliberament d'un fàrmac externament i localment aplicant radiació lluminosa des de l'exterior. El major nombre de desenvolupaments, no obstant, s'han fet per aquells gels capaços de respondre davant estímuls de temperatura i pH. Els gels polimèrics que responen a la temperatura s'han desenvolupat per facilitar l'administració, implantació o arribada a un punt determinat i modular des del lloc d'implantació l'alliberament del fàrmac. De manera general es tracta de sistemes que es troben en forma líquida abans de ser administrats i el gel es forma *in situ* al entrar en contacte amb l'organisme. Actualment s'investiguen composicions per formar gels capaços de donar resposta a petites variacions de temperatura pel tractament antitumoral (Almeida i col., 2012; Steichen i col., 2013).

Els gels polimèrics que responen a canvis de pH, han estat tradicionalment desenvolupats per modular l'alliberament de fàrmacs al llarg del tracte gastrointestinal o bé per protegir el fàrmac davant l'atac d'agents externs del medi, àcids gàstrics, enzims digestius o bé per facilitar l'alliberament a un determinat lloc d'acció, és el cas de tractaments que requereixen l'alliberament colònic (Moo-Huh i col. 2012; Chen i col., 2014).

## 2.2. Arquitectura dels hidrogels

Els hidrogels parteixen d'una estructura polimèrica que ha d'adoptar una forma reticular tridimensional, el que necessàriament implica la imbricació o entrecreuament de les estructures polimèriques, inicialment lineals, mitjançant la utilització d'agents de reticulació que dependran de la pròpia naturalesa del polímer i de les possibilitats que aquest tingui per formar estructures amb altres cadenes, ja sigui del mateix polímer o de polímers o substàncies d'unió diferents. En alguns casos, l'alteració del pH serà suficient per ionitzar fraccions de la cadena polimèrica i propiciar així la unió intercatenària. En altres ocasions, serà necessari l'adició de substàncies que actuïn com a pont d'unió entre les diferents cadenes o polímers diferents que juntament amb els primers formen estructures heteropolimèriques, donant lloc a

polícomplexes constituïts per l'associació no covalent de polímers que tenen afinitat entre ells o bé al que es coneix com a xarxes polimèriques interpenetrants, consistents en estructures on almenys un component és polimeritzat i/o entrellaçat en presència de l'altre.

La idoneïtat d'un hidrogel per ser utilitzat com a sistema d'alliberament de fàrmacs depèn en gran mesura de la seva estructura bàsica. Els paràmetres més importants utilitzats per a caracteritzar l'estructura dels hidrogels és el volum de la fracció de polímer en estat inflat ( $V_{2s}$ ), el pes molecular de la cadena de polímer entre dos punts d'entrecruament ( $M_c$ ) i la corresponent mida de malla ( $\xi$ ).

El volum de la fracció de polímer en estat inflat és una mesura de la quantitat de fluid d'imbibició retinguda per l'hidrogel, el pes molecular entre dos entrecruaments consecutius, siguin físics o químics, és una mesura del grau d'enxarxament del polímer, no obstant aquest valor és sempre aproximat degut al grau d'aleatorietat dels entrecruaments que impedeix el càlcul d'un valor exacte per cadascun d'ells. La distància de correlació que hi ha entre dos entrecruaments ( $\xi$ ) és una mesura de l'espai disponible entre cadenes macromoleculares disponibles per la difusió del fàrmac, aquest valor també s'ha d'expressar com a valor mig. Aquests valors que es troben relacionats els uns amb els altres poden ser calculats de manera teòrica o mitjançant una sèrie de tècniques encaminades a la elucidació de l'estructura dels hidrogels (Caldorera-Moore i Peppas 2009).

### 2.2.1. Estructures polimèriques - Xarxes polimèriques interpenetrants (IPNs)

Les xarxes polimèriques interpenetrants (IPNs) per hidrogels han atret l'atenció de diverses investigacions (Ray i col., 2010). Es tracta d'una combinació d'un mínim de dues cadenes polimèriques en forma de xarxa, de les quals almenys una és sintetitzada i/o entrecruada en la immediata presència de les altres sense cap enllaç covalent entre elles. Les propietats d'imbibició d'aigua de la IPN respon no només a l'arquitectura química de les matrius macromoleculares, sinó també a les condicions que l'envolten com el pH, la temperatura, la força iònica, els camps magnètics, llum ultravioleta entre altres. Aquestes xarxes també s'han anomenat polímers intel·ligents. Algunes de les aplicacions de les IPNs són els implants artificials, membranes de diàlisi i els sistemes d'alliberació de fàrmacs.

Una xarxa polimèrica interpenetrant (IPN), és un polímer que comprèn almenys dues xarxes entrellaçades a escala polimèrica, però no unides covalentment l'una a l'altra. Les dues o més xarxes que constitueixen la IPN es preveu que puguin ser enredades d'una manera que sigui concatenada, però no lligada a l'altra per cap unió química (Shivashankar i Mandal, 2012). En el context del present treball, les xarxes polimèriques interpenetrants es produiran per la interacció de cadenes de polímers de signe iònic contrari, concretament per l'entrecruament de cadenes d'alginat amb cadenes de chitosan.

#### 2.2.1.1. Classificació de les IPNs

Les IPNs es poden classificar en funció del tipus d'unió química o bé de la forma en què s'organitzen les xarxes, és a dir, de la seva estructura.

Des d'un punt de vista del procés químic de formació poden ser seqüencials o simultànies.

### Xarxes polimèriques interpenetrants seqüencials

Es tracta de xarxes formades per la polimerització inicial d'una barreja de monòmer, un agent de reticulació i un iniciador o catalitzador que conformen una primera xarxa bidimensional que és a continuació inflada amb una segona combinació de monòmer i d'agent de reticulació. El resultat final d'aquest procés és una xarxa interpolimèrica interpenetrant. Es a dir, la segona xarxa polimèrica que compona la IPN es polimeritzada un cop s'ha completat la polimerització de la primera xarxa.

### Xarxes polimèriques interpenetrants simultànies

Són xarxes interpenetrants conformades per la polimerització aparellada en un sol pas de dos monòmers diferents i un agent de reticulació. La clau d'aquest procés resideix en què les reaccions de polimerització no interfereixin les unes amb les altres. La polimerització de les dues xarxes que componen la IPN succeeix de forma concomitant.

Des d'un punt de vista de l'estructura de la IPN, aquestes es poden classificar en:

**Xarxes polimèriques interpenetrants totals (IPNs totals):** Dues xarxes juxtaposades entre les que es produeixen nombrosos embolicaments i interaccions.

**Homo- Xarxes polimèriques interpenetrants (Homo-IPNs):** Són un cas particular de les totals i consisteixen en xarxes tridimensionals on els dos polímers que han de formar l'estructura tridimensional són el mateix.

**Semi o pseudo IPNs:** Es tracta d'estructures on un dels components de la xarxa és lineal en comptes de tenir estructura reticular.

**Làtex IPNs:** Estan formades per polimerització per emulsió. La seva morfologia dependrà de com es polimeritzen els seus components.

**IPNs termoplàstiques:** Almenys un dels seus components és un copolímer, són moldejables i poden ser extruïdes.

#### 2.2.1.2 Propietats de les IPNs

- Les IPNs presenten propietats elàstiques i mecàniques incrementades quan es mesura el comportament de tensió-deformació i es comparen els mòduls elàstics i punts de trencament.
- Presenten memòria de forma. Poden ser deformades i fixades a una forma temporal i recuperar la forma original permanent quan s'exposen a estímuls externs (Debdatta i Karger-Kocsis, 2011).
- Les IPNs poden inflarse en un solvent sense ser dissoltes. El contingut d'aigua dels hidrogels s'avalua en termes del pes relatiu del gel inflat i del gel sec.
- Bona permeabilitat a l'oxigen.
- Els sistemes basats en IPNs presenten una major estabilitat de fase del producte final (Lipatov, 2002).

- La incompatibilitat termodinàmica es pot superar mitjançant el bloqueig permanent entre segments de la xarxa.
- Elevada termoestabilitat.
- Bones propietats dielèctriques.
- Permeable als nutrients.
- Claredat òptica (transmitàncies del 90% i índex de refracció de 1,35).

Les IPNs es presenten amb múltiples usos en diverses aplicacions biomèdiques degut a les seves propietats genuïnes de capacitat d'inflament, resistència mecànica, permeabilitat a l'oxigen i nutrients, durada a l'interior del cos i sensibilitat davant determinats estímuls.

### 2.3. Factors que afecten l'inflament dels hidrogels

La proporció d'entrecreuaments, és un dels factors més importants que afecten l'inflament dels hidrogels. Es defineix com la relació entre mols d'agent reticulat i de mols d'unitats de polímer que es repeteixen. Com més elevada és la proporció d'entrecreuaments, major és la quantitat d'agent de reticulació que incorpora el gel. Els hidrogels amb una elevat grau d'entrecreuament presenten una estructura més rígida i per tant una menor capacitat d'inflament quan es comparen amb els mateixos hidrogels amb un grau d'entrecreuament menor. Els entrecreuaments limiten la mobilitat de les cadenes polimèriques, disminuint així el grau d'inflament.

L'estructura química dels hidrogels pot afectar també el seu grau d'inflament. Així, els hidrogels que contenen grups hidròfils s'inflen fins un grau més elevat comparat amb els que contenen grups hidrofòbics. Els grups hidrofòbics es col·lapsen en presència d'aigua, minimitzant així la seva exposició a la molècula d'aigua. Com a resultat, aquests hidrogels s'inflaran molt menys en comparació amb els que contenen grups hidròfils.

L'inflament dels hidrogels es pot veure afectat per diferents estímuls del medi com canvis de temperatura, pH, força iònica. S'anomena a aquests, hidrogels sensibles al medi.

La cinètica d'inflament dels hidrogels pot ser classificada com a controlada per difusió (*diffusion controlled*) (Fickian) i controlada per relaxació (*relaxation controlled*). Quan la difusió d'aigua succeeix dins de l'hidrogel més ràpidament que la relaxació de les cadenes polimèriques, la cinètica és controlada per difusió (Peppas i col., 2000).

### 2.4. Propietats mecàniques dels hidrogels

Les propietats mecàniques dels hidrogels són rellevants per les seves aplicacions farmacèutiques. Per exemple, la integritat dels dispositius o sistemes d'alliberament de fàrmacs durant el temps de vida de l'aplicació és molt important a l'hora d'obtenir autoritzacions de comercialització per part de les autoritats regulatòries, a no ser que el dispositiu sigui biodegradable.



Un sistema d'alliberament de fàrmacs dissenyat per exemple per protegir un agent terapèutic com una proteïna ha de mantenir la seva integritat per ser capaç de protegir la proteïna fins que s'ha alliberat completament del sistema.

Les variacions en el grau d'entrecreuament s'han utilitzat per aconseguir les propietats mecàniques desitjades de l'hidrogel. En la mesura que s'incrementa el grau d'entrecreuament del sistema, aquest dona com a resultat un gel més fort. No obstant, un elevat grau d'entrecreuament crea una estructura més rígida i trencadissa, així doncs hi ha un grau d'entrecreuament que resulta òptim per tal d'aconseguir un gel prou fort però suficientment elàstic. La co-polimerització és una de les estratègies més emprades per dotar de les propietats mecàniques desitjades en un hidrogel, per exemple mitjançant la incorporació d'un comonòmer que contribuirà a les unions per ponts d'hidrogen incrementant així la força del gel.

### 2.5. Perfils i sistemes d'alliberament de fàrmacs a partir d'hidrogels

Els sistemes d'alliberament de fàrmacs basats en hidrogels resulten d'utilitat quan es persegueixen els següents objectius:

- 1.- Concentracions plasmàtiques constants de fàrmac amb fluctuacions mínimes.
- 2.- Alliberament de quantitats de fàrmac reproduïbles i predictibles durant llargs períodes de temps.
- 3.- Protecció d'agents bioactius que tenen una semi-vida curta.
- 4.- Eliminació d'efectes colaterals, evitar la dosificació freqüent i el malbaratament de fàrmac, el que resulta en una teràpia optimitzada i una millor adherència als tractaments.
- 6.- Solució dels problemes d'estabilitat del fàrmac.

Des d'un punt de vista de la manera en què es produeix l'alliberament del fàrmac, els 5 perfils més rellevants que trobem en els sistemes d'alliberament de fàrmacs són els següents (Graham, 1992):

Perfil I : Retard convencional però amb alliberament no constant.

Perfil II: Alliberament constant o d'ordre zero. Els polímers sintètics o bombes alliberen el fàrmac de forma constant de tal manera que la concentració de fàrmac es manté a un nivell d'eficàcia òptima en el torrent sanguini. Aquests són referits sovint com sistemes d'alliberament de fàrmacs d'ordre zero i estan essent comercialitzats per alliberar un nombre de fàrmacs diversos. Els sistemes comercials actuals presenten sistemes d'alliberament amb perfil I o II.

Perfil III : Alliberament substancialment retardat seguit per un alliberament constant del fàrmac. Aquests sistemes són més útils per l'alliberament d'agents actius que comencen en algun moment durant la nit.

Perfil IV: Alliberament retardat seguit de polsos d'alliberament de fàrmac. Permet un alliberament nocturn o l'alliberament d'una hormona que sovint requereixen alliberament pulsàtil en comptes de constant.

Perfil V: Múltiples polsos a períodes especificats.

Els perfils d'ordre zero són els més utilitzats i poden aconseguir-se mitjançant diversos sistemes. Se sap que les concentracions plasmàtiques de fàrmac depenen de la quantitat de fàrmac alliberada del sistema d'alliberament degut a què l'absorció ve determinada per la solubilitat del fàrmac en els teixits i la disponibilitat de flux sanguini local en el teixit. Inclús quan les concentracions plasmàtiques han d'estar raonablement constants, s'observen fluctuacions petites i de curta durada degudes a factors com l'activitat física, l'estrès emocional, l'alimentació o el repòs.

Les vies d'administració de les formulacions basades en hidrogels inclouen la via nasal, oral, parenteral o transdèrmica.

## 2.6. Mecanismes que controlen l'alliberament de fàrmacs en els hidrogels

Els sistemes d'alliberament de fàrmacs es poden classificar en funció del mecanisme que controla l'alliberament (Peppas i Khare, 1993):

### Sistemes controlats per difusió

- Reservori (sistemes de membrana)

- Matriu (sistemes matricials monolítics)

### Sistemes controlats químicament

- Sistemes biodegradables i bioerosionables

- Sistemes de cadena penjant

### Sistemes activats per solvent

- Sistemes controlats osmòticament

- Sistemes controlats per inflamament

### Sistemes d'alliberament modulats

### 2.6.1. Sistemes controlats per difusió

En els sistemes controlats per difusió, l'alliberament de fàrmacs es produeix a través del polímer, aquest, pot patir biodegradació posterior a l'exhauriment del fàrmac. L'exemple més simple d'un sistema de difusió és aquell en què el fàrmac està inclòs en un reservori (nucli) a partir del qual pot difondre. En la mesura que el fàrmac es manté dins del nucli en un estat saturat, l'alliberament que es produeix segueix una cinètica d'ordre zero fins que està a punt d'exhaurir-se. En l'alliberament de fàrmacs s'han utilitzat dos tipus de dispositius controlats per difusió: a) Dispositius de reservori (o dispositius de matriu laminada) i dispositius de matriu (sistemes monolítics).

#### 2.6.1.1. Reservori (sistemes de membrana)

Els sistemes reservori són dispositius amb nucli interior de fàrmac dissolt, dispers, suspès o pur i envoltat per una membrana polimèrica.

En aquests dispositius, el nucli de fàrmac s'encapsula en una membrana polimèrica. La difusió del fàrmac que es produeix a través de la membrana és limitada i així permet controlar la velocitat d'alliberament global. Una concentració saturada del fàrmac dintre el reservori és essencial per a mantenir un gradient constant a través de la membrana. El mecanisme de transport del fàrmac a través de la membrana és habitualment un mecanisme de solució-difusió (Korsmeyer i col., 1983). El transport del fàrmac succeeix en primer lloc per la dissolució d'aquest a una banda de la membrana seguit per la difusió a través d'aquesta i la desorció des de l'altre costat de la mateixa (Gunder i col., 1995).

### 2.6.1.2. Matriu (sistemes matricials monolítics)

En els sistemes matricials, el fàrmac es dissol o bé es dispersa uniformement. Un inconvenient d'aquests sistemes és que presenten una cinètica d'alliberament d'ordre 1 amb un comportament de continua disminució de la porció alliberada (Kormeyer i col., 1983). Això és degut a l'increment de longitud de la via de difusió i la disminució de l'àrea del front de difusió penetrant així que l'alliberament de la matriu es va produint. Un dispositiu matricial (o monòlit) és fàcil de formular i proporciona un elevat grau d'alliberament inicial, major que els dispositius reservori que permeten un alliberament a velocitat gairebé constant. Un dispositiu de solució monolítica conté solució de fàrmac dins del polímer, mentre que una dispersió monolítica conté fàrmac sòlid dispersat en una matriu de polímer que en limita la velocitat.

### 2.6.2. Sistemes controlats químicament

Sistemes biodegradables i bioerosionables  
Sistemes de cadena penjant

En els sistemes d'alliberament de fàrmacs controlats químicament, l'alliberament d'un fàrmac es produeix habitualment en un medi aquós mitjançant un o més dels següents mecanismes:

- 1.- Biodegradació gradual del sistema polimèric que conté el fàrmac.
- 2.- Biodegradació d'enllaços inestables mitjançant els quals, el fàrmac s'uneix al sistema polimèric.
- 3.- Difusió del fàrmac a partir de micropartícules biodegradables injectades.

#### 2.6.2.1 Sistemes biodegradables i bioerosionables

En aquests sistemes, el polímer s'erosiona degut a la presència d'enllaços hidrolitzables o enzimàticament làbils. A mesura que el polímer s'erosiona, el fàrmac s'allibera al medi.

L'erosió pot ser només de la superfície o de tot el sistema. El principal avantatge d'aquests sistemes biodegradables és que en la seva eliminació no cal utilitzar tècniques quirúrgiques. També són avantatges la seva mida reduïda així com el seu baix cost. Tanmateix, tots els productes biodegradables i els seus metabòlits no han de ser tòxics, ni carcinogènics així com tampoc teratogènics. Aquests requeriments no són sempre fàcils de trobar i cal sotmetre els sistemes a un escrutini acurat.

Hi ha diversos treballs publicats en els que es presenten sistemes d'aquest tipus basats en la polimerització d'acrilamida i àcid acrílic (Elvira i col., 2002), Polietilenglicol (Lu i Anseth, 2000), Àcid polilàctic (Choi i col., 2003) o basats en gelatina modificada amb PEG-dialdehid.

### 2.6.2.2. *Sistemes de cadena penjant*

En aquests sistemes, la molècula de fàrmac s'uneix químicament a la cadena polimèrica i s'allibera mitjançant trencament hidrolític o enzimàtic. La velocitat d'alliberament del fàrmac és controlada per la velocitat d'hidròlisi. Aquesta proposta suposa una oportunitat per dirigir el fàrmac cap a un determinat tipus de cèl·lula o teixit diana. Els biopolímers com el quitosan, mido, alginat.. han estat utilitzats com a transportadors de fàrmac en aquests sistemes, així com també polímers i copolímers sintètics. La velocitat d'hidròlisi s'accelera per dissolució. Com a resultat, la cinètica d'alliberament obtinguda pot ser d'ordre zero o en un perfil en forma sigmoïdal. En aquest darrer cas, la fase inicial lenta depèn de la diferència entre la temperatura experimental i la temperatura inferior d'estat crític.

Aquests sistemes s'utilitzen només en polímers sensitius a la temperatura i resulten d'utilitat en tractaments d'oncologia, on els fàrmacs utilitzats sovint són altament tòxics i per tant és desitjable que s'alliberin de manera selectiva al lloc on han d'actuar amb la finalitat de millorar-ne la seva tolerància i evitar els efectes col·laterals derivats de formulacions amb poca especificitat en la forma i lloc d'alliberament.

### 2.6.3. *Sistemes activats per solvent*

Sistemes controlats osmòticament

Sistemes controlats per inflamament

#### 2.6.3.1. *Sistemes controlats osmòticament*

Aquests sistemes permeten l'alliberament dels fàrmacs mitjançant el procés d'osmosi. El seu alliberament no depèn de les característiques fisiològiques del tracte intestinal (Kumar i Gupta, 2009; Gupta i col., 2010).

S'utilitza la pressió osmòtica pel lliurament controlat dels agents actius. En els sistemes d'alliberament osmòtic, l'agent osmòtic proporciona la força motriu per l'alliberament dels fàrmacs (Verma i col., 2002).

L'augment de la pressió dins de la forma de dosificació per la incursió d'aigua fa que el fàrmac s'alliberi del sistema (Gupta i col., 2010).

#### 2.6.3.2. *Sistemes controlats per inflamament*

Quan els hidrogels entren en contacte amb solvents termodinàmicament compatibles, les cadenes polimèriques es relaxen (Shukla i col., 2003). Això passa quan la temperatura de transició de la característica vidre-goma del polímer es troba sota la temperatura dels experiments. L'inflament, és la evidència macroscòpica d'aquesta transició. El fàrmac dissolt difon al medi extern receptor, travessant la capa polimèrica inflada formada al voltant de l'hidrogel. Quan l'hidrogel entra en contacte amb el medi d'alliberament, les molècules d'aigua envaeixen la superfície de l'hidrogel de manera que s'observa un front mòbil que separa clarament la regió cristal·lina de polímer no solvatat davant del front creat per la fase d'hidrogel inflat i elàstic darrere d'ell. Just davant del front, la presència de solvent plastifica el polímer i fa que aquest experimenti una transició de cristall a goma (Davidson i col., 1986).

En aquest punt les possibilitats són:

1) Si la temperatura de transició a cristall del polímer es troba per sota la temperatura experimental, el polímer estarà en estat goma i les cadenes polimèriques tindran una elevada mobilitat que permet major facilitat de penetració del solvent dins de l'hidrogel i subseqüent alliberament del fàrmac contingut dintre del medi d'alliberament (Grinsted i col., 1992). Això resulta clarament en una difusió de Fick (Cas I) caracteritzada per velocitats de difusió del solvent o fàrmac més lentes que la relaxació de la cadena polimèrica.

2) Si la temperatura experimental es troba per sota de la temperatura de transició a cristall, en aquest cas, les cadenes de polímer dels hidrogels no són suficientment mòbils per permetre la immediata penetració del solvent dins del nucli del polímer.

Aquesta darrera situació dóna lloc a un procés de difusió que no segueix la funció de Fick i que inclou el cas II amb una difusió anòmala respectivament, depenent de la velocitat relativa de difusió i de la relaxació de la cadena polimèrica.

Un dels models empírics utilitzats per descriure el transport per sistemes que s'inflen estan basats en la següent expressió (Korsmeyer i col., 1983):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

En aquesta equació  $M_\infty$  és la quantitat total de fàrmac continguda a la matriu polimèrica i  $M_t$  la quantitat alliberada a un temps determinat. El quocient d'aquestes dues variables representa la fracció de massa alliberada de la matriu polimèrica en funció del temps en el context de l'equació. Les constants de l'equació són  $k$  i  $n$ . Mentre  $k$  és una constant de proporcionalitat de l'equació, el valor de  $n$  és depenent de cada tipus de transport, geometria i polidispersitat.

El cas I, defineix processos Fickians, és a dir, on la difusió és lenta comparat amb el grau d'inflament o relaxació del polímer, el que suposa que el factor limitant és la difusió i no la relaxació de les cadenes de polímer. En aquestes condicions es correlaciona amb un valor de  $n = 0,5$ . Per geometries cilíndriques aquesta constant pren valors de 0,45 i per geometries esfèriques de 0,43 (Ritger i Peppas, 1987).

El cas II suposa processos governats per l'inflament o relaxació de la matriu polimèrica. En aquest cas, el component cinètic limitant és el grau d'inflament i per tant, aquesta condició es correlaciona amb un valor de  $n=1$ .

Quan els sistemes adopten valors de  $n$  entre 0,43 i 1 es parla de què el sistema experimenta un transport anòmal indicant que els mecanismes de difusió i d'inflament tenen una contribució proporcionalment similar.

Per aplicar aquest model és crucial fer els ajustaments amb els resultats d'alliberament corresponents al 60% com a màxim ja que a partir d'aquesta quantitat el model ja no es compleix (Ritger i Peppas, 1987).

### 3. POLIMERS INTEL·LIGENTS (*smart polymers*)

#### 3.1. Introducció

S'anomena polímers intel·ligents a aquells polímers o sistemes polimèrics que són capaços de produir una resposta o un canvi marcat en les seves propietats físiques o físico-químiques davant petites variacions del medi en el que es troben i que actuen com a estímul desencadenant de la resposta, també reben el nom de sistemes estímul-resposta. Un cop desapareix l'estímul, els sistemes polimèrics poden tornar a la seva forma i propietats originals. Es tracta doncs d'estructures que no presenten una resposta lineal, i que davant de l'estímul provoquen canvis d'estructura macroscòpics amb respostes ben visibles com a conseqüència del canvi.

La teràpia biològica i farmacològica sovint ha d'afrontar el repte d'haver de resoldre el trànsit de fàrmacs o agents terapèutics de semi-vida molt curta, inclús abans d'arribar al torrent sanguini, en tant que poden destruir-se al mateix tracte intestinal, és el cas de determinades proteïnes com la insulina. La inestabilitat física i química o la manca de biodisponibilitat redueixen el potencial d'ús d'aquests agents terapèutics. La inestabilitat física fa que s'alteri l'estructura de determinades proteïnes provocant processos no desitjats que en malmeten la seva eficàcia com pot ser la seva desnaturalització, la seva precipitació o la seva agregació. En els fàrmacs d'origen químic poden succeir reaccions d'hidròlisi, d'oxidació, de precipitació, d'ionització i racemització, impeding al fàrmac arribar intacte al lloc d'acció.

Durant les darreres dècades s'han desenvolupat membranes que responen a estímuls externs amb la finalitat d'encapsular substàncies que puguin travessar aquestes membranes en funció de quina sigui la condició externa del medi en què es troben (Stuart i col., 2010; Tokarev i Minko, 2010; Esser-kahn i col., 2011; Liu i col., 2015). Aquestes càpsules denominades intel·ligents, es plantegen amb una estructura de tipus cel·lular (Huang i Void, 2013), és a dir amb un espai intern buit o de tipus nuclear i una coberta que respon a estímuls. La part interna d'aquestes càpsules pot produir estructures compartimentades amb un volum intern gran i que són més útils per l'encapsulació de la substància (Wang i col. 2014). Les cobertes, poden tenir diferents dissenys com membranes basades en hidrogels intel·ligents, o bé membranes poroses que utilitzen polímers funcionals en els orificis i que actuarien com a comportes reguladores d'entrada o bé de sortida.

La utilització de materials intel·ligents permet canvis físicoquímics en les propietats de la membrana com a resposta a determinats estímuls, el que dóna com a resultat l'alliberament de les substàncies encapsulades al lloc i en el moment oportú en funció d'un estímul del medi com la temperatura (Shu i col., 2001; Shu i col., 2002; Liu i col., 2010), el pH (Seki i Okahata, 1984; Kono i col., 1993; Liu i col., 2011; Broaders i col., 2011) presència d'ions específics (Shu i col., 2002; Pi i col., 2010; Liu i col., 2011), molècules específiques (Okahata i col., 1986; Itoh i col., 2008; Ochs i col., 2010), la intensitat de la llum (Okahata i col., 1983; Kono i col., 1995; Radt i col., 2004) la concentració de glucosa (Shu i col., 2002; Shu i col., 2004; Manna i Patil, 2010), els camps magnètics (Hu i col., 2008; Yang i col., 2008; Wang i col., 2009) i els camps elèctrics (Ma i col., 2006).

Existeixen nombrosos estímuls importants per l'activitat biològica. La temperatura, per exemple, és un dels paràmetres del cos que pot ser alterat externament en molts casos (Fitzpatrick i col., 2012). Els canvis de temperatura poden activar l'alliberament de fàrmacs. Els valors de pH són diferents en parts de l'organisme i en funció d'estats fisiològics, el cas més paradigmàtic i del que hi ha més estudis és el tracte gastrointestinal a on podem passar de pHs

àcids a l'estómac (pH=2) fins a pHs alcalins a l'intestí (pH=5-8). Aquestes diferències poden utilitzar-se per programar l'alliberament del fàrmac a un determinat pH i en conseqüència a un lloc específic de l'intestí (Schmaljohann, 2006).

Tanmateix, es produeixen canvis subtils entre els diferents teixits. Com a exemple, els fluids intersticials d'alguns tumors o llocs inflamats en humans, tenen un pH que és considerablement més baix que els d'un teixit normal (Qu i col., 2006). Les càpsules que responen a pH poden ser assimilades per les cèl·lules tumorals per mecanismes d'endocitosi i alliberar els fàrmacs per eliminar les cèl·lules anormals.

La concentració d'ió potassi ( $K^+$ ) en el fluid intracel·lular es troba al voltant de  $155 \text{ mmol L}^{-1}$ , mentre que en el fluid extracel·lular, la concentració és només de  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Així, les càpsules dissenyades per respondre a canvis de potassi poden alliberar fàrmacs en resposta als canvis de concentració d'aquest ió (Fang i col., 2015). També hi ha algunes molècules específiques com la glucosa, la concentració de la qual en sang, és un indicador important de diabetis i hipoglucèmia (Kelley i col., 2013; Liu i col., 2015). Sota aquesta concepció, la idea de poder disposar de formes farmacèutiques que continguin insulina i que aquesta pugui ser alliberada en funció dels nivells de glucèmia ha estat objecte d'estudi. Tanmateix, es persegueix poder administrar la insulina de manera efectiva per vies alternatives a la parenteral (Shu, 2005). Amb la creixent irrupció de materials intel·ligents capaços de respondre a determinats estímuls s'obre un ampli ventall pel desenvolupament de càpsules i membranes amb comportament específic davant determinats estímuls del medi (Lendlein i Shastri., 2010; Molina i col., 2015).

En funció de la seva estructura, les cobertes de les membranes poden ser classificades en dos categories principals, d'una banda les cobertes poroses amb polímers que responen a estímuls específics i que actuen com a portes funcionals i per altra banda, les cobertes basades en hidrogels continus a tota la càpsula que responen a estímuls. Aquestes categories han estat proposades per diversos models d'alliberament i ajustament de la velocitat i forma d'alliberament.

### 3.1.1. Membranes poroses amb polímers que responen a estímuls i actuen com a portes funcionals

En comparació amb les càpsules tradicionals amb membranes inalterables, és possible aconseguir permeació controlada de substàncies a través de les membranes de les microcàpsules mitjançant l'adopció de nous materials funcionals. Mitjançant la incorporació física i química de materials intel·ligents a les membranes en forma de porus com a portes funcionals, la funcionalització de les microcàpsules és d'elevat valor per aconseguir sistemes d'alliberament de fàrmacs autoregulats i que responguin a determinats estímuls. Les funcions de porta reguladora, s'aconsegueixen mitjançant transicions de l'inflament i la contracció dels polímers que responen a estímuls i que es troben incorporats als porus de la membrana utilitzant tècniques d'injert (Liu i col., 2015). Els mètodes d'injert es duen a terme mitjançant l'activació dels llocs de polimerització utilitzant tècniques químiques (Wandera i col., 2010), inducció per UV (Deng i col., 2009), tècniques d'inducció de plasma (Shu i col., 2001; Shu i col., 2002).

Així, els monòmers funcionals són polimeritzats per formar polímers que actuen com a portes funcionals dels llocs actius. Alternativament, les cadenes pre-formades de polímer com a portes funcionals poden ser induïdes química o físicament sobre la superfície del porus amb llocs actius pre-tractats mitjançant altres tècniques (Okahata i col., 1986; Liu i col., 2015). Els polímers injertats poden obrir/tancar els porus de membrana en funció dels estímuls del medi extern i aquest model és apropiat per l'alliberament controlat on/off.

### 3.1.2. Membranes contínues basades en hidrogels que responen a estímuls

Els hidrogels polimèrics intel·ligents amb un comportament de fase de transició de volum o de desintegració que respon a estímuls, són abastament utilitzats per la construcció de cobertes contínues per formes d'alliberament controlat (Motornov i col., 2010; Esser-Kahn i col., 2011). Per exemple les càpsules que auto-ajusten la permeabilitat mitjançant canvis d'inflament/contracció reversible a la coberta.

Mitjançant el reconeixement dels estímuls del medi, la membrana de la càpsula produeix un inflament significatiu esdevenint per exemple una membrana més porosa degut al canvi de l'estat contret a l'estat inflat. Com a resultat, la permeabilitat de les substàncies que difonen a través de la xarxa polimèrica que constitueix la membrana de la càpsula incrementa. Quan l'estímul cessa, la permeabilitat autoregulada depèn de si el canvi conformacional de l'hidrogel activat per l'estímul previ és reversible o no per un alliberament del tipus "on/off".

De manera alternativa, quan el material nuclear no es pot comprimir, seria el cas d'un oli i fàrmacs solubles en oli (p.e. paclitaxel), durant el procés de contracció de la membrana és quan es produeix la sortida del producte contingut a la càpsula. La pressió a l'interior de la càpsula incrementa gradualment (Liu i col., 2010). Quan la pressió interna supera el valor crític, es trenca la membrana, alliberant tot el contingut al medi d'una manera immediata. En aquest procés les molècules de fàrmac són alliberades de cop amb la fase oliosa que no només suposa un ràpid alliberament sinó també complert (Liu i col., 2010).

Un altre exemple d'aquest tipus d'alliberament seria la utilització de tècniques que utilitzen l'activació del trencament complert de la coberta d'hidrogel davant determinats estímuls que han mostrat l'alliberació del contingut davant estímuls com la llum, àcid-base i enzims (DeWit i GiKlles, 2009; Esser-kahn i col., 2011; Liu i col., 2011). Aquests comportaments d'autodescomposició són de tipus irreversible i condueixen a un alliberament ràpid del fàrmac. Aquest tipus de membranes poden fabricar-se mitjançant diferents mètodes (Esser-kahn i col., 2011). Moltes càpsules compostes per hidrogels es fabriquen per polimerització dels monòmers a la interfase aigua / orgànica d'emulsions, així com la unió capa a capa dels polielectròlits negatius i positius a la superfície de les partícules.

Les emulsions O/W o W/O es produeixen típicament per diverses tècniques d'emulsificació com l'agitació simple i enèrgica o la sonicació d'un líquid bifàsic (Esser-kahn i col., 2011), tècniques d'emulsificació de membrana (Cheng i col., 2007; Van der Graaf i col., 2005) i tècniques de microfluids (Wang i col., 2014a; Wang i col., 2014b).

La tècnica microfluídica permet la generació i la manipulació de gotes d'emulsió monodispersa, independent del control sobre la seva forma, estructura i composició, el que suposa una plataforma potent per una producció continua, reproduïble i escalable de càpsules polimèriques (Wang i col., 2014b). Tanmateix, les tècniques de microfluids poden generar emulsions complexes amb components interns controlats de manera precisa per una producció també controlada de càpsules monodisperses amb arquitectures internes ben adaptades.



## 3.2. Polímers sensibles a estímuls externs

### 3.2.1. Polímers sensibles a la temperatura

La capacitat de determinats gels d'inflar-se o desinflar-se en funció de la temperatura del medi que els envolta, ha atret l'interès de diverses investigacions en el camp farmacèutic. L'efecte de la temperatura com a element estimulador, desencadenant o regulador per la resposta de sistemes polimèrics apel·lant a la seva relativa fàcil aplicació i implicació en processos per modular l'alliberació de fàrmacs, ha estat objecte de diverses investigacions (Gil i Hudson, 2004). Alguns biopolímers com la metil cel·lulosa o el chitosan han estat estudiats per aquest propòsit, així, derivats metoxi-substituïts de la cel·lulosa han demostrat transicions de solució a estat de gel prop del seu LCST (temperatura crítica inferior de solució) (Ruel-Gariepy, 2004).

Aquests materials resulten especialment atractius per la preparació d'implants, en tant que la seva termoreversible gelificació permet una implantació de preparacions depot sòlides (Klouda i Mikos, 2008). En aquests sistemes, el sistema polimèric líquid que conté el fàrmac s'injecta al lloc d'implantació a temperatura ambient, i així que la temperatura corporal va escalfant la solució injectada aquesta es gelifica atrapant el fàrmac dintre de la matriu formada per la xarxa polimèrica.

La difusió del fàrmac des del gel sòlid permet formulacions d'alliberament sostingut. El chitosan modificat amb PEG (PEG-g-Chitosan) s'ha utilitzat per formular preparats d'aquestes característiques on l'albumina sèrica bovina (BSA) s'ha utilitzat com a model d'alliberament de proteïnes, donant com a resultat preparats capaços de produir un alliberament sostingut de la proteïna de fins a 70 hores aproximadament. Combinant els gels amb *genipina* poden assolir-se alliberaments de BSA de fins a 40 dies (Bhattarai i col., 2005).

Els polímers termosensitius produeixen canvis de la seva solubilitat en funció de petits canvis del medi. La temperatura corporal es mou dins d'uns rangs estrets, un polímer amb sensibilitat a la temperatura es capaç de produir transicions d'estat líquid-gel o sòlid-gel modulant l'alliberament del fàrmac incorporat mentre manté l'activitat biològica i l'estabilitat química de l'agent incorporat.

El mecanisme mitjançant el qual es poden produir aquestes transicions d'estat dependents de la temperatura, en general s'expliquen per la composició de fraccions hidròfiles i lipòfiles de la cadena polimèrica.

Una característica comú dels polímers termosensibles és la presència de grups hidrofòbics com el metil, l'etil o el propil. Els hidrogels sensibles a la temperatura es classifiquen en positius i negatius. Els polímers que componen aquests gels presenten dos paràmetres crítics, la temperatura inferior crítica de la solució i la temperatura superior crítica de la solució. La primera és la temperatura per sobre de la qual el sistema polimèric monofàsic es contrau, esdevé hidrofòbic i insoluble conduint a la separació de fases, mentre que per sota la temperatura inferior el polímer és soluble, s'expansiona i s'infla. Els gels positius tenen temperatura crítica de solució superior i es contrauen a mesura que el sistema es refreda per sota d'aquesta temperatura, en canvi els hidrogels negatius tenen una baixa temperatura crítica de solució i es contrauen a mesura que es van escalfant.

Aquests paràmetres de temperatura crítica de la solució es poden modular amb la composició del gel. S'ha vist que la barreja de petites quantitats de copolímers iònics en el gel fa incrementar la temperatura crítica inferior de la solució.

En aquests polímers, petites modificacions de temperatura provoquen variacions de l'energia lliure que en la relació termodinàmica del sistema resulta en un increment de la entropia en relació amb l'entalpia. Els sistemes de temperatura crítica inferior de solució, són en general preferits als sistemes de temperatura superior degut a problemes d'estabilitat en fàrmacs termolàbils i biomolècules que es poden produir amb aquests darrers.

Segons la resposta de fase a la temperatura, els polímers es subdivideixen en polímers de tipus termoreversibles, negativament termosensibles i positivament termosensibles.

Els principals avantatges dels sistemes polimèrics termosensitius és la seva capacitat per alliberar fàrmacs hidròfils i lipòfils, reducció d'efectes secundaris, alliberament específic al lloc d'acció del fàrmac i propietats d'alliberament perllongat. Tot i aquests avantatges, hi ha aspectes que es busca resoldre amb aquest tipus de polímers com per exemple un elevat alliberament inicial del fàrmac degut a una lenta transició solució – gel, que s'ha intentat solucionar mitjançant l'optimització de la proporció entre segments hidrofílics i hidrofòbics de la cadena polimèrica. Altres aspectes a resoldre són la baixa resistència mecànica dels gels que poden produir un buidat de la dosi, la manca de biocompatibilitat d'alguns d'aquests sistemes polimèrics, i la progressiva davallada del pH del sistema degut a la degradació àcida.

Tot i que els sistemes d'alliberament de fàrmacs basats en sistemes polimèrics termosensibles estan ben caracteritzats i s'ha demostrat la seva utilitat en un ampli ventall d'aplicacions, la majoria de sistemes polimèrics es basen en acrilats, derivats d'àcids acrílic i acrilamida, polímers no degradables hidrolíticament i sovint associats a problemes de neurotoxicitat, el que limita els camps d'aplicació d'aquests sistemes, un dels punts que resulta crític dels usos potencials dels sistemes polimèrics sensibles a estímuls de temperatura.

Existeix una oferta limitada de biopolímers capaços d'originar sistemes termosensibles, tot i així, s'han estudiat els polisacàrids com a possibles candidats i en particular el chitosan. La etosuximida s'ha formulat amb derivats glicerofosfats del chitosan per produir gels injectables amb finalitats de teràpia depot. També aquests derivats del chitosan s'han utilitzat per incorporar cèl·lules mare mesenquimals i desferrioxamina pel tractament de la isquèmia límbica crítica. Aquesta formulació produeix depot *in situ* per l'alliberament sostingut de fàrmacs que proporciona protecció i cohesió de les cèl·lules mare.

### 3.2.2. Polímers sensibles al pH

Els polímers sensibles al pH són aquells que en solució aquosa poden canviar de conformació segons el pH del medi. Aquesta propietat resulta molt interessant donat que en l'organisme hi ha diferències en els valors de pH, especialment en el tracte gastrointestinal on l'estómac té un pH de 2, l'intestí prim de 6,2 a 7,5. També els teixits inflamats tenen valors de pH diferents, així com els tumors on es produeixen valors de pH àcids.

El mecanisme mitjançant el qual funciona aquest tipus de polímer consisteix en la seva capacitat per intercanviar protons amb el medi, o bé acceptant-los, o bé alliberant-los, en funció del pH extern, el que acaba traduint-se en una distribució de càrregues determinada a la cadena polimèrica, produint canvis en la seva estructura molecular i en definitiva en la conformació a que la cadena acaba adoptant per un efecte d'atracció i repulsió segons quedin distribuïdes les càrregues. Es produeix una transició cap a estats expandits mediat per la pressió osmòtica exercida pels contraions neutralitzats per les càrregues de la xarxa.

Són bons candidats per aquest tipus de resposta els polímers amb un elevat nombre de grups ionitzables dins la seva estructura catenària, és a dir els polielectròlits dividits en dues categories, en funció de si accepten o cedeixen protons, polibases i poliàcids respectivament. La naturalesa àcida o bàsica i el pH als quals respondran aquests polímers ve determinada pel seu  $pK_a$  / $pK_b$  dels seus grups ionitzables.

Els gels aniònics són xarxes de polímers amb grups funcionals com l'àcid carboxílic o l'àcid sulfònic (Peppas i col., 2000) que mostren canvis sobtats o graduals en els seu comportament d'inflament dinàmic i d'equilibri com a resultat de variacions externes de pH.

En aquests gels, la ionització succeeix quan el pH del medi es troba per sobre els valors de  $pK_a$  (Katchalsky, 1949; Katchalsky i Michaeli, 1955; Ricka i Tanaka, 1984, Skouri i col. 1995; Yu i col., 1997; Peppas i col., 2000) del grup ionitzable. A mesura que incrementa el pH, també incrementa el nombre de càrregues del sistema, causant la repulsió entre les cadenes de la xarxa polimèrica fent que l'estructura s'expansioni, a la vegada que també incrementa el nombre de grups hidròfils facilitant la captació d'aigua pel sistema i que el grau d'inflament sigui superior.

Contràriament, els polímers que constitueixen els sistemes catiònics, contenen grups funcionals capaços de captar protons com les amines (Katchalsky, 1949 Katchalsky i Michaeli, 1955; Ricka i Tanaka, 1984, Firestone i col., 1988; Siegel i Firestone, 1988; Skouri i col. 1995; Cornejo-Bravo i Siegel 1996; Yu i col., 1997). La ionització d'aquests grups es produeix a mesura que el pH va davallant i es troba per sota del seu valor de  $pK_b$  de les espècies ionitzables. Quan els valors de pH disminueixen, el gel s'ionitza, produint l'efecte de repulsió de càrregues, expansió de l'estructura reticular, hidrofília del sistema i captació d'aigua i inflament d'igual manera com succeeix amb els gels aniònics, però en aquest cas amb la disminució del pH.

### *3.2.2.1. Influència de la força iònica*

El grau d'inflament dels gels polielectrolítics es veu significativament afectada per la força iònica de l'agent inflant (Katchalsky, 1949 Katchalsky i Michaeli, 1955; Ricka i Tanaka, 1984, Firestone i col., 1988; Siegel i Firestone, 1988; Skouri i col. 1995; Cornejo-Bravo i Siegel 1996; Yu i col., 1997). A mesura que incrementa la força iònica del medi, la concentració d'ions dintre del gel també ha d'incrementar per tal de satisfer l'equilibri de Donnan. La força d'inflament es redueix degut a l'increment d'interaccions del contraió i la disminució de les forces d'inflament osmòtic.

Entre els biopolímers sensitius al pH s'hi inclouen el quitosan i els alginats. Com ja ha estat descrit en apartats anteriors el quitosan és un polielectròlit de naturalesa policatiònica que presenta una separació de fase a pHs propers a la neutralitat.

Un dels problemes del quitosan és la seva feblesa estructural que origina gels amb insuficient estabilitat mecànica i que cal incrementar mitjançant la unió a altres molècules o polímers en barreges que formin xarxes polimèriques interpenetrants.

Per la seva banda l'alginat té un pH de transició a pHs àcids, a banda de tenir una naturalesa polianiònica polibàsica.

Mentre que a pHs àcids el chitosan protona els grups amino i esdevé soluble degut a què queda completament ionitzat amb una càrrega neta positiva, l'alginat capta els protons del medi en els seus grups carboxil quedant la forma insoluble no ionitzada.

Aquesta tan diferent resposta de l'alginat i el chitosan al pH, és el que pot fer interessant les xarxes inter-polimèriques formades per aquest dos tipus de biopolímers i la seva utilitzat en formes d'alliberament lloc-específic.

**Taula 2 :** Monòmers i polímers que son sensibles al pH (Moo Huh i col., 2012)

Tipus	Monómer/polímer
<b>Aniònic</b>	Àcid acrílic, àcid metacrílic, àcid propiònic, àcid 2-acrilmido-s-metilpropilsulfònic, àcid 2-metacriloxietilsulfònic, àcid 3-metacriloxi-2-hidroxi-propilsulfònic, àcid etilensulfònic, àcid estirensulfònic, sulfoxietil metacrilat.
	Polímers aniònics de fonts naturals, àcid hialurònic, àcid algínic, carboximetilcel·lulosa, carboximetil dextrà, àcid poliaspàrtic, heparina, etc.
<b>Catiònic</b>	Acrilamida, aminoetil metacrilat, N, N'-dimetilaminometilacrilamida, N, N'-dimetilaminoetil metacrilat, N, N'-dimetilaminopropil metacrilat, N, N'-dietilaminoetil metacrilat, clorur de dialildimetilamoni.
	Polímers catiònics de fonts naturals, polilisina, polihistidina, chitosan, etc.

### 3.2.3. Polímers activats per solvents

L'alliberació del fàrmac es controla per la penetració d'un dissolvent, existint 2 varietats:

- Sistemes controlats per l'inflament
- Sistemes controlats per osmosi

Els sistemes controlats per inflament són els hidrogels i es tracta d'un mecanisme de difusió controlat per l'inflament que es dona en el polímer.

Pel que fa als sistemes controlats per osmosi es produeixen canvis en la pressió que condueixen a l'alliberament del fàrmac.

### 3.2.4. Polímers sensibles als potencials redox

Són polímers que en la seva estructura presenten enllaços làbils susceptibles de patir reaccions de reducció i oxidació.

Destacar els següents polímers:

- Polianhídrids
- Poly (àcid glicòlic/làctic)
- Poly (esters  $\beta$ -amino)

### 3.2.5. Polímers sensibles a la llum

Es tracta de sistemes polimèrics en els que es produeix una transició de fase quan estan exposats a la llum. Els polímers sensibles a la llum són en general biocompatibles i biodegradables, a banda de presentar solubilitat a l'aigua i de tenir una resposta immediata davant l'estímul lluminós, el que els converteix en bons candidats per aplicacions biomèdiques, tot i algunes limitacions encara per resoldre, com respostes incoherents degut a l'alliberament dels cromòfors durant la contracció-inflament del sistema. Aquests sistemes polimèrics poden ser activats mitjançant la irradiació amb una font lluminosa externa de l'organisme on es troben implantats i produir l'alliberament del fàrmac encapsulat en funció d'aquest estímul extern.

Els polímers sensibles a la llum es classifiquen en funció de l'espectre lluminós al qual són capaços de respondre, així poden ser sensibles a la radiació ultravioleta, i sistemes sensibles a la llum visible. Aquests segons són els preferits per la seva disponibilitat, seguretat i facilitat d'ús (Takeda i col., 2004; Klouda i Mikos, 2008; Jones i col., 2008).

Els sistemes polimèrics sensibles a la llum visible es basen en polímers que són termosensibles, de manera que la radiació lluminosa a una determinada longitud d'ona produeix un alliberament d'energia que indueix canvis de transició solució-gel del polímer, fent que aquest s'infla o es contraïgui i modulant així l'alliberament del fàrmac encapsulat. La energia alliberada i per tant els increments de temperatura són directament proporcionals a la concentració de cromòfor present a la formulació. Aquest absorbeix la llum i la dissipa localment en forma d'energia calorífica. Un dels cromòfors utilitzats per aquests sistemes és la sal trisòdica de la clorofil·lina de coure.

S'han proposat també sistemes sensibles a la llum que no utilitzen cromòfors. Aquest s'activen mitjançant radiació infraroja. Els hidrogels són irradiats per llum infraroja làser de CO<sub>2</sub> el que produeix alteracions en el volum de la fase de transició juntament amb la curvatura del gel. Després de la irradiació, el gel torna a la seva posició original.

### 3.2.6. Polímers sensibles als camps electromagnètics

Es tracta de sistemes polimèrics capaços de canviar les seves propietats físiques com a resposta a petits canvis de corrent elèctric.

Els alginats i el chitosan són polímers dels més utilitzats per construir sistemes polimèrics sensibles a estímuls elèctrics degut a la seva naturalesa polielectrolítica. En aquests sistemes, l'estímul elèctric provoca canvis de pH que condueix a la disrupció de les unions per ponts d'hidrogen entre les cadenes polimèriques, causant la degradació o curvatura de la cadena polimèrica que resulta en l'alliberament del fàrmac. Els mecanismes principals implicats en l'alliberament del fàrmac a partir d'un sistema polimèric electroestimulant és la difusió, electroforesi del fàrmac carregat, convecció forçada del fàrmac a l'exterior del gel, juntament amb la sinèresi de l'aigua i alliberament del fàrmac. La curvatura del gel deguda a l'estímul elèctric depèn de diversos factors com la pressió osmòtica, la posició del gel en relació als elèctrodes. Cal tenir present en aquests sistemes, un potencial elèctric suficient per estimular el sistema però a la vegada prou feble com per no estimular les terminacions nervioses dels teixits circumdants.

A banda de biopolímers com l'alginat, el chitosan o l'àcid hialurònic, també s'han utilitzat amb aquest propòsit polímers sintètics com l'àcid metacrílic, l'àcid vinilacrílic, l'alcohol vinílic o l'acrilonitril. També han estat utilitzades barreges de bipolímers i polímers sintètics.

Molts dels polímers sensibles als camps elèctrics són polielectròlits que es deformen sota els efectes d'un camp elèctric degut a l'inflament o desinflament anisotròpic, així que els ions es van movent del càtode cap a l'ànode. El major estrès succeeix a la regió que envolta l'ànode i un estrès inferior és el que es produeix prop del càtode. Aquest gradient d'estrès és el que contribueix a la deformació anisotròpica del gel sota un camp elèctric. (Tanaka i col., 1982; Kwon i col., 1991; Gong i col., 1994; Murdan, 2003; Lee i Tae, 2007).

### 3.2.7. Polímers sensibles als ions

Es defineixen com a polímers que tenen a la seva cadena llocs de reconeixement d'ions, la pressió osmòtica i les repulsions electrostàtiques generades per la complexació, expandeix significativament les xarxes que conformen els gels, produint-se una associació dels ions de les cadenes polimèriques i el seu col·lapse com a conseqüència del seu entrecreuament físic. A banda d'aquests efectes dels gels polimèrics, el reconeixement d'ions es tradueix en canvis de volum, indicant que el disseny supramolecular està relacionat amb el disseny del material.

En funció del tipus iònic que actua sobre el polímer podem trobar estímuls aniònics i estímuls catiònics :

Els compostos macrocíclics com els esters en corona i els *calixarens* han atret força interès com a receptors moleculars, i els polímers que contenen compostos macrocíclics han estat preparats i investigats per la seva aplicació com a materials de separació i extracció específica de metalls. La complexació dels metalls amb els polímers han conduït al disseny de gels polimèrics que responen a grans canvis de volum induïts per la presència d'ions metàl·lics (Pi i col., 2010).

### 3.2.8. Polímers sensibles als ultrasons

Són polímers que responen a l'exposició als ultrasons, de tal manera que els ultrasons produeixen una pertorbació del les cadenes de metil i el posterior alliberament de la insulina (Kashyop i col., 2005).

Altres autors han desenvolupat diferents tipus de polímers que per les seves característiques alliberen la insulina després de la irradiació per ultrasons (Traitel i col., 2008; Miyasaki i col., 1998).

### 3.2.9. Polímers sensibles a la glucosa

Alguns sistemes d'alliberament de fàrmacs precisen de funcions avançades per poder alliberar els fàrmacs d'una manera controlada en base a models *on/off* amb la finalitat d'aconseguir alliberaments eficients amb els mínims efectes adversos (Bawua i col., 2009). Un exemple seria els pacients amb *diabetis mellitus* que precisen d'una aportació sostinguda d'insulina per mimetitzar al màxim el patró fisiològic normal d'alliberament d'insulina amb la finalitat de millorar la qualitat de vida. No obstant, la curta semi-vida plasmàtica de la insulina *in vivo*, la limitada biodisponibilitat oral i la manca de vies d'administració alternatives, fa que a l'actualitat, la insulina requereixi d'injeccions úniques o múltiples al llarg del dia amb la finalitat

d'aconseguir els efectes terapèutics i de regulació de la glucèmia desitjats, el que no deixa de redundar en una sèrie d'inconvenients pel pacient i que pot resultar en un control o compliment insuficient del pacient, especialment en pacients d'edat més avançada que requereixen d'una supervisió per garantir el compliment adequat del tractament (Silva i col., 2006). Una de les maneres amb les que es pot incrementar l'eficiència terapèutica de la insulina, consisteix en encapsular-la en una forma de dosificació sostinguda capaç d'alliberar-la contínuament i amb una velocitat determinada (Silva i col., 2006). No obstant, els sistemes preferits i perseguits actualment en els desenvolupaments de teràpies per la diabetis, són aquells que permeten adaptar el flux d'insulina com a resposta de les concentracions de glucosa en sang, de tal manera que es mantinguin els nivells d'aquesta dintre dels rangs adequats, mimetitzant així la resposta fisiològica.

Per exemple, en alguns sistemes o membranes que responen a la glucosa, quan la concentració de glucosa *in vitro* varia de 0 a 0,2 mol/L, la quantitat d'insulina que s'allibera és 9,4 vegades superior i el coeficient de difusió incrementa de 0,79 cm<sup>2</sup>/s fins a 7,4 cm<sup>2</sup>/s (Chu i col., 2013). Els resultats mostren una interessant permeació a la insulina autoregulada en funció dels nivells de glucosa.

Es tracta doncs, de la utilització de polímers que són capaços de variar la seva resposta en funció de la glucosa present en el medi. La seva utilitat és en el desenvolupament de sistemes pel control de la glucèmia capaços de mimetitzar la secreció d'insulina que es produeix a l'organisme en situació fisiològica. Aquest tipus de sistema polimèric, ha rebut atenció considerable degut al seu ús potencial en el tractament de la diabetis i en la millora i estabilització de la glucèmia que pot suposar, no obstant, perquè aquests sistemes siguin una realitat terapèutica encara han de poder resoldre algunes de les seves principals limitacions com la seva manca de biocompatibilitat i el seu temps de resposta.

El mecanisme d'acció d'aquests sistemes polimèrics està fonamentat en diverses estratègies:

#### 1.- L'oxidació enzimàtica de la glucosa per una glucosa-oxidasa

La glucosa oxidasa, oxida glucosa resultant de la formació d'àcid glucònic i peròxid d'hidrogen. Així, a mesura que la glucosa del medi incrementa, aquesta és convertida en àcid glucònic que causa la reducció del pH i la protonació de fraccions carboxilades facilitant l'alliberament d'insulina. Aquest sistema resulta interessant en tant que mimetitza el patró d'alliberament endogen d'insulina (Takemoto i col., 2010; Yin i col., 2012).

Una manera de preparar microcàpsules que responen a la glucosa consisteix en la utilització de recobriments de poliamida porosa amb cadenes d'àcid poliacrílic i unions covalents d'enzims *glucosa oxidasa* als porus de la membrana que es comporten com a portes de pas funcionals. A pH neutre, en absència de glucosa, els grups carbonil de les cadenes poliacríliques es dissocien quedant amb càrrega negativa, en aquesta disposició els porus a la membrana de la microcàpsula queden tancats degut a les repulsions que es produeixen entre les càrregues negatives i que fan estendre les cadenes poliacríliques. Quan les concentracions de glucosa incrementen, la glucosa oxidasa catalitza l'oxidació de la glucosa a àcid glucònic, disminuint així el pH local, fent que es protonin els grups carboxilat de les cadenes poliacríliques. Com a resultat, les cadenes es contrauen degut a la disminució de la repulsió electrostàtica entre elles i els porus s'obren (Ito i col., 1989; Webber i Anderson, 2015).

## 2.- Sistemes basats en la unió de la *lectina* a la glucosa

Aquests sistemes es preparen sota la base de les propietats úniques de la *lectina* per unir-se als carbohidrats. Les *lectines* són proteïnes multivalents i hi ha nombrosos materials sensitius a la glucosa obtinguts a partir d'aquesta capacitat d'unió a la glucosa. La resposta d'aquests sistemes és específica per la glucosa i la manosa, mentre que davant altres sucres no hi ha resposta. La *Concanavalina A* és una *lectina* que presenta quatre llocs d'unió a la glucosa i que ha estat utilitzada sovint en sistemes d'alliberament d'insulina. En aquests sistemes, les fraccions d'insulina són modificades químicament, introduint un grup funcional (o molècula de glucosa) unida a un transportador o suport a través d'interaccions específiques que només poden ser interrompudes per la mateixa glucosa. El complex insulina-glicosilada-lectina explota la unió competitiva de la *lectina* amb la insulina glicosilada. Les molècules de glucosa lliure causen el desplaçament dels conjugats glicosilats de lectina-insulina bioactius dintre dels teixits circumdants (Sadashiv i col., 2015).

## 3.- Formació d'enllaços covalents reversibles amb fraccions d'àcid fenilborònic.

Aquest sistema es basa en la utilització de polímers amb grups fenilborònic i polímers poliòlics que formen un gel a través de la formació de complexos entre grups fenilborònic i hidroxil penjants. En comptes de polímers poliòlics, s'han utilitzat molècules curtes com la diglucosilhexadiamina. A mesura que la concentració de glucosa incrementa, la densitat d'entrecreuaments del gel disminueix donant com a resultat l'alliberament d'insulina. La reacció d'intercanvi de glucosa és reversible i es produeix una reforma del gel com a resultat de la unió amb el poliòl. La principal limitació d'aquest sistema és la baixa especificitat dels polímers.

Aquest tipus de sistema polimèric es classifica dintre del que són els polímers sensibles a estímuls biològics.

Així doncs, els sistemes d'alliberació de fàrmacs autoregulats que tenen la capacitat d'adaptar la quantitat d'insulina que s'allibera com a resposta als canvis de concentració de glucosa i amb la finalitat de mantenir els nivells de glucosa dintre del rang fisiològic són els preferits per la teràpia de la diabetis.





## 4.- ELS BIOPOLÍMERS

### 4.1. Introducció

Els biopolímers són un tipus de substàncies químiques d'origen natural caracteritzades per tenir unitats estructurals repetitives i una estesa distribució a la natura. El creixent interès per aquest compostos ha originat un elevat nombre de treballs científics, no només pel seu baix cost, biocompatibilitat, biodegradabilitat i fàcil disponibilitat, sinó també per la seva potencial utilitat en l'obtenció de sistemes d'alliberament de fàrmacs.

Els progressos en els sistemes moderns d'alliberament de fàrmacs tenen la seva base en l'ús de matrius polimèriques per obtenir un alliberament d'entitats terapèutiques dins un marc espai-temporal tant en sistemes de dosificació múltiple com en sistemes implantables de dosi única. Si bé s'han produït avenços importants en el camp dels sistemes d'alliberament de fàrmacs convencionals, la irrupció dins l'escenari terapèutic de noves estratègies, així com teràpies biològiques potents i específiques, han provocat la necessitat de dissenyar i desenvolupar nous sistemes d'alliberament de fàrmacs adaptats a aquestes noves necessitats. Per les seves característiques, els biopolímers s'erigeixen com un grup d'excipients amb bones perspectives de cara a la participació d'aquestes estratègies en els nous sistemes d'alliberament de fàrmacs.

Diversos polímers naturals han estat estudiats com a materials polimèrics per ser utilitzats en sistemes d'alliberació de fàrmacs, no obstant, per poder ser considerats candidats apropiats per l'alliberament de fàrmacs s'han de complir diversos requisits, entre els que cal destacar una bona biocompatibilitat i que de la seva degradació no se'n derivin productes tòxics o immunogènics, una estabilitat adequada en el temps i durant el processat necessari per la preparació de les formulacions, són també indispensables.

Entre els polímers naturals més estudiats destaquen la cel·lulosa i els seus derivats (Kamel i col., 2008), el chitosan (Singh i col., 2010), l'alginat, l'albumina, la gelatina,  $\kappa$ -carragenina, el glucomanà, àcid pectínic, el midó, alguns derivats del midó com les ciclodextrines i els polilàctics (Jalil i Nixon 1990), l'àcid hialurònic, escleroglucà, el *pullulan*, *gellan*, tots ells es troben fàcilment a la natura i representen una classe important de biopolímers susceptibles de ser emprats per la immobilització tant d'entitats químiques com biològiques, el que permet la seva utilització en un nombre important d'aplicacions en el camp biomèdic incloent preparació de bioreactors o d'òrgans bioartificials.

Algunes de les característiques inherents o derivades dels biopolímers i que poden afectar la seva biocompatibilitat, biodegradació, encapsulació del fàrmac i alliberament, així com el processat durant la formulació, inclouen l'estructura cristal·lina, l'estructura química, el pes molecular, la solubilitat, el coeficient de repartiment, la capacitat d'absorció d'aigua, els mecanismes de degradació i erosió. Les interaccions, afinitat i influència del fàrmac pel material polimèric juga un paper important en la formulació del sistema d'alliberament de fàrmacs i en la seva funcionalitat.

Thomes i Kleinenbude (2006) han utilitzat la K-carragenina per formular pellets amb un alliberament ràpid, així la utilització d'aquest polímer resulta útil en formulacions que contenen fàrmacs de baixa solubilitat.

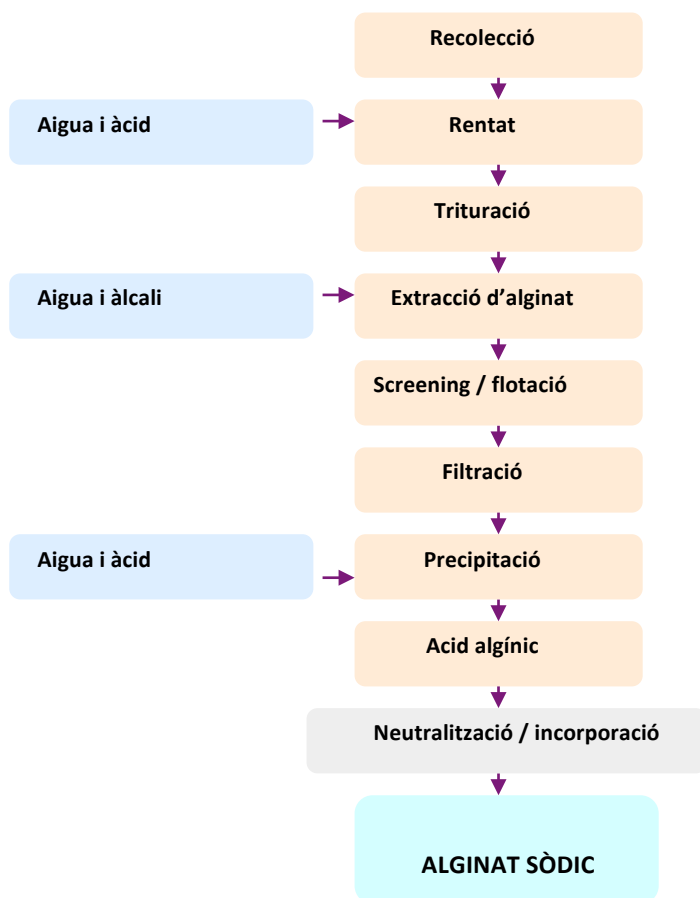
## 4.2. Els Alginats

### 4.2.1. Definició i obtenció

L'alginat sòdic és un dels polímers particularment atractius amb un espectre ampli d'aplicacions en el camp biomèdic. L'alginat és un copolímer lineal no ramificat de naturalesa polisacàrida compost per unitats d'àcid  $\beta$ -D- manurònic (Bloc -M) i d'àcid  $\alpha$ -L-gulurònic (Bloc-G), que es poden trobar en composició i seqüències variades. La composició i seqüència dels blocs així com el pes molecular dels alginats són importants en tant que aquests factors determinen les propietats físiques dels gels formats a partir de l'alginat i per tant les aplicacions específiques a què es poden destinar.

Els alginats es troben a la natura principalment en forma de sals càlciques, magnèsiques i sòdiques, no obstant, del processat del material natural en resulta àcid algínic a partir del qual se'n obté la seva sal sòdica (alginat sòdic) que és un polímer hidrosoluble. Si bé, l'àcid algínic pot ser obtingut a partir de microorganismes dels gèneres *Azobacter* i *Pseudomonas*, (Sengha i col., 1989; Clementi i col., 1999) la seva obtenció comercial més important procedeix de l'extracció primària d'algues marines de la família dels feòfits (algues brunes) com la *Laminaria hiperborea*, *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis piriferea*, *Laminaria japonica*, *Laminaria digitata*, *Escklonia maxima*, *Lesonia nigrescens*, *Durvillaea antarctica* i *Sargassum spp.*, (Gombotz i Wee, 1998).

Figura 2: Diagrama de flux del procés d'obtenció d'alginats



Com a productes d'origen natural, els alginats presenten variabilitat molecular (variabilitat en la proporció i distribució de blocs-G i de blocs-M) en funció de la font de l'espècie d'on s'obtenen, el teixit d'una mateixa planta del qual s'extreuen i també l'època en què s'efectua la recol·lecció (Sengha i col., 1989; Clementi i col., 1999). A les algues, els alginats hi fan una funció esquelètica, conferint més o menys flexibilitat i resistència als teixits on es troben, així els teixits més nous i les parts toves tenen un contingut més elevat de blocs-M, igual que les fulles, mentre que les estructures més antigues són més riques en blocs-G (Sengha i col., 1989; Clementi i col., 1999).

Una de les propietats que fan l'alginat útil en aplicacions biomèdiques és la seva capacitat per formar gels molt estables mitjançant processos de gelificació ionotròpica consistents en bescanvi dels ions sodi (en el cas de l'alginat sòdic) dels blocs-G per cations divalents com  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , que es dipositen en cavitats electronegatives, unint els blocs-G per formar una estructura tridimensional en forma "d'ouera" coneguda a la literatura científica com a (egg-box model), obtenint una membrana gruixuda però permeable a les molècules petites i els líquids. Aquesta propietat és la base de diferents aplicacions potencials, tals com sistemes d'alliberació de fàrmacs, preparació de bioreactors per teràpia cel·lular, òrgans bioartificials, immobilització de cèl·lules, immobilització d'enzims i immobilització de proteïnes.

L'ús d'alginats com a sistemes implantables permet, a banda de la seva biocompatibilitat i manca d'immunogenicitat per l'organisme receptor, actuar també com a immunoaïllant d'aquells elements immobilitzats i que podrien causar una reacció de rebuig per part de l'organisme receptor. D'altra banda la seva permeabilitat a macromolècules i als nutrients permet un intercanvi amb el medi de dintre cap a fora per alliberar elements generats a l'interior de la matriu d'alginat així com un flux de fora cap a dins permetent l'entrada dels nutrients i altres molècules que poden interaccionar i reaccionar amb el contingut de les matrius, esdevenint d'aquesta manera elements implantables que acaben actuant com a vertaders òrgans o glàndules i que acaben alliberant al medi aquells principis que produeixen.

El cas més paradigmàtic i en el que s'han dipositat més expectatives i que ha motivat un nombre molt elevat d'estudis és la creació de pàncrees artificials, amb la immobilització de cèl·lules de Langerhans productores d'insulina, no obstant, altres possibilitats com la immobilització d'hibridomes per la secreció de determinats anticossos monoclonals també ha estat objecte d'alguns estudis experimentals.

D'altra banda, la gelificació ionotròpica de les molècules d'alginat es presenta com un procés flexible i fàcilment controlable per la manipulació de les característiques de les matrius obtingudes i que resulten fonamentals pel control de la forma i velocitat d'alliberament dels fàrmacs. A banda, els gels d'alginat formats tenen propietats d'inflament sensibles al pH, especialment interessants per fàrmacs sensibles al medi àcid per tal d'evitar l'atac dels àcids gàstrics o bé quan es vol controlar el lloc d'alliberament.

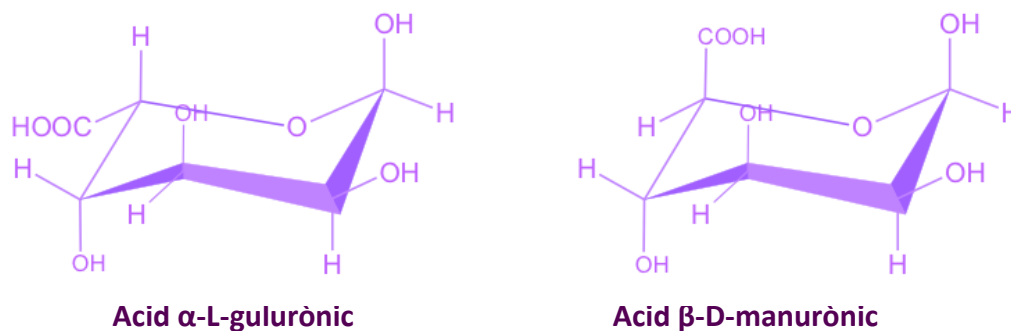
Les propietats dels gels d'alginat poden modificar-se també si es fan reaccionar amb altres biopolímers, resultant en xarxes interpolimèriques més complexes i de propietats diferents. Un dels biopolímers utilitzat en les unions amb l'alginat és el quitosan, obtingut a partir de la quitina de la closca dels crustacis.

Al marge de la seva capacitat per formar gels, els alginats es situen entre els més versàtils dels hidrocol·loids, utilitzats des de fa dècades com a excipients funcionals amb un ampli ventall d'aplicacions en formulacions farmacèutiques, com a estabilitzants, viscositzants, agent suspensor, aglutinant i desintegrant en comprimits (Handbook of pharmaceutical excipients 8<sup>th</sup> Ed, 2017).

## 4.2.2. Estructura química

Els alginats són polímers constituïts per blocs formats a partir de monòmers de sucres derivats de l'àcid urònic, les sals de l'àcid  $\alpha$ -L-gulurònic i  $\beta$ -D-manurònic. Durant l'extracció dels alginats, els àcids urònics són convertits a la forma salina guluronat i mitjançant un pas de neutralització. La sal sòdica, alginat sòdic, és una de les que té més presència comercial i la més utilitzada per aplicacions farmacèutiques.

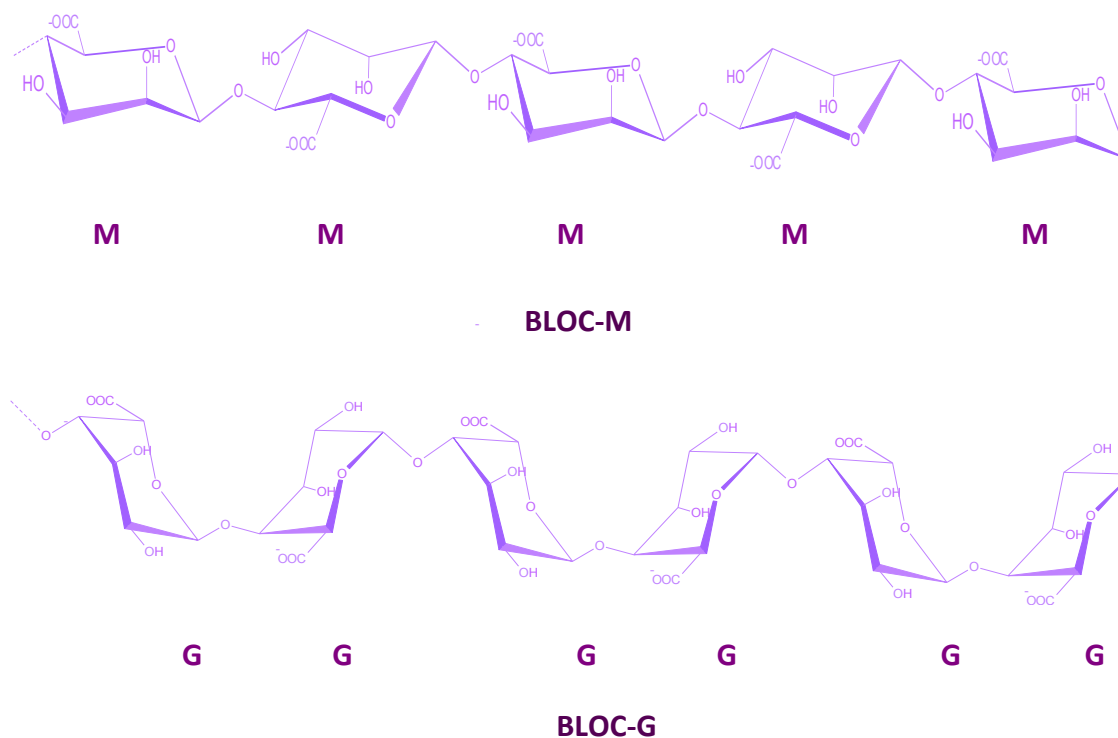
**Figura 3:** Estructures moleculars dels sucres derivats de l'àcid urònic que componen els alginats



*Alginat sòdic* CAS [9005-38-3]

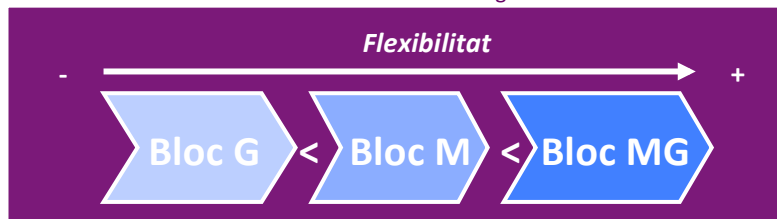
L'alginat sòdic és un copolímer lineal no ramificat constituït per unitats monomèriques de  $\beta$ -D-manuronat (M) i  $\alpha$ -L-guluronat (G). Aquestes unitats es troben distribuïdes en llargues regions homomèriques que anomenem blocs. Els blocs poden estar formats per monòmers G (blocs-G) o per monòmers M (blocs-M). Les regions homomèriques es troben separades per regions d'estructures alternants (blocs-MG). La proporció, longitud i distribució d'aquests blocs determina les propietats físiques i químiques de l'alginat.

**Figura 4:** Blocs homomèrics que componen els alginats



Els blocs G proporcionen capacitat formadora de gel, el blocs M i els alternants MG aporten flexibilitat.

**Figura 5:** Gradació de la flexibilitat de les estructures d'alginat en funció de la seva composició



#### 4.2.3. Propietats químiques i fisicoquímiques

Les solucions d'alginat tenen un pH proper a la neutralitat ( $\text{pH} \approx 7,2$  solució 1% p/v). Es tracta d'una substància que es solubilitza en aigua de manera lenta originant una solució col·loïdal viscosa. En solucions aquoses àcides ( $\text{pH} < 3$ ) l'alginat és pràcticament insoluble degut a la formació d'àcid alginic. No és soluble en dissolvents orgànics com l'etanol, l'èter o el cloroform.

Per a moltes aplicacions dels alginats, el pes molecular és un paràmetre important que determina la funcionalitat de l'alginat per a una aplicació específica. Les solucions aquoses d'alginat són viscoses i aquesta viscositat de la solució depèn del pes molecular de l'alginat utilitzat, de la concentració d'alginat, de la temperatura i potencialment també de la presència de sals i altres components de la formulació. La determinació de la viscositat és utilitzada sovint com un paràmetre simple, mesurable dels canvis de pes molecular del polímer i per tant, pot ser utilitzada com un indicador d'estabilitat.

La despolimerització dels alginats succeeix en solució i en estat sòlid degut a una varietat de mecanismes. Smidsrødt i cols. 1963 van observar que la presència d'oxigen afectava l'estabilitat dels alginats no purificats quan estaven en solució degut a la presència de substàncies fenòliques reductores que produïen despolimerització red-ox causada per radicals lliures. D'altra banda Holme i cols. (2003 i 2008), han demostrat que els alginats purificats en estat sòlid i en solució, pateixen despolimerització primària principalment per mecanismes d'hidròlisi catalitzada per àcids i àlcalis. L'estabilitat més elevada es va observar dins un interval de pHs entre 5 i 8.

L'increment de temperatura, augmenta la velocitat de despolimerització per tots els mecanismes mencionats (Holme i cols., 2003 i 2008). Les dades *in vivo* sobre cinètica i mecanismes de despolimerització dels alginats és escassa. Els mamífers no tenen enzims que siguin actius sobre els alginats, no obstant, inclús en mamífers es pot esperar mecanismes de despolimerització aleatòria com els descrits.

Les micropartícules d'alginat un cop assecades tenen la capacitat d'absorbir aigua i inflar-se de manera depenent del pH. És justament aquest inflament el que resulta útil en la modulació de l'alliberament del fàrmac encapsulat.

#### 4.2.4. Formació de gels

Una de les propietats que fan dels alginats excipients amb un potencial interessant en el camp farmacèutic és la seva capacitat per formar hidrogels. Els hidrogels són xarxes polimèriques tridimensionals hidrofíl·liques unides i entrellaçades de manera física o química i capaces d'incorporar quantitats importants d'aigua o fluids biològics (Peppas i col., 2000).

Dins de l'important nombre de macromolècules que són capaces de formar hidrogels els polisacàrids resulten avantatjosos respecte altres polímers sintètics. La seva biodegradabilitat, manca de toxicitat, biocompatibilitat i característiques físicoquímiques peculiars els fan especialment útils en els sistemes d'alliberament de fàrmacs.

L'alginat presenta una cinètica de formació de gels habitualment molt ràpida, originant gels d'estructura suficientment robusta que els fan apropiats per un gran nombre d'aplicacions industrials i biomèdiques.

En el camp farmacèutic, l'alginat s'ha utilitzat com a excipient en la formulació de comprimits d'alliberació modificada (Tønnesen i col., 2002; Liew i col., 2006).

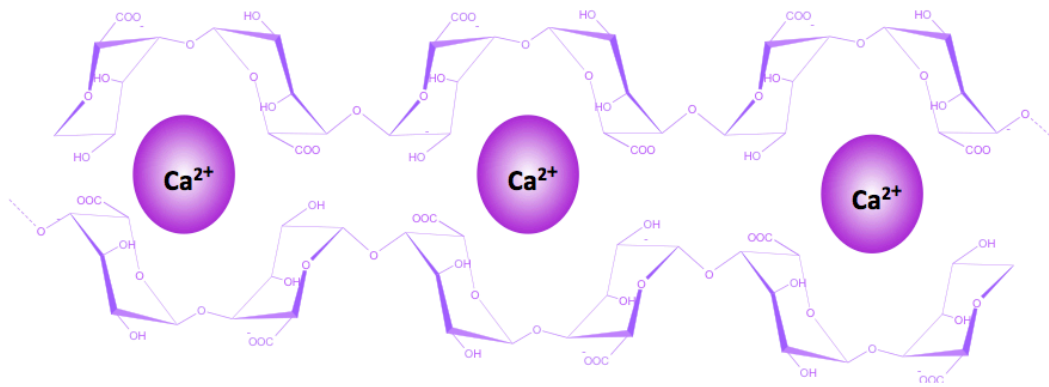
Degut a les seves propietats, els gels d'alginat càlcic (biocompatibilitat, mucoadhesió, porositat i facilitat de manipulació), els gels d'alginat han estat estudiats com a sistemes d'alliberació de proteïnes, encapsulació de cèl·lules i regeneració de teixits.

La formació de gels d'alginat majoritàriament pot produir-se per dos mecanismes. D'una banda, la gelificació per descens de pH, aquesta es produeix per la precipitació d'àcid algínic quan el pH del medi s'acidifica.

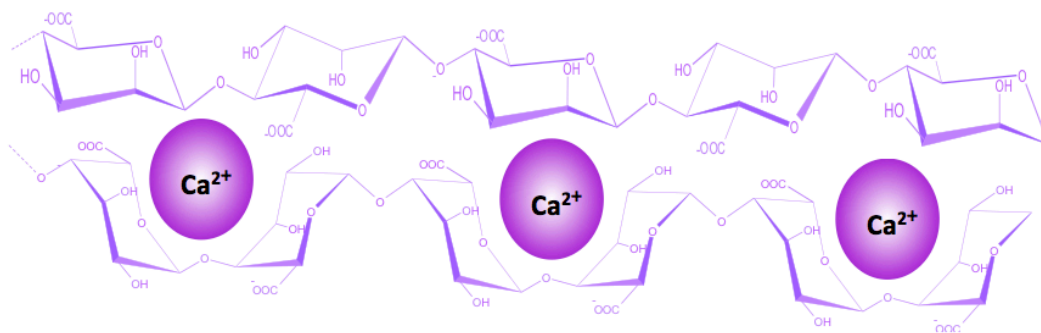
D'altra banda, la gelificació dels alginats es produeix per la interacció amb cations divalents, en el que es coneix com a gelificació ionotròpica, essent aquesta una de les més estudiades i amb un major nombre d'aplicacions.

A banda dels gels iònics, els alginats poden formar també gels àcids a pH per sota del valor de pKa dels residus d'àcid urònic, mitjançant l'addició lenta de  $\delta$ -gluconolactona, l'alginat és acidificat i forma gel d'àcid algínic (Draget i col., 1994). Les propietats mecàniques tant dels gels iònics i dels gels àcids depenen de la naturalesa dels alginats.

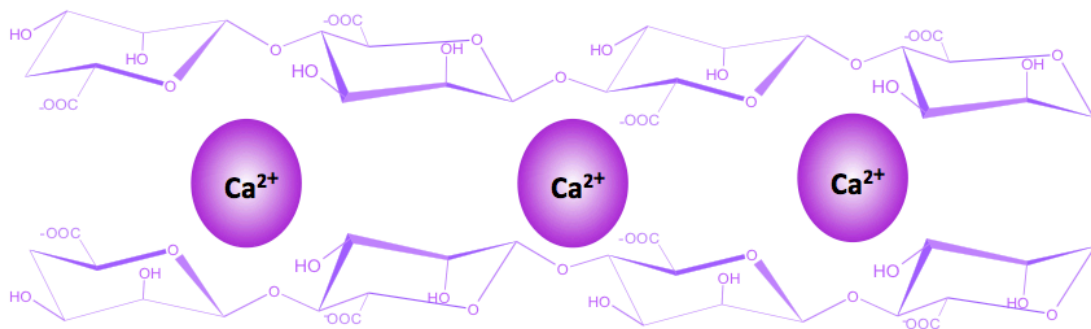
Figura 6: Representació del possibles entrecreuaments entre els ions de calci i les diferents cadenes d'alginat



Entrecreuament de blocs G



Entrecreuament de blocs M amb blocs G



Entrecreuament de blocs M



#### 4.2.5. Gelificació ionotròpica

La gelificació ionotròpica es produeix de manera instantània en presència de cations divalents, per a l'intercanvi dels ions sodi dels blocs-G per cations com  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , que es dipositen en cavitats electronegatives, prenent part dels enllaços iònics intercatenaris entre els blocs de guluronat (Blocs-G) i la cadena de polímer originant una xarxa tridimensional. Aquestes zones d'enllaç entre els blocs-G sovint referides a la literatura com a "oueres" (*egg-box structure*) confereixen una estructura al gel gruixuda i forta, però permeable a líquids i petites molècules. Quan els enllaços es formen en alginats rics en blocs M, l'estructura del gel és més fràgil i pot tenir també una més baixa porositat degut a una menor força dels enllaços formats entre les cadenes de polímer, així com l'elevada flexibilitat que adquireixen les molècules.

A diferència d'altres gels a base de polisacàrids, els gels d'alginat es poden formar i establir a temperatura ambient i constant. Aquesta propietat resulta particularment útil en aquelles aplicacions on es vegin implicats materials fràgils o amb baixa tolerància a temperatures elevades com poden ser cèl·lules, teixits, enzims, determinades proteïnes o fàrmacs termolàbils.

La gelificació ionotròpica de l'alginat es produeix quan els ions divalents prenen part dels enllaços iònics intercatenaris entre els blocs d'àcid gulurònic (Blocs G) i la cadena de polímer donant lloc a una xarxa tridimensional.

El procés de gelificació és molt dependent de la capacitat de difusió dels ions involucrats dintre de la xarxa polimèrica.

Hi ha dos mètodes principals per la preparació de gels d'alginat: a) el mètode de diàlisi/difusió i el mètode de gelificació interna.

En el mètode de diàlisi/difusió, es deixen difondre els ions dintre de la solució d'alginat. Aquest mètode s'utilitza freqüentment en aplicacions biotecnològiques per la immobilització de cèl·lules vives en el gel d'alginat.

Una solució d'alginat també pot ser solidificada mitjançant el mètode de gelificació interna, com succeeix en la gelificació *in situ*. En aquest cas, una sal de calci amb solubilitat limitada o bé ions de calci complexats, es barregen en una solució d'alginat dins la qual els ions de calci s'alliberen, habitualment mitjançant la modificació del pH acidificant lentament el medi. Aquest mètode és escollit quan el que es pretén és un macrogel d'alginat sinèrgic i homogeni per omplir l'espai d'un determinat contenidor. La principal diferència entre la gelificació interna i la gelificació per diàlisi/difusió és la cinètica de gelificació i en conseqüència, la xarxa de gel serà també diferent.

La preparació de microesferes d'alginat s'efectua per gelificació ionotròpica utilitzant el mètode de diàlisi/difusió. La solució d'alginat és extruïda sobre un bany amb ions calci a través d'un dispositiu generador de gotes d'alginat. Quan les gotes d'alginat entren en contacte amb la solució de calci es produeix la gelificació instantània donant lloc a les granes o microesferes, la gelificació de les quals, acaba de consolidar-se amb un període de curat dintre del bany i la consegüent difusió de ions de calci a la part més interna.

Es habitual situar les substàncies a encapsular, bé sigui en suspensió o dissoltes en la solució d'alginat, aquestes queden atrapades a l'interior de l'estructura d'alginat quan es produeix la

gelificació. En alguns casos la substància a encapsular també es pot dissoldre dins la solució gelificant.

La gelificació dels alginats és un procés reversible en tant que els ions divalents que actuen com a agents d'unió entre les cadenes polimèriques poden ser desplaçats per altres molècules iòniques donant lloc a un deteriorament de les propietats originals de l'hidrogel. (Le Roux i col., 1999).

#### 4.2.6. Sensibilitat al pH

Les microcàpsules d'alginat tenen la propietat de modificar la seva estructura en funció del pH del medi, el que permet la seva utilització en aplicacions que requereixin la modulació de l'alliberament en funció del pH del medi. Quan el pH del medi és àcid es produeix una contracció o sinèresi de l'estructura amb la conseqüent retenció dels fàrmacs encapsulats, el que resulta especialment útil en aquells fàrmacs que poden ser sensibles al pH gàstric o que resulten irritants gàstrics. En qualsevol cas, el fet que el fàrmac transiti protegit d'interaccions externes fins el seu lloc d'absorció, és una propietat que fa útils els alginats en aplicacions farmacèutiques.

El pH fisiològic varia sistemàticament a l'organisme, particularment al tracte gastro-intestinal a on algunes molècules es poden degradar degut als pHs agressius i condicions enzimàtiques de l'estómac. El pH de l'estómac pot anar des de valors  $\text{pH} \approx 1$  fins a  $\text{pH} \approx 2$  (estómac buit) fins a  $\text{pH} \approx 5$  (després d'ingerir aliments), depenent del tipus i quantitat de l'aliment ingerit. Les secrecions pancreàtiques inicialment neutralitzen l'aliment parcialment digerit així que deixa l'estómac, resultant un pH de 5 a 6 en el duodè. En les seccions baixes de l'intestí prim, el pH incrementa de nou gradualment, la regió ileocecal assoleix valors de pH de 7 o superiors. Al còlon el pH cau a valors entre 6 i 7 degut a la excreció àcida de les bacteries colòniques.

Hi ha diverses raons per voler evitar l'alliberament de fàrmacs a l'estómac:

- Per protegir fàrmacs inestables en àcid de la seva desintegració pels sucus gàstrics (p.e. antibiòtics, pèptids, enzims, inhibidors de bomba de protons...).
- Per protegir l'estómac de fàrmacs agressius que irriten la mucosa gàstrica (p.e. AINES, compostos de ferro).
- Alliberament controlat de fàrmacs depenent de pH per a una absorció òptima.
- Alliberament retardat.
- Alliberament intestinal dintre la finestra d'absorció (en diferents trams de l'intestí prim, localització d'efectes).
- Alliberament colònic tant per tractament local com per a teràpies sistèmiques.

Per l'aplicació segura de formulacions gastro-resistents és important que el polímer no es dissolgui en el medi àcid de l'estómac durant el temps que dura el seu trànsit i que el seu inflament sigui el menor possible i es mantingui el més impermeable possible. Per partícules, el pas per l'estomac es situa entre 30 i 120 minuts, però pot variar depenent del tipus i quantitat d'aliments.

#### 4.2.7. Aplicacions biomèdiques i farmacèutiques

A la bibliografia trobem descrites diverses aplicacions de l'alginat.

Pel que fa a l'alginat es descriuen les següents aplicacions:

- Aplicacions farmacèutiques: espessant, formador de gels, agent estabilitzant. Té un paper important en el camp de l'alliberació controlada de fàrmacs.
- Tractament de ferides.- afavorint una ràpida epitelització . Existeixen diferents marques comercials: Algicell® (Derma Sciences) AlgiSite® M /Smith Nephew), Comfeel® Plus (Coloplast), Kaltostat® (ConvaTec), Sorbsan® (UDL Laboratories) i Tegagen® (3M Healthcare).
- Cultius cel·lulars: els gels d'alginat s'utilitzen com a model de cultius cel·lulars per estudis biomèdics.
- Regeneració tisular amb proteïnes i cèl·lules: els gels d'alginat s'usen com a vehicle per transportar proteïnes o cèl·lules per regenerar teixits i òrgans
- Vasos sanguinis: els gels d'alginat poden promoure la formació de vasos sanguinis per la seva capacitat de transportar factors de creixement endotelials vasculars
- Teixit ossi: s'ha demostrat la capacitat dels gels d'alginat en la regeneració òssia per la seva capacitat d'alliberar factors osteoinductius, habilitat d'omplir buits...
- Formació de cartílag: s'ha constatat l'eficàcia dels gels d'alginat per transportar cèl·lules condrogèniques que restableixen el cartílag
- Músculs, nervis, pàncrees i fetge: també s'han investigat els gels d'alginat i s'ha comprovat la seva eficàcia en la regeneració d'aquests teixits i òrgans.

#### 4.2.8. Obtenció de microesferes d'alginat

Les microesferes o granes d'alginat es formen pel mecanisme de gelificació ionotròpica explicat en apartats anteriors. Es fa degotar una solució d'alginat sobre un bany de calci de manera que per cada gota que es submergeix en el bany inicial, es produeix la seva gelificació instantània, procés que conclou en uns minuts per donar lloc a la microesfera o grana. Les concentracions d'alginat en la solució inicial dependran de diversos factors, però es veurà limitada per raons de viscositat final i de la capacitat final que pugui tenir la solució de ser extruïda a través del sistema de degoteig.

Concentracions d'entre 1 i 4 % (p/v) es troben descrites a la literatura com a concentracions habituals de treball (Pasparakis i Bouropoulos, 2005; Joshi i col., 2012). Pel que fa al bany de gelificació aquest es compon per una solució aquosa que conté ions divalents lliures. Els banys gelificants basats en el calci són el més utilitzat i parteixen de solucions de clorur de calci. Un cop gelificat, l'alginat resultant que és de naturalesa polianiónica es pot estabilitzar amb un policatió com el quitosan (Li, 1996; Gaserod i col., 1999), reduint al mateix temps el diàmetre de porus de la càpsula i modulant les propietats de la càpsula obtinguda en funció del policatió i del procediment d'encapsulació utilitzat. La combinació d'alginat amb un policatió pot fer-se de diferents maneres, *in situ* o bé per capes, que poden ser d'una sola capa o múltiples capes.

Existeixen diversos paràmetres que es poden controlar durant el procés de formació de les microesferes: La velocitat d'agitació, la velocitat de degoteig i l'alçada de degoteig. El control d'aquests paràmetres permet que l'obtenció de microcàpsules sigui més homogènia tant intra com inter-lots. Existeixen diversos dispositius comercials que permeten un control acurat del

procés. Entre aquests dispositius hi ha els sistemes de flux laminar, els sistemes de vibració, els sistemes tallants i els sistemes de voltatge electrostàtic.

La literatura científica utilitza el terme granes d'alginat (*alginate beads*) o microcàpsules d'alginat. Tot i que en alguns casos s'utilitza indistintament, el terme "grana" (bead) es refereix a estructures que consisteixen només en el nucli d'alginat mentre que el terme microcàpsula es reserva a les estructures a on el nucli es troba envoltat per una coberta policatiònica.

### 4.3. Chitosan

#### 4.3.1. Definició i obtenció

El terme chitosan no correspon a una única entitat química definida, i sota aquest terme s'agrupa una sèrie de polímers obtinguts tots ells per desacetil·lació de la quitina que poden variar en pes molecular des de 10000 fins a 2 milions de Daltons (Sanford, 1989) i tenir diferents graus de desacetil·lació (entre 60-95%), definits en funció del percentatge de grups amino primaris a l'esquelet del polímer. Aquesta variabilitat en la seva definició ha representat sovint una dificultat a l'hora d'uniformitzar usos d'una forma precisa o bé de reproduir resultats obtinguts en els estudis científics.

Es tracta d'un biopolímer lineal, no ramificat de naturalesa polisacàrida format per unitats monomèriques de D-glucosamina (unitat desacetilada; D) i N-acetil-D-glucosamina (unitat acetilada; A), que és biodegradable, biocompatible, no carcinogènica i de baixa immunogenicitat i toxicitat, tant ell mateix com els seus productes de degradació (Muzzarelli, 1997; Kumar, 2000). El chitosan, té una estructura semi-cristal·lina i el grau de cristal·linitat depèn del grau de desacetil·lació. Els chitosans comercials tenen diferents graus de desacetil·lació que poden variar del 60 al 100%. El grau de desacetil·lació pot determinar-se mitjançant tècniques d'espectroscòpia RMN o valoracions àcid base (Czechovska-Biscuk i col., 2012). En essència podem dir que el chitosan és quitina suficientment desacetil·lada com per formar sals solubles d'amina (Handbook of Pharmaceutical Excipients 8<sup>th</sup> Ed, 2017).

Per les seves propietats, el chitosan ha esdevingut un biopolímer que ha estat objecte de nombrosos estudis i aplicacions en el camp farmacèutic i biomèdic (Illum, 1998; Senel, 2000; Singla, 2001) a banda, la seva obtenció es pot fer a partir de fonts naturals que són abundants i renovables.

#### *Sinònims:*

2-Amino-2-deoxy-(1,4)-b-D-glucopyranan; chitosani hydrochloridum; deacetylated chitin; deacetylchitin; b-1,4-poly-D-glucosamine; poly-D-glucosamine; poly-(1,4-b-D-glucopyranosamine).

#### *Nom químic:*

Poly-b-(1,4)-2-Amino-2-deoxy-D-glucose

**CAS:** [9012-76-4]

### Obtenció de quitina

El quitina no es troba com a tal a la natura, amb l'excepció de determinats fongs que són capaços de produir-lo en petites quantitats (New i col., 2002), i la seva obtenció comercial es fa per desacetilació alcalina de la quitina, el que confereix una reactivitat superior al polímer, ja que aquesta és insoluble en aigua i pràcticament inert, el quitina, en canvi presenta grups hidroxil i amino disponibles per reaccionar i per la formació de sals (Singla i Chawla., 2001; Kumar, 2004), a banda de la seva capacitat de retenir aigua per formar hidrogels.

La quitina és el segon polímer més abundant a la natura després de la cel·lulosa (Roberts, 1992) on s'hi troba àmpliament distribuïda com a component principal de l'exoesquelet a la closca dels crustacis, mol·luscs, les cutícules dels insectes i també a les parets cel·lulars d'algunes bacteries i fongs (Kumar i col., 2004; Agnihorti i col., 2004).

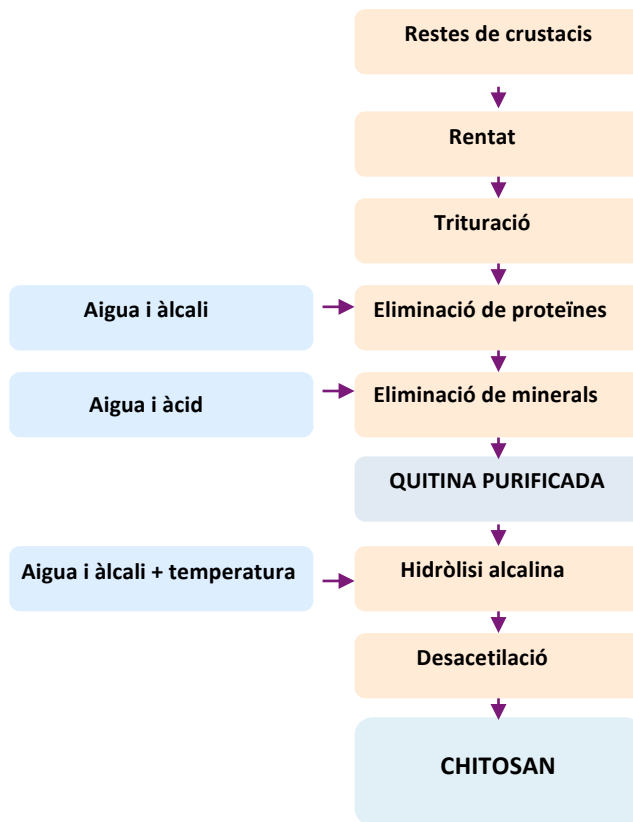
La quitina es presenta en tres formes polimòrfiques, la  $\alpha$ , la  $\beta$  i la  $\gamma$ -quitina, fent una aportació de duresa o de flexibilitat a les estructures en funció del polimorf que hi és present, així, les estructures més dures estan formades per  $\alpha$ -quitina, mentre que les estructures més flexibles estan formades per la  $\beta$  i la  $\gamma$ -quitina. Quan el grau de desacetilació de la quitina arriba al 50% (depenent de l'origen del polímer) esdevé soluble en medi aquós àcid i s'anomena quitina.

La indústria alimentària produeix residus abundants procedents dels crustacis que són aprofitats per obtenir quitina d'una manera barata i sostenible. El procés de fabricació de quitina comença amb l'extracció i purificació de la quitina a partir d'aquests residus mitjançant el tractament del material prèviament molturat amb solucions alcalines del 3-5% d'hidròxid sòdic per eliminar les proteïnes, després de neutralitzar el material desproteïnit es tracta amb solucions àcides del 3-5% d'àcid clorhídric per separar minerals com el carbonat càlcic i el fosfat càlcic i precipitar la quitina (Kumar, 2000).

Aquesta quitina després d'assecar-la es pot emmagatzemar a l'espera de ser desacetil·lada per convertir-la en quitina. El verdader procés de preparació de quitina comença amb la hidròlisi alcalina de la quitina que s'aconsegueix amb solucions concentrades (40-45%) d'hidròxid sòdic en calent (110°C). La hidròlisi alcalina produeix la N-desacetilació de la quitina deixant lliures i per tant reactius els grups amino.

El precipitat que s'obté es renta amb aigua i es dissol amb àcid acètic (2%) per així eliminar impureses insolubles. Un cop filtrada la solució es neutralitza amb una solució diluïda d'hidròxid sòdic i s'obté el quitina en forma de precipitat blanc. És freqüent que durant la precipitació es formin fibres de quitina el que li pot donar una aparença de cotó.

El quitina es presenta en forma de pols o d'escates de color blanc o lleugerament cremós i sense olor o bé amb una olor característica que recorda als derivats del peix degut precisament al seu origen majoritari a partir de la closca dels crustacis marins.

**Figura 7:** Diagrama de flux del procediment d'obtenció del chitosan

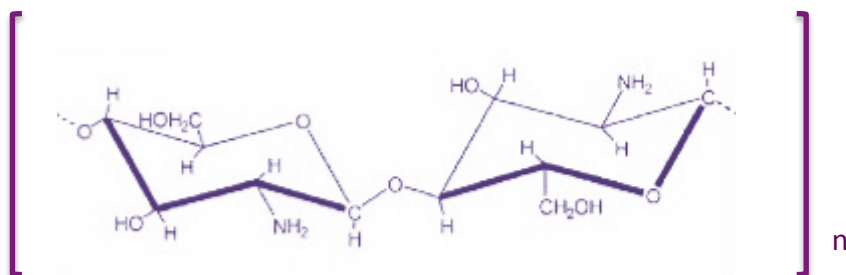
Variant les condicions de la reacció durant aquest procés s'altera el grau de desacetil·lació i el pes molecular del chitosan. També en funció de les condicions de preparació, s'obté chitosan amorf o bé en forma cristal·lina. Els chitosans obtinguts per mètodes convencionals acostumen a ser amorfs, no obstant, en determinades condicions de producció s'aconsegueixen chitosans cristal·lins i formes microcristal·lins que s'han proposat com a adequades per determinats usos farmacèutics com la compressió directa. Els chitosans microcristal·lins també tenen major capacitat per retenir aigua, el que suposa major facilitat per formar gels i per tant, una potencial utilitat superior pel desenvolupament de formes farmacèutiques d'alliberament modificat (Struszczyk, 1987; Sabnis i col., 1997).

La reactivitat del chitosan ha propiciat l'aparició d'un nombre important de derivats consistents en la modificació de la cadena lineal inicial amb radicals per obtenir estructures ramificades amb una reactivitat, propietats mecàniques i biològiques modificades respecte el material original. Els chitosans modificats són objecte de nombrosos estudis com a biomaterials innovadors per a aplicacions farmacèutiques, el que a la vegada resulta interessant per les possibilitats que ofereixen a l'hora d'obtenir noves patents als seus descobridors per la novetat que representa l'ús d'aquest materials. Les modificacions acostumen a anar encaminades a l'obtenció de materials menys rígids i de solubilitat alterada.

El chitosan, és per tant, bioadhesiu i s'uneix a superfícies carregades negativament com les membranes mucoses o polímers aniònics com l'alginat. El chitosan propicia el transport de fàrmacs polars a través de superfícies epitelials.

### 4.3.2. Estructura química

**Figura 8:** Estructura molecular del chitosan



Químicament el chitosan és un copolímer que presenta una estructura molt similar a la de la cel·lulosa, constituïda aquesta per unitats de D-glucosa enllaçades per unions β(1-4) amb grups hidroxil a les posicions C2 dels anells de glucosa. Així el chitosan, també presenta unions β(1-4) però en aquest cas per unir anells de D-glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) i N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa). El chitosan el podem trobar com a base o en forma de sal com a clorhidrat, glutamat o maleat de chitosan.

### 4.3.3. Propietats químiques i fisicoquímiques

El chitosan té una naturalesa alcalina deguda als grups amino presents a la seva estructura. En medi àcid aquests grups es protonen facilitant la solubilització del polímer en medi aquós, convertint-lo en un policatió, per tant, que el seu comportament és el d'una base capaç de captar els protons àcids del medi. El grup amino del chitosan té un valor de pKa ≈ 6,5, essent soluble en la majoria de solucions aquoses àcides a pH inferior a 6,5, incloent l'àcid cítric, tartàric, acètic i fòrmic, no obstant, és insoluble en àcid sulfúric i fosfòric. (Aysu- Yurdasiper et al 2010). A pH inferior a 6,5 el chitosan és una poliamina catiònica amb elevada densitat de càrrega, el que li confereix la capacitat d'adherir-se a superfícies carregades negativament a més de la capacitat quelant d'ions i la de combinar-se amb materials aniònics. Els polisacàrids no acostumen a tenir naturalesa policatiònica i això fa del chitosan un biopolímer amb propietats interessants en tant que podrà interaccionar amb polímers o estructures de naturalesa aniònica. El chitosan presenta les reaccions típiques de les amines, per exemple l'acilació en N o bé les reaccions d'Schiff (Kumar, 2000).

A pH neutre es solubilitza amb dificultats. En general en solucions aquoses de pH ≥ 6,5, la majoria de molècules de chitosan perden la seva càrrega i precipiten. El chitosan, és insoluble en solvents orgànics, en àcids a elevades concentracions i en bases. La solubilitat del chitosan es pot veure reduïda per la unió amb altres molècules mitjançant enllaços covalents.

El chitosan es troba disponible en un ampli rang de pesos moleculars i graus de desacetilació, essent aquests paràmetres els que afecten la mida de partícula, formació de partícules i l'agregació. Els diferents graus de desacetilació dels chitosans representen la proporció d'unitats N-acetil-D-glucosamina respecte el total d'unitats, es el que acaba decidint a banda del pes molecular, les propietats del chitosan en funció de quina sigui aquesta proporció.

Degut al seu elevat pes molecular i estructura lineal, el chitosan és un excel·lent viscositzant en medis àcids. Es tracta d'un material pseudoplàstic que disminueix la viscositat amb l'agitació. La viscositat incrementa amb la concentració, i disminueix a mesura que incrementa la temperatura o amb un increment del grau de desacetilació, que és un paràmetre estructural determinant de les propietats físico-químiques tals com el pes molecular, la elongació fins ruptura i la força tensil. (Wang i Xu., 1994). La densitat de càrrega variarà en funció de quin sigui el pH del medi i del grau de desacetilació.

**Taula 3:** Valors de viscositat típica (dinàmica) per solucions de chitosan (1% p/v) en diferents àcids

	Concentració d'àcid					
	1%		5%		10%	
	Viscositat (mPas)	pH	Viscositat (mPas)	pH	Viscositat (mPas)	pH
Acètic	260	4,1	260	3,3	260	2,9
Adípic	290	4,1	-	-	-	-
Cítric	35	3,0	195	2,3	215	2,0
Fòrmic	240	2,6	185	2,0	185	1,7
Làctic	235	3,3	235	2,7	270	2,1
Màlic	180	3,3	205	2,3	220	2,1
Malònic	195	2,5	-	-	-	-
Oxàlic	12	1,8	100	1,1	100	0,8
Tartàric	52	2,8	135	2,0	160	1,7

(Extret de Handbook of Pharmaceutical Excipients 8<sup>th</sup> Ed, 2017)

La temperatura pot produir variacions en les propietats físiques com la solubilitat o la reologia i aparença. Aquest aspecte s'ha de tenir en compte quan s'utilitza el chitosan en processos tecnològics que impliquin calor, com per exemple l'esterilització. S'ha observat que la hidrofília i per tant la solubilitat en aigua es veu reduïda després d'un procés d'esterilització per calor humit (121 °C, durant 30 minuts). La radiació gamma també provoca canvis en les propietats físiques del chitosan, en aquest cas es veu afectada la viscositat que disminueix de forma dosi-dependent (Lim i col., 1998).

Des d'un punt de vista químic, el chitosan és una poliamina lineal, amb grups amino reactius, grups hidroxil que també poden ser reactius i capacitat per a quelar ions metàl·lics.

#### 4.3.4. Propietats biològiques

El chitosan és un polímer biocompatible, biodegradable, segur i no tòxic que s'uneix fortament a cèl·lules i microorganismes amb propietats antimicrobianes, fungistàtiques, espermicides, antitumorals i immunoajuvants. Té propietats hemostàtiques, efectes regeneradors del teixit connectiu i accelera la formació d'osteoblasts responsables de la formació de l'ós.

#### 4.3.5. Formació de gels de chitosan

El chitosan té la capacitat de formar gels espontàniament a pH àcid ja que en aquestes condicions esdevé hidrofílic i és capaç de retenir aigua formant hidrogels pseudoplàstics, és a dir gels que la seva viscositat davalla a mesura que les forces de cisalla incrementen (Senel i col., 2000). No obstant, la viscositat dels gels de chitosan també depenen d'altres factors com el pH del medi, el pes molecular i grau de desacetil·lació. A mesura que disminueix el pH del medi, la viscositat del gel augmenta. Tanmateix, a mesura que incrementa el pes molecular o el grau de desacetil·lació, també incrementa la viscositat. Cal tenir present que el grau de desacetil·lació és el que determina la quantitat de grups amino reactius i per tant, quants més



grups amino major serà el caràcter policatiònic del polímer. Justament, a mesura que incrementa la presència de càrregues positives a la cadena polimèrica, majors són les forces de repulsió convertint-la en una estructura més rígida i amb menys capacitat de plegar-se.

La densitat de càrrega dels segments de la cadena polimèrica és un paràmetre essencial per a la formació de gels i tots els factors que disminueixen aquest paràmetre afavoreixen el desinflament i la reversibilitat (Vachoud i col., 2000). Aquestes propietats són les que resulten útils per l'aplicació dels chitosans en sistemes d'alliberament de fàrmacs.

Existeixen diferents procediments per l'obtenció de gels a base de chitosan:

#### 1.- Acilació

La reacció entre acetat de chitosan amb carbodiimida produint la restauració dels grups acetamido.

N-acetil, N-propionil i N-butiril chitosan es preparen fent reaccionar 10% àcid acètic, àcid propiònic o àcid butíric amb un compost acil anhidre apropiat. Els gels que es formen per N-acil·lació no són reversibles tèrmicament.

Es poden preparar gels de chitosan barrejant a elevades temperatures acetat de chitosan i sal sòdica de àcid 1-naftol-4 sulfònic o àcid 1-naftilamina-4-sulfònic. Aquests compostos actuen com contraions orgànics grans.

També els gels de chitosan es poden preparar en solucions d'aminoàcids a pH 9 (Kofuji i col., 1999).

Per altra banda, es poden formar els hidrogels pH sensibles insertant àcid D, L-làctic en els grups amino del chitosan sense la necessitat d'un catalitzador.

La captació d'aigua per part dels hidrogels depèn de la llargada de la cadena i del grau de substitució.

#### 2.- Reaccions enzimàtiques

S'obtenen gels a partir de la reacció de la tirosina glucà (un chitosan modificat obtingut a partir de la reacció del chitosan amb l'àcid hidroxifenilpiruvic) en presència de tirosinasa que oxida el fenol a quinina. També es poden obtenir gels amb 3-hidroxibenzaldehid, 4-hidroxibenzaldehid y 3,4-dihidroxibenzaldehid (Muzzarelli i Ilari, 1994).

#### 3.- Reaccions amb aldehids

El glutaraldehid es un agent que forma unions creuades amb el chitosan (Monteiro i Aioldi, 1999). Les xarxes de chitosan s'obtenen per reacció del glutaraldehid en solució d'àcid làctic (pH 4-5).

#### 4.- Formació de complexos polielectròlits

La protonació elevada de les funcions amina del chitosan produeix la formació de complexos macromoleculars que son insolubles en aigua i formen hidrogels (Tsuchida y Abe, 1982; Kubota y Kikuchi 1999).

Les microsfères de chitosan es preparen per reacció del chitosan amb quantitats controlades d'anions multivalents resultant unions de molècules de chitosan. Aquestes unions es poden produir en medis àcids, neutres o bàsics depenent del mètode utilitzat: unions amb anions, precipitació, coacervació, emulsificació modificada, gelació ionotròpica, unions glutaraldehyd, unions per temperatura (Aysu Yurdasiper i col., 2010).

#### 4.3.6. Aplicacions biomèdiques i farmacèutiques

Nombrosos són els estudis en les darreres dècades al voltant del chitosan i el seu ús com a excipient en formulacions farmacèutiques. Les seves propietats fisico-químiques, la seva baixa toxicitat, bona tolerància i bona biocompatibilitat a banda de la seva abundància i facilitat d'obtenció han fet d'aquest biopolímer un candidat atractiu per molts nous desenvolupaments. Des de l'any 2002 la seva monografia ja va ser inclosa a la Farmacopea Europea.

**Taula 4:** Especificacions de Farmacopea pel chitosan

Assaig	Farmacopea Europea (10.V)
Identificació	+
Característiques	+
Aspecte de la solució	+
Matèria insoluble en aigua	≤ 0,5%
pH (solució 1% p/v)	4,0 – 6,0
Viscositat	+
Grau de desacetilació	+
Clorurs	10,0 – 20,0 %
Metalls pesants	≤ 40 ppm
Pèrdua per dessecació	≤ 10%
Cendres sulfúriques	≤ 1,0%

El chitosan té usos en medicina, indústria fotogràfica, alimentació i cosmètica (Muzzarelli i col., 1985; Berger, 1983).

Destaca la utilització del chitosan en el recobriment de comprimits (Abletshauer i col., 1993) així com en la formació de pel·lícules sobre ferides evitant infeccions i afavorint la cicatrització (Muzzarelli, 2009).

Per altra banda s'ha utilitzat el chitosan com agent hemostàtic utilitzat en forma de pegats i/o embenats (Burkatovskaya i col., 2006).

L'interès creixent del chitosan en aplicacions farmacèutiques es posa de manifest en el gran nombre d'estudis publicats, així com la diversitat de camps dintre de l'àmbit farmacèutic d'aquests estudis. La idoneïtat i el funcionament del chitosan com a excipient de formulacions farmacèutiques per aplicacions d'alliberament de fàrmacs s'ha tractat en nombrosos estudis, entre els que hi ha aplicacions en sistemes d'alliberament de fàrmacs, ús en formes de dosificació mucoadhesives, formes d'alliberació ràpida, alliberació de pèptids, sistemes d'alliberament colònic, ús en teràpia gènica per alliberament de material genètic. A banda dels sistemes d'alliberament de fàrmacs, el chitosan ha estat processat en diferents formes farmacèutiques incloent gels, films, granes, microesfères, comprimits i cobertes per liposomes. A banda el chitosan pot ser processat en sistemes d'alliberament de fàrmacs utilitzant diverses tècniques incloent el *spray drying*, la coacervació, compressió directa i els processos de granulació convencional. El chitosan s'utilitza en formulacions cosmètiques i ha estat i continua essent objecte d'investigació pel seu ús en formulacions farmacèutiques.

Les propietats funcionals del chitosan depenen de la densitat i distribució de càrregues, així com de la llargada de la cadena polimèrica. La forma salina, el grau de desacetil·lació i el pes molecular acabaran determinant com s'utilitza el polímer per les aplicacions farmacèutiques. Tal com ja s'ha tractat, la capacitat de formar hidrogels i inflar-se o desinflar-se de forma reversible és una de les propietats que fa atractiu el chitosan en els sistemes d'alliberament de fàrmacs. (Dodane i col. 1998; Singla i col., 2001).

Dintre del camp de la formulació de formes d'alliberament de fàrmacs, un dels camps on té interès el chitosan és en l'alliberament de fàrmacs en llocs específics. En aquest sentit, el chitosan s'ha estudiat com a excipient amb propietats gastroretentives per la capacitat de retenir els fàrmacs en condicions gàstriques fent que l'alliberament pugui produir-se més avall del tracte gastrointestinal. La dependència del pH que mostren les seves propietats fisicoquímiques, com la capacitat de retenir aigua, la viscositat i la solubilitat, fan que sigui un candidat adequat per aquest tipus de formes farmacèutiques. S'ha vist que el chitosan disminueix la proporció d'alliberament de fàrmacs formulats en forma de comprimit a pH àcid o lleugerament àcid (Kawashima i col, 1985; Acartürk, 1989). Altres autors han trobat que a pHs superiors, al voltant de pH 7,4, aquesta capacitat retentiva es perd i el chitosan no és capaç de modificar l'alliberament dels fàrmacs. La formació de gels erosionables i amb capacitat d'inflar-se ha estat objecte de nombrosos estudis (Chen i col., 1999; Gupta i col., 2018) i s'ha vist que els chitosans presenten els mecanismes típics dels sistemes d'alliberament modificat que es basen en hidrogels (difusió no fickiana) (Ritger i Peppas, 1987 b). Les cinètiques d'alliberament acostumen a ser d'ordre zero. Els resultats també han mostrat que la hidratació i formació de gels pel chitosan es produeix de forma més ràpida a pHs àcids (pH 1,2) que a pHs neutres. Això pot ser explicat per la naturalesa catiònica del chitosan.

Variables que afecten l'alliberament de fàrmacs:

La proporció de fàrmac alliberada de les matrius hidrofíliques de chitosan depenen de la quantitat de chitosan present i també de la naturalesa del fàrmac. A mesura que incrementem la quantitat de chitosan en els comprimits o en els grànuls, disminueix la proporció que s'allibera. L'alliberació lenta s'ha aconseguit amb fàrmacs lleugerament solubles. Formulacions a base de fàrmacs molt solubles han requerit la presència d'altres excipients a banda del chitosan. Diversos autors han estudiat amb detall els efectes sobre les propietats físico-químiques de fàrmacs en formulacions amb sals de chitosan (en forma de malat). Han trobat que els fàrmacs amb solubilitat baixa en aigua i / o amb elevat pes molecular s'alliberen més lentament.

El grau d'acetil·lació del chitosan s'ha vist que també té un efecte sobre l'alliberament del fàrmac, però, els efectes de les propietats físico-químiques del chitosan no han estat massa avaluades. Els efectes d'alterar el pes molecular o el grau de desacetil·lació han estat discutits en algunes publicacions. L'alliberament del fàrmac s'ha vist que disminueix també a mesura que incrementa el pes molecular. Els efectes d'alterar el pes molecular del chitosan, s'han considerat que estan relacionats amb l'increment de la viscositat que es produeix en els gels formats pel chitosan.

Alguns autors (Zhou i col., 2008; Yang i Hon, 2010) han demostrat que la velocitat d'alliberament de fàrmacs depèn del grau de desacetil·lació del chitosan. La proporció de fàrmac alliberat disminueix a mesura que incrementa el grau de desacetil·lació en proves de dissolució a pH 1,2. S'ha conclòs que la proporció de solvent adquirida per la matriu polimèrica incrementa a mesura que augmenta el nombre de grups amino ionitzables del chitosan (increment del grau de desacetil·lació), el que resulta en un increment de la barrera que forma el gel de chitosan.

El chitosan esdevé soluble a pHs àcids (inferiors al seu pKa *ca* 6,2), en els quals es donen les condicions de protonació dels grups  $-NH_2$  que resulta en la seva solubilització. Després de la protonació, el chitosan adquireix una superfície de càrrega positiva on les seves unitats repetitives de D-glucosamina el fan esdevenir l'únic biopolímer pseudo natural de caràcter catiònic. L'alliberament de fàrmacs depèn del pH en què les microcàpsules s'han format així com el tipus de grup acil introduïts en el chitosan quan aquest és modificat.

Tanmateix s'han realitzat molts estudis de l'efecte del chitosan en la millora de l'absorció de fàrmacs peptídics a través de les mucoses, destacant l'estudi realitzat per Illum i col., (1994) realitzat en rates i ovelles del transport de l'insulina a través de la mucosa nasal.

#### 4.4. Aplicacions dels gels mixtes d'alginat i chitosan

La combinació de l'alginat i el chitosan per formar estructures mixtes condueix a un ampli rang d'aplicacions. D'una banda, el comportament com a polianió de l'alginat i el comportament com a policatió fa que es formin estructures combinades de propietats diferents a les que tindrien les estructures formades per cadascun d'aquests biopolímers de manera individual.

Lucinda-Silva col. (2010), varen preparar multipartícules d'alginat i chitosan amb triamcinolona per ser alliberada al còlon pel mètode de coacervació/gelificació ionotròpica. Els resultats obtinguts varen mostrar un més ràpid alliberament en l'entorn entèric (pH 7,5) que en l'entorn gàstric (pH 1,2). Wang i col. (2011), van preparar granes de chitosan-alginat amb albendazol per ser alliberades a l'estòmac, mentre que Lira i col. (2009), varen preparar micropartícules de chitosan-alginats amb trans-àcid retinoic per ser alliberat a la pell. En ambdós casos es va aconseguir l'alliberament selectiu al lloc desitjat. També s'han realitzat diferents estudis per combatre infeccions produïdes per *Helicobacter pylori*.

Ishak i col. (2007), varen encapsular metronidazol en granes de chitosan-alginat pel mètode de gelificació ionotròpica i es va constatar l'eficàcia d'aquestes granes en l'erradicació de *Helicobacter pylori* administrades per via oral en rates.

Chang i col (2010), varen formular nanopartícules de chitosan/àcid poly (glutàmic) incorporades en hidrogels d'alginat/ $Ca^{+2}$ . La capa d'alginat feia de protecció de les nanopartícules en l'espai gàstric i d'aquesta manera facilitava la interacció de l'amoxicil·lina amb els espais intracel·lulars on resideix la infecció per *H. pylori*.

**Taula 5:** Característiques i aplicacions farmacèutiques de l'alginat i el chitosan (Skaugrud i col., 1999)

Característica	Aplicació	Alginat	Chitosan
Solubilitat	Control dissolució tracte gastrointestinal	+++	+++
Gel	Agent d'immobilització per sistema d'alliberament	+++	+
Electròlits	Agent bioadhesiu per sistema d'alliberament	-	+++
Inflament	Disgregació de comprimits. Matriu per l'alliberament	+++	++
Film	Tractament de ferides. Agent d'encapsulació.	+++	+++
Quelació	Unió a cations	++	+
Viscositat	Suspensions	++	-
Biològica	Resposta immune	+++	+
Microbiològica	Efecte antimicrobià	-	+++



## 5. ANTIINFLAMATORIS NO ESTEROÏDALS (AINEs)

### 5.1. Introducció

Els fàrmacs analgèsics i antiinflamatoris tenen els seus orígens en la utilització d'extractes de plantes amb contingut en àcid salicílic, especialment els obtinguts de l'escorça del salze (*Salix alba* i altres membres del gènere *Salix*), pel tractament de la febre, el dolor i la inflamació (Rainsford, 2004). Aquests tractaments eren utilitzats als diferents continents, així existeixen dades de la seva utilització a la cultura Xinesa, la Índia, l'Àfrica, l'Amèrica i tanmateix es troben descrits amb força detall en textos de les autoritats mèdiques Gregues i Romanes.

Entre els segles XVII a XIX, la popularitat d'aquests extractes, com a antipirètics, creix de manera notable arrel de les publicacions d'assajos clínics efectuats pel Reverend Edward Stone. Durant el segle XIX els avenços en química van permetre l'aïllament de components actius salicilats a partir d'aquests extractes que condueixen a la síntesi d'àcid salicílic i àcid acetilsalicílic, essent aquest darrer, comercialitzat posteriorment per Bayer® com a Aspirina® fins a dia d'avui (Rainsford, 2004).

L'àcid acetilsalicílic, va esdevenir el fàrmac pioner d'una nova família de fàrmacs batejada amb el nom d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) de la qual els primers nous desenvolupaments van ser la fenilbutazona (Geigy®, 1945) i la indometacina (Merck® & Co, 1960), utilitzades durant dècades pel tractament d'alteracions inflamatòries doloroses com l'artritis. De fet, la indometacina encara continua vigent per tractar aquest tipus d'afectacions inflamatòries. No obstant, tot i la seva eficàcia i potència antiinflamatòria, aquests fàrmacs també presenten efectes no desitjats com propiciar la formació d'úlceres gàstriques.

Durant la dècada dels anys 60 i vinculat a la comprensió dels conceptes de patogènesi dels processos inflamatoris i l'acció terapèutica dels agents utilitzats en aquell temps, es va desenvolupar l'ibuprofè (Dr. Steward Adams, The Boots Pure Drug Company Ltd, Nottingham UK), establint-ne un perfil de seguretat favorable a dosis analgèsiques i antipirètiques eficaces de fins a 1200 mg diaris.

Amb posterioritat, cap als anys 80 i un cop conegut perfectament el seu perfil farmacològic, toxicològic i després de l'avaluació de la seva seguretat per les dècades d'ús, l'ibuprofè va ser aprovat al Regne Unit com a medicament OTC esdevenint així el primer antiinflamatori de *no-prescripció* després de l'aspirina (Rainsford 1999c).

La indústria farmacèutica ha desenvolupat i comercialitzat un nombre elevat d'antiinflamatoris inclosos dins la categoria dels AINEs i agrupats en diverses famílies (taula 6).

Taula 6: Classificació dels AINEs

GRUP QUÍMIC	FAMILIA	AINE
Àcids Carboxílics	Salicilats	Àcid acetilsalicílic Diflunisal
	Fenamats	Àcid Flufenàmic Àcid Mefenàmic Àcid Meclofenàmic Àcid Tolfenàmic
	Indolacètics	Indometacina Sulindac
	Fenilacetats	Aceclofenac Diclofenac Etodolac Ketorolac
	Propionats	Dexibuprofè Dexketoprofè Flurbiprofè Ketoprofè Ibuprofè Naproxè Àcid tiaprofènic
Carboxamides o Oxicams		Piroxicam Meloxicam Lornoxicam Tenoxicam
Sulfonanilides		Nimesulida
Diaril substituïts Pirazols /furanones	Coxibs	Celecoxib Parecoxib Etoricoxib Rofecoxib ( <i>retirat</i> ) Valdecoxib ( <i>retirat</i> )

## 5.2. Mecanisme d'acció

El principal mecanisme d'acció dels AINEs radica en el bloqueig de la síntesis de prostaglandines derivades de l'àcid araquidònic, per inhibició de l'enzim ciclooxigenasa en les seves isoformes (COX-1, COX-2 i/o COX-3).

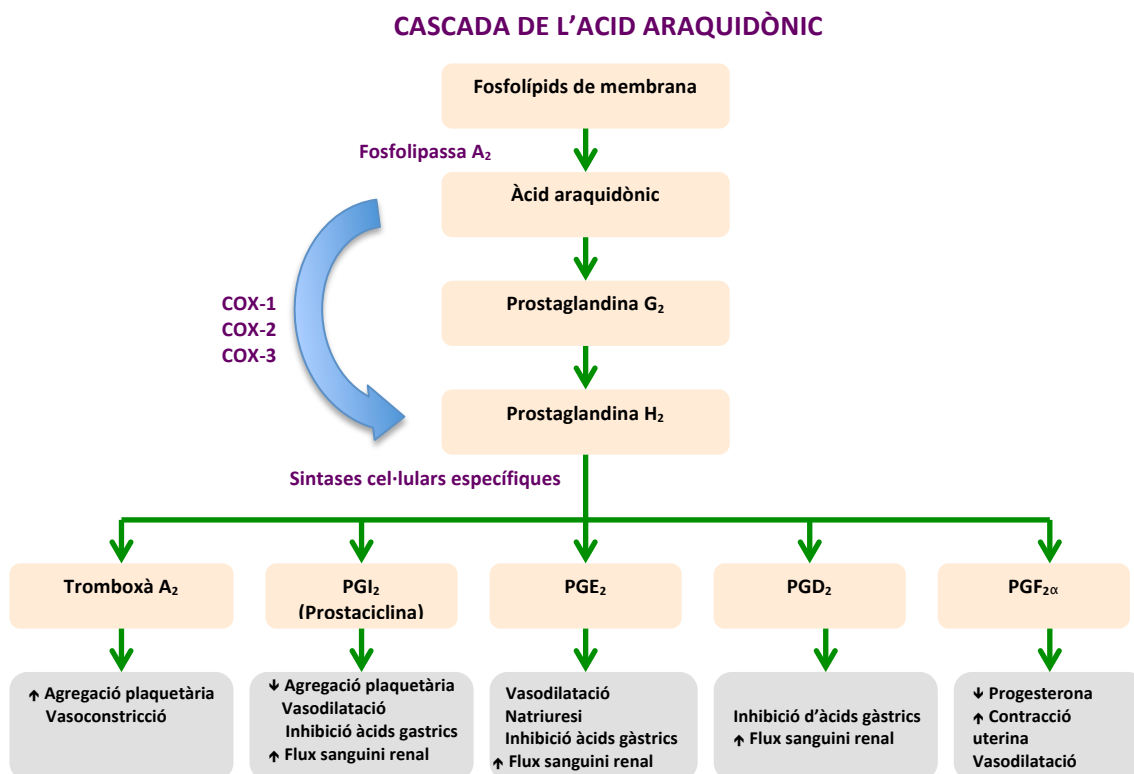
L'enzim ciclooxigenasa (COX) també anomenat prostaglandinsintasa participa a la cascada de l'àcid araquidònic, utilitzant-lo com a substrat per originar les diferents prostaglandines. Les prostaglandines són sintetitzades a partir de l'àcid araquidònic que actua com a precursor, en determinats estats fisiològics habituals del nostre organisme, però també en processos patològics, donant com a resposta en aquest darrer cas prostaglandines causants de la inflamació, de processos àlgics o de processos pirètics.

El fet de trobar prostaglandines i per tant, la intervenció de l'enzim COX participant habitualment en processos fisiològics beneficiosos per l'organisme, con la citoprotecció gàstrica mitjançada per la (PGE<sub>2</sub>) i amb resultat asimptomàtic en el que es refereix a processos inflamatoris, va portar a pensar en la possibilitat de l'existència de formes diferents del mateix enzim que afavoririen la producció d'una o altra prostaglandina en funció de determinats estímuls.

Aquests enzims idèntics en tot, excepte en petites variacions del lloc actiu s'anomenen isoenzims i en aquest cas la primera proposta aniria a considerar l'existència de dues formes isoenzimàtiques: la COX-1 i la COX-2, essent aquesta darrera, la COX-2 una forma induïble causant de les prostaglandines que participen en els processos inflamatoris.

Posteriorment, per poder explicar alguns efectes i sobretot l'acció d'alguns fàrmacs com el paracetamol amb molt poca afinitat pels isoenzims COX-1 i COX-2, amb poca potència antiinflamatòria, però marcat efecte analgèsic i antipirètic, es va postular l'existència d'una tercera isoforma, la COX-3, de la que actualment ja es disposa d'evidències experimentals de la seva existència.

Figura 9: Esquema dels derivats de l'àcid araquidònic produïts per acció enzimàtica de les cicloxigenases





Si habitualment hi ha ciclooxigenases al nostre organisme, perquè no sempre es produeixen prostaglandines no desitjades?. Per resoldre aquesta pregunta es va plantejar la possibilitat de que una de les isoformes, concretament la COX-1 existís en estats fisiològics normals al contrari de la COX-2 que o bé no existiria o existiria en proporcions molt baixes i la seva expressió s'induiria en el decurs i com a resposta a situacions singulars o patològiques de l'organisme. Per aquest fet també s'anomena a la COX-2 '*forma induïble*' de la ciclooxigenasa.

Des del seu descobriment, aquesta segona isoforma ha atret l'atenció de nombrosos estudis durant les darreres dècades, per caracteritzar-la i clarificar-ne el seu paper en la inflamació, així com en els diferents processos patològics en els que s'hi troba involucrada, i també ha estat estudiada com a una nova diana farmacològica capaç d'aportar major especificitat als tractaments, major potència i menor incidència d'efectes no desitjats.

Les possibilitats que ofereix aquest descobriment d'abordar el tractament de la inflamació amb noves eines terapèutiques, ha conduït a la indústria farmacèutica a interessar-se per desenvolupar antiinflamatoris dirigits específicament a la COX-2, originant un subgrup de fàrmacs, una nova família dins els AINEs coneguda com a *coxibs* i que presenten una inhibició selectiva per la COX-2 en front de la COX-1, el que teòricament contribuiria a no inhibir les prostaglandines fisiològiques i per tant, no inhibir els seus efectes beneficiosos per l'organisme, reduint per tant, els efectes no desitjats que se'n poden derivar d'aquesta inhibició per l'ús d'antiinflamatoris. En canvi, aquest grup de fàrmacs, si que actuaria sobre les prostaglandines produïdes per la isoforma COX-2 que s'indueix en determinats estats patològics.

Tot i l'expectativa inicial, els resultats no han estat excessivament encoratjadors ja que alguns d'aquests COX-2 selectius com el *Robecoxib* van demostrar no tenir avantatges significatives sobre els AINEs no selectius ja existents i al contrari, podien tenir efectes adversos importants que deixaven en entredit el binomi risc-benefici, fent que els riscos associats a l'ús terapèutic d'aquest fàrmac superés els seus potencials beneficis, fet que va portar a la seva retirada del mercat.

Així, tot i l'expectativa que inicialment havia suscitat el seu descobriment, i la possibilitat d'un ús massiu en substitució dels AINEs convencionals no selectius, la realitat terapèutica és que els *coxibs* només s'utilitzen en determinats tractaments i en general a la pràctica clínica no s'ha acabat imposant una diferència substancial de millora respecte els AINEs convencionals, és a dir, els AINEs no selectius que continuen aclaparant l'escenari terapèutic, quedant els *coxibs* relegats a usos especialitzats, en pacients i teràpies concretes prescrites habitualment per especialistes en traumatologia i reumatologia.

No obstant, l'aprofundiment en l'estudi de la COX-2 ha conduït a troballes interessants i usos potencials en altres malalties no directament relacionades amb les indicacions tradicionals dels AINEs. S'ha observat una expressió augmentada de la COX-2 en malalties com el càncer, el que ha fet plantejar pels AINEs en general, una potencial utilitat terapèutica en aquestes malalties, fent reviure l'interès pels *coxibs* com a inhibidors selectius de la COX-2 en vistes a aproximacions terapèutiques innovadores en la prevenció i tractament del càncer.

Amb posterioritat s'ha postulat l'existència d'una tercera isoforma, la COX-3 de distribució en determinats òrgans i a la que se li atribueix la formació d'endopirògens promotors de les reaccions pirètiques de l'organisme. El que va portar a intuir l'existència d'aquesta tercera isoforma és la manca d'explicació del perquè el paracetamol, una molècula que malgrat estar classificada dintre de la família dels AINEs, resulta estructuralment atípica dins d'aquesta família de fàrmacs, amb efectes col·laterals diferents de la resta d'antiinflamatoris, amb baixa

capacitat d'inhibir la COX-1 i la COX-2, i un baix poder antiinflamatori, en canvi, actuava com a potent antipirètic i analgèsic. El mateix succeïa amb la manca d'explicació en les correlacions entre la potència antiinflamatòria dels diferents AINEs i el seu poder antipirètic. L'explicació podia situar-se al voltant de l'existència d'una tercera isoforma de COX, la COX-3, confirmada mitjançant l'aïllament de la seqüència genètica que la codifica i que en realitat es tractaria d'una variant de la COX-1.

La COX-3 seria l'enzim responsable de produir mediadors del dolor i de la febre a partir de l'àcid araquidònic, però no mediadors de la inflamació, el que explicaria les correlacions entre l'afinitat dels diferents AINEs per les cadascuna de les formes COX i els seus perfils analgèsics, antipirètics o antiinflamatoris.

**Taula 7:** Valors de  $IC_{50}$  del AINEs sobre les diferents isoformes de COX (Chandraskharan i col., 2002)

Fàrmac	$IC_{50}$ $\mu$ M		
	COX-1	COX-2	COX-3
Paracetamol	>1000	>1000	460
Aminopirina	>1000	>1000	688
Antipirina	>1000	>1000	863
Aspirina	10	>1000	3,1
Diclofenac	0,035	0,041	0,008
Ibuprofè	2,4	5,7	0,24
Indometacina	0,010	0,66	0,016
Fenacetina	>1000	>1000	102
Cafeïna	>1000	>1000	>1000
Talidomida	>1000	>1000	>1000

*Els assajos s'han dut a terme en presència de 30 $\mu$ l d'àcid araquidònic*

### 5.3. Lisinat d'ibuprofè

L'ibuprofè és un antiinflamatori no esteroïdal (AINE) que pertany a la família dels derivats de l'àcid propiònic igual que el ketoprofè i el naproxè. L'ibuprofè té activitat antiinflamatòria, antipirètica i analgèsica. Probablement és la molècula clínicament més estudiada i utilitzada de tots els AINEs juntament amb l'àcid acetilsalicílic.

La forma d'ibuprofè més comú utilitzada a la indústria és en la forma àcida sense salificar o ibuprofè base, no obstant, l'ibuprofè pot formar sals amb bases i com a tals amb aminoàcids de caràcter alcalí com la lisina o l'arginina. S'està introduint un nombre creixent de sals, esters i altres complexos que van guanyant significació a l'escenari terapèutic, com la sal sòdica, la sal de lisina (lisinat d'ibuprofè) és una d'elles juntament amb les sals d'arginina, esters de guaicol i piridoxina derivats d'isobutil amoni i meglumina. L'ibuprofè té un centre quiral, i tot i que acostuma a administrar-se en forma racèmica, existeixen especialitats farmacèutiques que contenen només l'isòmer S(+) (dexibuprofè).

El principal avantatge de l'ibuprofè en forma de lisinat, és el seu curt període d'absorció a l'estómac i l'intestí prim. La seva solubilitat en els fluids gastrointestinals és superior a la de la forma àcida no salificada, i l'absorció per tant, és significativament més ràpida. La lisina incrementa la solubilitat de l'ibuprofè en aigua i solucions gàstriques, el que incrementa la velocitat d'absorció i en conseqüència la velocitat de la resposta terapèutica. L'ibuprofè en forma de lisina és 100 vegades més soluble que l'ibuprofè base. Així, mentre la  $C_{max}$  per la forma no salificada s'assoleix entre 1 h i 2 h després de l'administració, pel lisinat d'ibuprofè la  $T_{max}$  és de 30 a 60 minuts. Un inici ràpid de l'acció farmacològica pot ser desitjable per a algun tipus d'afecció com les cefalees o altres tipus de dolor agut. Entre els desavantatges del lisinat d'ibuprofè hi hauria el seu elevat pes molecular, 340 mg de lisinat d'ibuprofè equivalen a un

pes de 200 mg d'ibuprofè base, el que en limita l'ús per algunes formes farmacèutiques com els comprimits ja que per assolir les pautes de dosificació habituals d'entre 400 mg i 600 mg d'ibuprofè base per dosi, en resultarien comprimits excessivament grans amb un contingut de lisinat d'ibuprofè de 683 mg i 1225 mg.

Degut al seu efecte antiinflamatori, antipirètic i analgèsic el lisinat d'ibuprofè s'utilitza en el tractament d'afeccions inflamatòries com l'artritis reumatoide, osteoartritis, espodilitis anquilosant, dolor entre suau i moderat, dismenorrea, cefalees vasculars i febre. Els usos com a antipirètic i analgèsic es fan a dosis baixes (equivalent a 200 - 400 mg de base). Els nivells de dosificació pel tractament anti-reumàtic se situa entre 1,2 g a 3,2 g al dia d'ibuprofè base per via oral dividit en tres o quatre dosis individuals.

Des d'un punt de vista farmacològic, no hi ha diferències entre el lisinat d'ibuprofè i l'ibuprofè base. El seu mecanisme d'acció es per inhibició no selectiva i reversible de la COX. De fet l'ibuprofè té afinitat d'inhibició eficaç de les tres formes de COX, fet que explicaria la seva activitat antiinflamatòria, antipirètica i analgèsica.

Les prostaglandines es troben distribuïdes en diferents teixits i tenen entre d'altres propietats efectes potents sobre la musculatura llisa.

En el cas d'estímuls inflamatoris o desordres del flux sanguini, les prostaglandines es sintetitzen en quantitats elevades, fent els teixits sensitius a l'acció d'altres agents tals com la histamina i les cinines. Com a resultat es produeixen símptomes com el dolor i la inflamació. La incidència de febre és deguda a la influència de les prostaglandines al centre de regulació de temperatura a l'hipotàlem, on actua elevant el valor d'ajust de temperatura normalment a un valor de 37°C.

L'efecte inhibitori dels AINEs sobre la síntesi de prostaglandines és el principal responsable dels seus efectes secundaris.

Les prostaglandines juguen un paper important en les funcions fisiològiques tals com la funció protectora mitjançant la síntesi de la secreció alcalina per les cèl·lules de la mucosa gàstrica. La inhibició de la síntesi de prostaglandines elimina els efectes protectors de la mucosa gàstrica provocant afectació d'aquesta, dolor abdominal i ulceracions.

De tots els AINEs, l'ibuprofè presenta el millor perfil risc-benefici causant la més baixa incidència de reaccions gastrointestinals adverses.

### 5.3.1. Característiques generals

#### Nom químic

Ibuprofè lisinat ó p-Isobutilfenil-2-propionat de lisina

#### Nom IUPAC

(2S)-àcid 2,6-diaminohexanoic; 2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoic àcid

#### Número CAS

57469-77-9

### Sinònims

2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanoic àcid lisinat  
Àcid benzenacètic,  $\alpha$ -metil-4-(2-metilpropil) lisinat  
p-isobutilhidratropic àcid lisinat  
2-p-isobutilfenilpropionic àcid lisinat

### Fórmula molecular

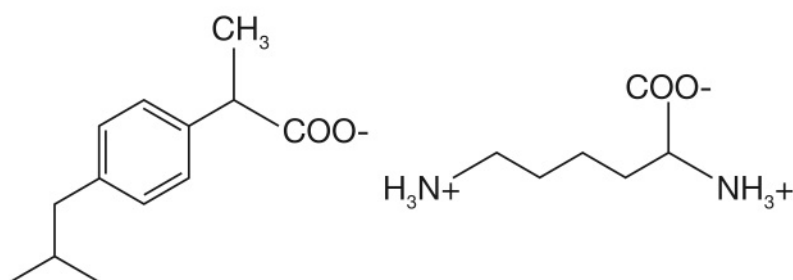
$C_{19}H_{32}N_2O_4$

### Massa molecular

352,48 g/mol

### 5.3.2. Estructura química

**Figura 10:** Estructura molecular del lisinat d'ibuprofè



### 5.3.3. Propietats químiques i fisicoquímiques

#### Aspecte

Pols blanc cristal·lí

#### Punt de ebullició

319.6 °C a 760 mmHg

#### Punt d'ignició

216.7 °C

#### Solubilitat

DMSO < 1 mg/mL

Aigua > 71 mg/mL

Etanol < 1 mg/mL

#### 5.3.4. Aspectes farmacològics i clínics

##### 5.3.4.1. Farmacodinàmica

El principal mecanisme d'acció de l'íbutprofè radica en el bloqueig de la síntesis de prostaglandines per inhibició no selectiva i reversible de les isoformes de l'enzim ciclooxigenasa 1, 2 i 3 (COX-1, COX-2 i COX-3).

Tal com s'ha descrit anteriorment, els antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) són un grup de fàrmacs que presenten propietats analgèsiques, antitèrmiques i antiinflamatòries. El seu mecanisme d'acció és la inhibició de la síntesis de prostaglandines.

Des d'un punt de vista farmacodinàmic, no s'observen diferències entre el lisinat d'íbutprofè i l'íbutprofè base donat que la forma activa és la forma àcida de l'íbutprofè i per tant, el mecanisme d'acció per ambdós productes suposa la inhibició reversible del enzim ciclooxigenasa (COX) responsable de la biosíntesis de les prostaglandines (PGs) a partir de l'àcid araquidònic a la membrana cel·lular.

L'íbutprofè té un centre quiral, el que fa que existeixin dos isòmers òptics, dels quals l'enantiòmer de configuració S (Dexíbutprofè) i associat a l'enantiòmer (+), presenta una activitat inhibidora de la COX-1 100 vegades més potent que la forma R (Kumaresan, 2010). No obstant, els preparats comercials habitualment es presenten i s'utilitzen en la forma racèmica. Si bé l'enantiòmer R(-) de l'íbutprofè a la pràctica pot considerar-se inactiu, l'organisme té mecanismes per transformar-lo irreversiblement en l'enantiòmer actiu S. (Geisslinger i col., 1989). Aquesta transformació succeeix de forma lenta, el que justifica en alguns casos productes que contenen només l'enantiòmer actiu S(+).

L'enantiòmer S(+) mostra equipotència amb la meitat de la dosi del racèmic i per tant, les dosis a prescriure han de ser inferiors quan s'utilitza la forma activa en comptes del racèmic (Kumaresan 2010). L'isòmer R presenta una inhibició de la COX amb una potència de dos ordres de magnitud menys que el S (Boneberg i col., 1996; Neupert i col., 1997) i tot i que *in vivo*, en totes les espècies l'isòmer R és invertit de manera unidireccional cap a la forma més activa S, no obstant, la inversió de R-íbutprofè produeix només una tercera part de la AUC obtinguda després d'administrar l'enantiòmer S- pur (Geisslinger i col., 1989b).

L'enantiòmer R(-) (distòmer) *in vivo* pateix una bioinversió unidireccional cap a l'enantiòmer actiu S(+) (eutòmer), via la formació del tioèster d'acil CoA del 2-arilpropionat. La proporció i magnitud de la inversió varia d'unes espècies animals a altres. D'altra banda, s'ha postulat un comportament farmacocinètic diferent per cadascun dels dos enantiòmers (Hutt i Caldwell, 1983; Fournel i Caldwell, 1986; Caldwell i col., 1988).

Els processos d'absorció, distribució, unió a teixits, metabolisme i extracció de fàrmacs quirals poden presentar diferències estèroselectives. (Hutt i Caldwell, 1983; Ariens, 1986; Jamali et al 1989; Geisslinger i col., 1989b; Tucker, 1990). Així, es fa evident que la interpretació de la farmacocinètica de l'íbutprofè i altres profens quirals depenen de la esteroselectivitat en la cinètica de disposició. Per tant, es fa necessari mesurar els enantiòmers de l'íbutprofè en comptes de la concentració d'íbutprofè total (Ariens, 1986; Jamali et al 1989). Les diferències existeixen en la definició dels llocs d'inversió quiral de l'enantiòmer R(-) al S(+) si aquests són sistèmics o pre-sistèmics (Jamali i col., 1989 i 1992). Aquests autors, van suggerir que la inversió quiral pre-sistèmica es produeix a l'intestí, no obstant, no van excloure la possibilitat d'inversió sistèmica. Tanmateix, s'associa els temps d'absorció superiors a una major magnitud d'inversió quiral. Una inversió significativa de l'àcid 2-fenilpropioní va ser descrita en fetge i ronyó de rata (Nakamura i Yamaguchi, 1987).

Jeffrey i col., 1991 van concloure que la inversió de R(-) ibuprofè a l'enantiòmer S(+) succeeix en el fetge però no succeeix ni en la part mucosal ni en la part serosal de l'intestí de rata. Pels humans no s'ha proposat una inversió quiral pre-sistèmica dels enantiòmers de l'ibuprofè.

Fins ara la farmacocinètica dels enantiòmers de l'ibuprofè s'ha investigat principalment després de l'administració oral (Jamali i col., 1988 i 1992; Geisslinger i col., 1990 i 1993; Hall i col., 1993; Li i col., 1993; Fornasini i col., 1997) i rarament després de l'administració intravenosa (Eller i col., 1989, Hermann i col., 1993, Hermann, 1995). Tanmateix, existeix desacord a la literatura pel que fa a les semivides d'eliminació dels enantiòmers. Alguns estudis parlen d'una davallada paral·lela de les concentracions plasmàtiques dels enantiòmers. (Geisslinger i col., 1990; Rudy i col., 1991; Hall i col., 1993; Jamali i col., 1998), mentre que altres autors han trobat una eliminació més ràpida de l'enantiòmer R (Lee i col., 1985; Cox i col., 1988; Avgerinos and Hutt, 1990).

#### 5.3.4.2. Farmacocinètica

Si bé a nivell farmacodinàmic el lisinat d'ibuprofè no presenta diferències respecte l'ibuprofè base, a nivell biofarmacèutic i farmacocinètic si que hi ha diferències que es deriven de la major solubilitat del lisinat respecte l'ibuprofè base.

El lisinat d'ibuprofè és una sal del derivat arilpropionídic d'ibuprofè. Presenta uns avantatges enfront l'ibuprofè base, principalment a nivell farmacocinètic, destacant:

*Absorció:* La solubilitat del lisinat d'ibuprofè en aigua és molt més elevada que la de l'ibuprofè àcid. S'absorbeix més ràpidament a l'estómac i l'intestí prim. La sal soluble millora la solubilitat digestiva, aconseguint-se una dispersió més homogènia sobre la superfície gàstrica, conduint a una absorció més ràpida y un efecte menor sobre la mucosa gàstrica (Geisslinger i col., 1989a).

L'absorció més ràpida de la sal de lisina és deguda a la seva major solubilitat a pHs baixos.

Beaver (2003) y Cooper i col. (1994), destaquen que l'absorció de l'ibuprofè àcid es veu influenciada si aquest compost es troba en forma de sal (amb arginina o en forma de sal de lisinat o potàssica). Per exemple, en cirurgia 400 mg d'ibuprofè en forma de lisinat, produeixen un efecte analgèsic més ràpid i potent que l'administració de comprimits d'ibuprofè àcid 400 mg.

Kumudhavalli i col. (2010), també varen demostrar un efecte més ràpid del lisinat d'ibuprofè en comparació amb l'ibuprofè base. Mentre que Mehlich i col. (1995), varen demostrar l'efecte més ràpid i superior d'aquesta sal en comparació en aquest cas amb el paracetamol.

Milles i col. (2018), van fer un estudi farmacocinètic comparatiu d'ibuprofè en forma de sal (lisina o arginina) *versus* ibuprofè àcid, arribant a la conclusió que amb les sals d'ibuprofè s'aconsegueix més ràpida absorció i concentracions plasmàtiques superiors.

*Biodisponibilitat:* Els nivells plasmàtics màxims del lisinat d'ibuprofè s'assoleixen ràpidament amb una  $T_{max}$  entre 30-60 minuts, mentre que amb l'ibuprofè àcid la  $T_{max}$  es situa entre 60 i 120 minuts, depenent de la forma farmacèutica.

*Metabolisme:* L'ibuprofè es metabolitza àmpliament al fetge.

*Unió a proteïnes plasmàtiques:* Pel que fa a la unió amb proteïnes l'ibuprofè presenta entre un 90% i 99% de capacitat d'unió.

*Excreció:* Aquest compost s'excreta pels ronyons essent la seva semivida d'eliminació de 2 hores.

S'elimina majoritàriament per l'orina: un 90% en forma de metabòlits inactius conjugats amb àcid glucurònic i un 10% en forma inalterada. Després de 24 hores és eliminat el 100% per l'orina.

Estudis farmacocinètics comparatius entre ibuprofè base i el lisinat d'ibuprofè demostren que:

- S'absorbeixen en quantitats similars
- S'assoleix una concentració plasmàtica màxima més elevada pel lisinat d'ibuprofè
- Amb el lisinat d'ibuprofè es triga menys temps per arribar a la concentració màxima
- Igual semi-vida d'eliminació

#### 5.3.4.3. Indicacions

Les indicacions aprovades pel lisinat d'ibuprofè són:

Per via oral: Tractament simptomàtic del dolor d'intensitat lleu a moderada i de processos inflamatoris no crònics, tals com cefalea, odontàlgia, dolor post-operatori, dolor músculo-esquelètic i dolor menstrual (ref: AGEMED/ CIMA).

Per via intravenosa: Per tancar un *ductus* arteriós persistent clínicament significatiu en nounats prematurs (< 32 setmanes de gestació) i pesos entre 500 i 1500 g, quan les estratègies habituals no resulten efectives. (FDA).

#### 5.3.4.4. Formes Farmacèutiques

Les formes farmacèutiques i dosificacions més habituals es comercialitzen en forma de pólvores per dispersar en aigua, es presenta habitualment en sobres monodosi que contenen lisinat d'ibuprofè a raó de: 1025 mg, 683 mg i 342 mg corresponents a dosis d'ibuprofè base de 600 mg, 400 mg i 200 mg respectivament. També es comercialitza en forma de xarops, suspensions, pólvores i comprimits efervescents i en forma de solució injectable amb una concentració de lisinat d'ibuprofè de 17,1 mg/ml (equivalent a 10 mg /ml d'ibuprofè en forma de base) per ser administrada a nounats prematurs per via intravenosa.

#### 5.3.4.5. Posologia i forma d'administració

La via d'administració habitual del lisinat d'ibuprofè és la oral. La posologia, s'adapta a la intensitat de la simptomatologia i a l'evolució del tractament que s'administra repartit en tres o quatre dosificacions diàries, no obstant, no s'ha d'excedir una dosi total diària equivalent a 2.400 mg de Ibuprofè en adults i 1600 mg en adolescents (edat > 14 anys).

La forma injectable s'administra per via intravenosa a nounats a dosis d'entre entre 5 i 10 mg/kg d'ibuprofè.

#### 5.3.4.6. Avantatges del lisinat d'ibuprofè

- 1.- Efecte d'inici més ràpid quan es compara amb l'ibuprofè base.
- 2.- Reducció del dolor superior, major eficàcia i major efecte analgèsic (*Martindale*).
- 3.- Resposta terapèutica més homogènia i reproduïble.
- 4.- Quan s'administra amb l'estómac buit s'obtenen concentracions plasmàtiques significativament més elevades.
- 5.- Permet ampliar les estratègies galèniques i formes farmacèutiques, per exemple es pot formular en forma d'injectable per administració intravenosa (Neoprofen®).

La gran majoria d'indicacions pel tractament del dolor requereixen d'un inici de l'acció el més ràpid possible. Per l'administració oral d'un fàrmac, l'inici desitjat del seu efecte farmacològic depèn de diferents passos successius: la dissolució de la formulació, l'arribada al lloc d'absorció (habitualment les parts jejunals de l'intestí prim, la permeació a través de les membranes biològiques, l'entrada a la circulació portal (amb el potencial metabolisme entèric o hepàtic de primer pas), la distribució del plasma al lloc d'acció, i la interacció amb el receptor, el que causa una cascada d'esdeveniments que condueixen a la modificació farmacològica pretesa. La distribució a altres teixits, el metabolisme i excreció d'un principi actiu, pot també afectar la disponibilitat ràpida del fàrmac al lloc efector. Per a molts fàrmacs, la manera com es produeix l'increment inicial de la concentració plasmàtica després de la seva administració oral, resulta crític, considerant el temps necessari per l'inici de l'efecte farmacològic desitjat.

L'ibuprofè presenta una baixa solubilitat en medi aquós àcid, no obstant és altament permeable a través de les membranes biològiques (Bjarnason i col., 2018) degut a la gairebé completa absorció, tot i així, l'inici de l'absorció de l'ibuprofè depèn en gran mesura de la dissolució i per tant de la formulació en què aquest s'administra.

La salificació en forma de sal de lisina, és una de les estratègies adoptades per millorar la solubilitat del principi actiu i aconseguir així un inici més ràpid de l'acció, però també s'han dissenyat formes farmacèutiques que afavoreixen un ràpid alliberament de l'ibuprofè en el tracte gastrointestinal (Geisslinger i col., 1989a; Miles i col., 2018).

### 5.4. Nous horitzons terapèutics pels AINEs

#### 5.4.1. Els AINEs en el tractament de càncer

Diversos estudis clínics, estudis en animals i estudis d'experimentació en el laboratori han evidenciat que els AINEs que s'utilitzen habitualment pel tractament del dolor i pel tractament de la inflamació tenen també efectes anticarcinogènics sobre alguns tipus de càncer com el de colòn (Thun i col., 1991; Logan i col., 1993; Giovannucci i col., 1994; Peleg i col., 1994).

Alguns d'aquests estudis han demostrat un increment dels nivells de prostaglandines a les cèl·lules tumorals colòniques (Bennett i col., 1977; Yamguchi i col., 1991; Rigas i col., 1993; Pugh i Thomas, 1994;). Això està associat a una expressió incrementada de la forma isoenzimàtica COX-2, però no de la COX-1 (Eberhart i col., 1994; Kargman i col., 1995; Sano i col., 1995).



Diversos treballs han trobat una relació entre l'administració de AINEs i la disminució del creixement de tumors, no obstant, aquesta no ha anat associada o no s'ha pogut relacionar en tots els casos directament amb la potència antiinflamatòria o la capacitat d'inhibició COX de l'AINE en qüestió, postulant una possible inducció d'apoptosi de les cèl·lules canceroses per part d'aquests AINEs.

S'ha observat que fins i tot els enantiòmers inactius dels AINES, és a dir, aquells isòmers òptics que no tenen capacitat o amb capacitat molt reduïda per unir-se a l'enzim COX eren capaços d'induir apoptosi en línies cel·lulars amb independència de l'expressió de COX-2 o de la producció de prostaglandines (Hanif i col., 1996).

D'altra banda, els inhibidors selectius de COX-2 com el celecoxib, han mostrat tenir mecanismes anticarcinogènics tant dependents de COX com independents (Maier i col., 2004; Grosch i col., 2006).

També l'ibuprofè, ha mostrat inhibir l'inici del tumor i la proliferació en el càncer de pròstata, càncer de pit i en el càncer de còlon (Reddy i col., 1996; Harris i col., 1999 i 2003; Nelson i Harris, 2000; Andrews i col., 2002; Yao i col., 2005). No obstant, encara es desconeixen en gran mesura els mecanismes moleculars mitjançant els quals es produeix aquest efecte farmacològic.

Una revisió realitzada sobre 91 estudis epidemiològics que permetien avaluar la dosi-resposta i nivell d'ingesta d'AINEs associada al risc relatiu de patir 10 afeccions malignes humanes que incloïen els tipus principals: Càncers de còlon, mama, pulmó i pròstata, va posar de manifest una davallada exponencial significativa en el risc de patir-les associat a l'increment d'ingesta d'AINEs (principalment aspirina o Ibuprofè).

La ingesta diària de AINEs produïa reduccions del risc del 63% pel càncer de còlon, 39% pel càncer de mama, 36% pel càncer de pulmó i 39% pel càncer de pròstata. Tanmateix, també es van observar reduccions significatives pel càncer de ovaris (47%), càncer esofàgic (73%) i càncer d'estómac (62%).

Els efectes protectors del consum de AINEs es posa de manifest a partir dels 5 anys i aquests són més forts en la mesura que s'allarga la durada del tractament. A partir d'aquests estudis s'observa que aquests efectes es fan més evidents en els processos tumorals gastrointestinals (esòfag, estómac i còlon). Alguns d'aquests estudis suggereixen un major efecte anticancerígen per l'ibuprofè que per l'aspirina.

Estudis epidemiològics sobre el melanoma maligne, el limfoma de Hodgkin i leucèmia en adults posen de relleu l'efecte protector dels AINEs també en aquestes malalties.

#### 5.4.2. Mecanisme d'acció antitumoral dels AINEs

Un dels aspectes importants per la instauració i proliferació d'un teixit tumoral és la capacitat d'aquest per formar nous vasos sanguinis dels que nodrir-se a mesura que va creixent. Són molts estudis que han mostrat una relació entre angiogènesi i expressió de COX-2 (Xiong i col., 2003; Rosas i col., 2014). La COX-2 indueix diversos factors proangiogènics (Tsuji i col., 1998; Lugano i col., 2020) a banda de produir prostaglandines que s'ha vist que tenen funcions autocrines i paracrines en la proliferació i migració de cèl·lules endotelials *in vitro* (Tsuji i col., 1998; Sobolewski i col., 2010). A les cèl·lules endotelials tumorals activades la COX-2 està sobreexpressada, mentre que la COX-1 s'expressa a les cèl·lules endotelials normals (Félétow i

col., 1998). Les prostaglandines derivades de la COX-2 estimulen l'angiogènesi *in vivo*, i la inhibició de la COX-2 a les cèl·lules endotelials tumorals alenteix el creixement del tumor, amb independència de la expressió de la COX-2.

Mitjançant la utilització de models *in vitro* de co-cultiu de cèl·lules endotelials i cèl·lules de carcinoma de còlon, s'ha trobat que la COX-2 modula la producció de factors angiogènics per les cèl·lules tumorals, mentre que la COX-1 fa el mateix però en les cèl·lules endotelials de teixits normals (Leahy i col., 2000; Goradel i col., 2018). Resultats similars també s'obtenen en estudis *in vivo* realitzats en models de càncer de còlon en ratolins (Tomosawa i col., 1999; Sheng i col., 2020).

S'ha establert la hipòtesi de dos mecanismes mitjançant els quals els AINES poden mediar la inhibició de l'angiogènesi, d'una banda la inhibició de la COX-2 que té com a conseqüència la *down-regulació* dels factors proangiogènics i d'altra banda la inhibició de l'activitat COX-1 de les cèl·lules endotelials. Altres estudis postulen aquestes dades mitjançant estudis *in vivo*, enfocats en el paper del *celecoxib* en la inhibició de la formació de vasos sanguinis, creixement tumoral i desenvolupament de les metàstasis (Jang i col 2002; Klenke i col 2006; Dai i col., 2012).

Un altre mecanisme mitjançant el qual actuarien els AINES davant les cèl·lules tumorals i que explicaria perquè en alguns casos la potència antiinflamatòria o afinitat COX d'alguns fàrmacs no es correlaciona amb la seva capacitat quimioprotectiva, és per inducció d'apoptosi de les cèl·lules tumorals. La inhibició COX pels AINES impedeix que reaccioni l'àcid araquidònic per donar lloc als eicosanoides derivats. Quan això succeeix l'àcid araquidònic en no poder reaccionar queda en excés i és aquest excés el que indueix el procés apoptòtic cel·lular.

#### 5.4.3. Els AINES i el càncer de còlon

Estudis epidemiològics han descrit una reducció d'entre el 30 i el 50% en la incidència de la malaltia, dels pòlips adenomatosos i de la mort produïda pel càncer colorectal amb l'ús regular d'aspirina i AINES (Collet i col., 1999; Kuzick i col., 2009; Coghill i col., 2012; Reimers i col., 2012). La continuïtat del tractament i la durada d'aquest esdevenen factors crítics (Peleg i col., 1996; Garcia-Rodríguez i Huerta-Álvarez, 2000; Chan i col., 2005).

S'han publicat estudis prospectius que han demostrat l'eficàcia de fàrmacs com el *sulindac* o el *celecoxib* en la supressió de pòlips adenomatosos i en la regressió de pòlips existents en pacients amb poliposi familiar, (Matsuhasi i col., 1997; Steinbach i col., 2000; Bertagnolli i col., 2006) i per tant, la seva utilitat en el tractament i sobretot prevenció del càncer colorectal. De fet, el *celecoxib* va obtenir l'any 1999 l'autorització de la FDA com a teràpia preventiva per pacients amb elevat risc de càncer colorectal. L'Institut Nacional del Càncer NCI (EEUU), promou i esponsoritza assajos clínics amb coxibs com a quimioprevenció d'altres tipus de tumor.

La sobreexpressió de COX-2 observada en processos tumorals humans ha estat estudiada i se'n ha pogut determinar les vies mitjançant les quals es produeix, i els senyals bioquímics que actuen com a disparadors (Tomosawa i col., 1999; Szweda i col., 1999; Dore, 2011), principalment en els càncers de còlon i de fetge, no obstant, es desconeix de moment si els mecanismes de la seva modulació són els mateixos en altres línies cel·lulars tumorals.

#### 5.4.4. L'ibuprofè per la prevenció del càncer de còlon

Des de la seva aprovació l'any 1969, l'ibuprofè, inicialment desenvolupat pel tractament del dolor i de la inflamació, actualment veu com la seva utilització pot tenir un nou horitzó terapèutic. Molts estudis prospectius (cas-control) han evidenciat que l'ús dels AINEs serveix també per reduir el risc de càncer.

Nelson i Harris l'any 2000 van observar una reducció del risc de càncer de pròstata per l'ús d'ibuprofè i Harris i col. (2003), van demostrar en un estudi prospectiu que l'ús regular d'ibuprofè durant anys anava acompanyat d'una disminució del risc de patir càncer de mama. L'eficàcia dels AINEs en la prevenció del càncer de còlon està suficientment avalada per diversos estudis (Cheng i col., 1997), no obstant, la implementació d'aquests tractaments es mira amb certa reticència pels terapeutes degut als efectes colaterals associats a l'ús crònic dels AINEs, sobretot pel que fa al potencial risc de desenvolupar úlceres sagnants. En aquest sentit l'ús d'AINEs amb una millor tolerància i menor incidència d'efectes adversos pot ser una opció.

Els inhibidors selectius COX-2 (coxibs) amb baixa toxicitat gastrointestinal podrien ser la resposta, no obstant, el tractament amb aquest tipus de fàrmacs s'ha associat a episodis cardiovasculars adversos inclús en exposicions curtes i esporàdiques (Sooriakumaran, 2006; Patrono, 2016). En conseqüència aquest conjunt d'efectes negatius limita l'aplicació clínica dels AINEs en quimioprevenció del càncer colorectal. Existeix per tant un interès renovat en el desenvolupament de AINEs no selectius per a ús clínic en quimioprevenció, principalment aquells que evitin els efectes gastrointestinals.

Alguns estudis han apuntat cap a l'ibuprofè com a un dels AINEs seleccionats per la prevenció del càncer colorectal per la seva bona tolerància general i baix risc associat al seu consum. Els AINEs amb capacitat d'inhibir la COX-1 i la COX-2 presenten un historial destacable pel que fa a la quimioprevenció del càncer colorectal (Ricchi i col., 2003; Wang i col., 2010). Aquests efectes estan relacionats amb la capacitat d'aquest fàrmac d'inhibir la producció de prostaglandines proliferatives i proinflamatòries, principalment la PGE2.

Tradicionalment els efectes anticancerígens dels AINEs s'han justificat per la inhibició de la COX, no obstant, en el cas de l'ibuprofè, mentre que l'enantiòmer S és un potent inhibidor de la COX-1 i la COX-2, l'enantiòmer R representa una potència d'entre dos i tres ordres de magnitud menys que l'enantiòmer S. Jansen i col. (2008), van estudiar la importància dels mecanismes COX en la protecció del càncer pels AINEs, i més específicament es van interessar per la influència de la isoforma induïble COX-2 fent un experiment amb una línia cel·lular de carcinoma de còlon humà que expressava COX-1 i COX-2 i amb una altra línia de carcinoma de còlon deficitària en COX-2. Es va veure que l'ibuprofè té efectes anticarcinogènics tant en les cèl·lules que expressen COX-2 com a les COX-2 deficientes el que suggereix altres mecanismes implicats en l'efecte anticancerigen a banda de la inhibició COX.

Diversos autors han proposat altres dianes independents de COX per l'ibuprofè que podrien tenir efecte en l'acció antitumoral. En aquests mateixos experiments *in vivo*, l'enantiòmer S tenia efectes similars a l'enantiòmer R el que inicialment podia suggerir un mecanisme d'acció independent de COX, no obstant, cal tenir present que en els organismes vius l'ibuprofè R es transforma en el seu enantiòmer més actiu S d'una manera irreversible, el que també podria explicar algun d'aquests resultats.

Diversos estudis a doble cec i controlats per placebo, han posat de manifest que tant els inhibidors selectius COX-2 *celecoxib* i *rofecoxib* com els no selectius com aspirina i sulindac, són efectius en la reducció de la recurrència d'adenomes així com el risc de càncer colorectal.

## 6. SISTEMES D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS DE LOCALITZACIÓ ESPECÍFICA

### 6.1. Introducció

Els sistemes d'alliberament de fàrmacs específics per una localització, permeten alliberar el fàrmac a un lloc determinat, per exemple dintre del tracte gastrointestinal. L'alliberament és controlat habitualment per factors de l'entorn en què es troba el sistema d'alliberament del fàrmac, tals com diferències de pH (Almeida i col., 2012) o presència d'enzims al tracte intestinal (Newton i col., 2012; Hua i col., 2015; Lee i col., 2020).

El sistema d'alliberament més senzill, seria una forma de dosificació amb recobriment entèric que allibera el fàrmac immediatament després de la dissolució de la coberta entèrica. El temps de latència abans de l'alliberament depèn principalment del nivell de recobriment, del tipus de polímer entèric i del temps de residència a l'estómac. Es poden aconseguir temps més llargs de retenció del fàrmac amb polímers que es dissolen a valors de pH més elevats i amb nivells més elevats de recobriment. Els temps de latència en condicions *in vivo*, no obstant són més variables, especialment amb sistemes de dosi única com comprimits o càpsules degut a la variabilitat del temps de residència gàstric (Streubel i col., 2006; Bagul i col., 2012).

El temps de residència gàstric es pot situar al voltant dels 40 minuts amb l'estómac buit i al voltant d'uns 250 minuts després d'un esmorzar de 2200 kJ i fins a més de 9 hores després d'un àpat i ingesta adicional "d'snacks" (Ewe i col. 1991). Una forma de dosificació única recoberta entèricament després de la seva administració al matí pot ser retardada fins a la nit.

### 6.2. Sistemes d'alliberament colònic

El còlon és un lloc interessant tant per l'alliberament local com per l'alliberament sistèmic de fàrmacs. Amb fàrmacs com la sulfasalacina, la mesalacina o glucocorticoids com la prednisona, budesonida o la dexametasona s'aconsegueixen teràpies locals pel tractament d'alteracions inflamatòries com la *malaltia de Crohn* o bé la *Colitis ulcerosa* (Mahadevan, 2004).

El còlon pot ser també un lloc potencial d'absorció per fàrmacs de naturalesa peptídica degut a l'elevada permeabilitat de la membrana i la baixa activitat enzimàtica en aquesta part del tracte digestiu. L'alliberació colònica ha estat investigada per a pèptids com la insulina i la vasopressina (Saffran i col., 1986; Mahkam i col., 2006).

S'ha trobat insulina intacta absorbida des del còlon, així com també des del duodè, no obstant, quan l'absorció és colònica condueix a nivells d'insulina sanguinis més elevats i més llargs (Atchison i col., 1989). La via transcitòsica s'ha demostrat mitjançant marcatge amb or de la proteïna. La insulina introduïda en el lumen del duodè i còlon de rata, sembla ser ràpidament internalitzada per les cèl·lules epitelials i transferida a través de la via transcitòsica.

Es considera que el còlon posseeix '*condicions de compartiment tancat*' (Rubinsteiin i col., 1997). Un moviment propulsiu lent no només dona com a resultat uns temps d'exposició més llarg del fàrmac als enzims proteolítics, sinó que també propicia la perllongació del temps de residència i una lenta dilució dels potenciadors de l'absorció o inhibidors de peptidasa. Aquesta és l'explicació dels perfils farmacocinètics plans que s'observen.

### 6.3. Sistemes d'alliberament colònic controlats per pH

Un fàrmac dirigit de manera específica al còlon pot ser possible gràcies a les diferències de pH entre el pH àcid de l'estómac i el pH de l'ili (Nugen i col., 2001). Els polímers entèrics utilitzats per a formulacions colòniques inclouen polímers derivats de l'àcid metacrílic com els EUDRAGITs® L i S, que es dissolen a pH 6 i 7 respectivament (Obeidat i col., 2009). No obstant, s'han descrit alguns problemes de fallida de les formes recobertes deguts a desintegració insuficient (Lee i col., 2020).

Tanmateix, l'alliberament del fàrmac en el còlon no ha estat suficientment reproduïble en alguns dels experiments duts a terme amb aquest tipus de recobriment (Philip i col., 2010). Les formulacions amb un recobriment de Eudragit® S han mostrat un comportament diferent en funció del tipus de solució reguladora del pH, tot i tenir un pH final idèntic però concentracions salines diferents.

En altres assajos de dissolució que mimetitzaven els extrems de pH més probables durant el trànsit de la formulació al llarg del tracte gastrointestinal, l'alliberament del fàrmac a partir de formes farmacèutiques originalment dissenyades per l'alliberament colònic, tant podia produir-se en el duodè com no produir-se (Liu i col., 2011).

Un altre motiu per la manca de reproductibilitat *in vivo* pot ser la caiguda de pH a la unió ileocecal deguda a la presència d'àcids grassos de cadena curta (p.e. l'àcid butíric, l'acètic i el propiònic), que són àcids febles amb valors de  $pK_a$  al voltant de 4,8 produïts per la degradació microbiològica dels polisacàrids no-absorbts, els oligosacàrids i els polisacàrids (Topping i Clifton 2001). El pH va caure de 7,4 a 5,7 a l'ili terminal i el còlon dret de voluntaris sans. Una davallada del pH colònic podia ser també relativa a alteracions inflamatòries.

S'han descrit pHs de 2,3 a 4,7 a les parts proximals del còlon en voluntaris sans (Nugel i col., 2020), possiblement causats per la colitis ulcerosa. Si el recobriment de la forma farmacèutica està dissenyat per dissoldre's a pHs més alts, el sistema no es desintegraria al lloc específic desitjat del l'intestí, si es produeix una inesperada caiguda del pH com es descriu més amunt.

Per solventar aquest problema en pacients afectats d'alteració inflamatòria intestinal s'ha proposat la utilització de polímers solubles en àcid com el copolímer l'Eudragit® E (co-polímer de poli-dimetilamaminoetil metacrilat - metilmetacrilat-butilmetacrilat) (Naeem i col., 2015), i així aconseguir un sistema que alliberi el fàrmac al lloc de la inflamació però que no es dissolgui a pHs més elevats. Aquest sistema seria capaç de resistir el pH elevat de l'intestí prim i de les regions no inflamades del còlon. Per protegir el sistema contra el medi àcid de l'estómac seria necessària una coberta entèrica addicional.

Els biopolímers chitosan i alginat, poden ser excipients adequats per un alliberament específic a la zona colònica, d'una banda la naturalesa aniònica de l'alginat i la catiònica del chitosan permeten diferents nivells de recobriment en capes superposades. D'altra banda les matrius d'alginat es contreuen a pHs àcids impeding l'alliberament dels fàrmacs que contenen, permetent així el pas gàstric del sistema sense que el fàrmac sigui alliberat. Les cobertes de chitosan són solubles a pHs àcids, però hi pot haver un rang de pHs a on es desfan més lentament.

Una de les claus pel control de l'alliberament de fàrmac amb una localització específica, és la dissolució del recobriment d'una forma que depengui del pH, aprofitant que a diferents parts del tracte gastrointestinal els pHs del medi són molt diferents. Degut a què la dissolució del recobriment es controlat pel pH, o per la permeabilitat graduada, el fàrmac es alliberat de

manera precisa en una secció específica del tracte digestiu o a temps específics després de la ingesta.

L'estómac té un pH de 1 a 2 (estómac buit) fins 5 (després dels àpats), depenent del tipus i quantitat de la ingesta d'aliment. D'altra banda amb independència de la quantitat d'aliment present, amb la edat, el pH mig de l'estómac també va incrementant. En el duodè es produeix la neutralització parcial dels aliments digerits procedents de l'estómac. La secreció pancreàtica s'encarrega de situar el pH a valors de pH = 5 - 6 en el duodè. A mesura que avancem per l'intestí prim, el pH continua incrementant de manera gradual fins a valors superiors a 7. En el còlon el pH cau novament entre 6 i 7 degut a l'excreció de la flora colònica.



## 7. QUALITAT PER DISSENY (QbD), ESPAIS DE DISSENY I DISSENY D'EXPERIMENTS (DoE)

### 7.1. Introducció

El desenvolupament de formulacions de productes farmacèutics ha deixat de ser un camp de predominança empírica i d'assaig error per esdevenir un territori eminentment sistematitzat a on l'abordatge d'una nova formulació parteix d'una base de coneixement no només de la formulació i les interaccions entre els seus components en una determinada forma farmacèutica, sinó en un sentit ampli de tots els processos implicats en la seva preparació i anàlisi. L'avaluació prèvia de les interaccions entre tots els elements que participen en el procés i que poden conduir a l'èxit o al fracàs del desenvolupament té un caràcter prioritari.

Fases com la pre-formulació esdevenen essencials a l'hora d'adquirir el coneixement necessari i definir el territori experimental dintre del qual amb tota probabilitat s'assoliran els objectius perseguits pel procés de desenvolupament de la formulació, des de la selecció de la composició fins als millors mètodes d'avaluació de la mateixa, passant pel procés productiu òptim i que ofereixi més garanties de qualitat. La sistematització del procés de desenvolupament i posterior avaluació és possible gràcies a les eines d'anàlisi i càlcul estadístic que tenim a l'abast i que simplifiquen aquest procés fent-lo viable i efectiu.

El coneixement de les variables i com aquestes afecten a una determinada formulació o procés farmacèutic permet establir el que es coneix com a *espais de disseny*. El concepte d'espai de disseny consisteix en disposar d'uns rangs de treball per a determinades variables crítiques dintre dels quals es compliran els requisits preestablerts de la formulació o procés, es a dir sempre que les variables es trobin dintre dels valors que delimita l'espai de disseny, el producte estarà dintre de les especificacions prèviament definides (ICH Q8).

Els espais de disseny es defineixen sobre una base de resultats experimentals que permet delimitar-los mitjançant el tractament matemàtic. Així la qualitat per disseny (*Quality by design*) consisteix en una aproximació sistemàtica al desenvolupament farmacèutic que comença amb objectius predefinits, emfatitza la comprensió del producte i del procés així com el seu control sota una base científica sòlida, mitjançant la gestió de riscos de qualitat i l'ús d'eines estadístiques (Wu i White, 2011).

En el camp del desenvolupament farmacèutic podem associar el terme qualitat a l'obtenció d'una formulació, procés o producte que compleixi unes determinades especificacions predefinides amb independència de si es tracta de productes i processos definitius o experimentals. L'espai de disseny esdevé en aquest cas la regió de l'espai experimental a on succeeix la combinació multidimensional i interacció de les variables a estudiar i paràmetres de procés que han demostrat tenir una influència en el resultat desitjat (ICH Q8).

Més enllà de les connotacions pràctiques a nivell experimental i d'assegurament de qualitat en els processos farmacèutics, els espais de disseny tenen implicacions regulatòries pel que fa a les autoritzacions de comercialització i a les condicions i processos aprovats per la fabricació d'un medicament. En aquest sentit quan les variables i paràmetres dels processos es mouen dintre de l'espai de disseny es considera que el resultat serà el desitjat i per tant no implica la consideració de canvi, no obstant, quan no és així, quan queden fora de l'espai de disseny, cal iniciar un procediment regulatori de canvi post-aprovació. En aquest àmbit l'espai de disseny es proposat pel sol·licitant i ha de ser avaluat i aprovat per l'autoritat regulatòria competent.



La qualitat per disseny requereix determinar com les variables de la formulació i del procés influeixen la qualitat del producte. Per aquest motiu resulta imprescindible la comprensió dels factors i dels seus efectes d'interacció mitjançant un conjunt d'experiments. La Qualitat pel disseny es nodreix de l'aplicació d'eines com: Atributs crítics de qualitat (CQAs); disseny experimental (DoE); avaluació i gestió de riscos de qualitat (QRM) i tecnologia analítica de procés (PAT) pel desenvolupament de productes farmacèutics. Les directrius de la *International Conference on Harmonization* (ICH Q8) il·lustren els principis i les eines per implementar la Qualitat per disseny.

## 7.2. Elements i eines que utilitza la QbD

### 7.2.1. Atributs crítics de qualitat (CQAs)

Els atributs crítics de qualitat són propietats físiques, químiques, biològiques o microbiològiques que haurien de trobar-se dintre d'uns límits adequats, rang o distribució per tal d'assegurar la qualitat desitjada del producte. Aquests atributs s'associen generalment al principi actiu, els excipients, els productes intermedis (materials en procés) i el producte acabat.

El nombre i tipologia d'atributs es defineixen en funció de la forma farmacèutica i dels processos implicats. Així, mentre per formulacions sòlides orals es referiria a aquells que poden afectar per exemple la puresa, l'alliberament, la potència i l'estabilitat, per altres tipus de formulació es poden anar afegint altres atributs com serien les propietats aerodinàmiques per productes inhalats, l'esterilitat per productes parenterals, la mida de partícula per suspensions o la densitat aparent per pólvores.

El atributs crítics de qualitat poden anar variant a mida que es disposa de més coneixement i experiència en els materials i processos involucrats i el seu comportament.

### 7.2.2. Avaluació i gestió de riscos de qualitat (QRM)

La gestió de riscos de qualitat s'utilitza amb l'objecte de donar un ordre de prioritats a la llista de potencials atributs crítics de qualitat, la seva avaluació i mitigació. Els atributs crítics de qualitat poden ser identificats mitjançant processos interactius de gestió de riscos de qualitat i experimentació que avaluin les magnituds en les que l'alteració d'aquests atributs poden tenir un impacte en la qualitat del medicament.

La gestió de riscos de qualitat farmacèutica és un procés sistemàtic per l'avaluació, control comunicació i revisió de riscos per la qualitat del medicament al llarg del seu cicle de vida. (ICH Q9).

El resultat d'una avaluació de riscos és o bé una estimació quantitativa del risc o una descripció qualitativa del rang o interval de risc. Quan el risc s'expressa de forma quantitativa, s'utilitza la probabilitat numèrica. De forma alternativa es poden utilitzar descriptors qualitius tals com molt baix, baix, moderat, alt o molt alt, que haurien de ser definits amb el màxim detall possible.

És molt habitual, no obstant, utilitzar un sistema de puntuació que permeti situar els riscos en un sistema de ranking. En aquest cas l'anàlisi de riscos consisteix en objectivament quantitativament un determinat descriptor del risc mitjançant una puntuació numèrica, el que

permet ordenar-lo dintre d'un sistema de prioritats i de rellevància, situar-lo en importància dintre del global del procediment i gestionar-lo d'una forma o altra en funció del lloc que ocupi en el ranking establert.

La puntuació final associada a l'avaluació del risc, surt d'aplicar el producte de les puntuacions parcials de la Severitat (S), la Probabilitat (P) i la Detectabilitat (D). A les taules 8, 9 i 10, podem veure com es pot fer l'assignació de puntuació als descriptors per la severitat, la probabilitat i la detectabilitat respectivament. Aquestes taules són una adaptació de la NTP 679: *Anàlisi modal de fallos i efectos* (AMFE) del INSHT.

**Taula 8:** Classificació del defecte segons la repercussió en el sistema i/o usuari. Severitat (S)

SEVERITAT	CRITERI	VALOR
<b>Molt baixa</b> (repercussions imperceptibles)	No és d'esperar que aquest defecte de petita importància origini un efecte real sobre el rendiment del sistema, probablement passi desapercebut pel client.	<b>1</b>
<b>Baixa</b> (repercussions irrelevants gairebé imperceptibles)	El tipus de defecte originaria una petita inconveniència pel sistema. Probablement s'observés un lleuger deteriorament en el rendiment del sistema sense importància. És fàcilment subsanable.	<b>2 - 3</b>
<b>Moderada</b> (defectes de relativa importància)	El defecte produeix un cert disgust o insatisfacció. S'observa un deteriorament en el rendiment del sistema.	<b>4 - 6</b>
<b>Alta</b> (repercussions irrelevants gairebé imperceptibles)	El defecte pot ser crític i produir la inutilització del sistema. Produeix un grau d'insatisfacció elevat.	<b>7 - 8</b>
<b>Molt alta</b> (repercussions irrelevants gairebé imperceptibles)	Defecte molt crític que afecta el funcionament de la seguretat del producte i/o procés involucrat seriosament el compliment de normes reglamentàries. Quan els incompliments són greus s'aplica 10.	<b>9 - 10</b>

**Taula 9:** Classificació de la freqüència. Probabilitat de la ocurrència del defecte (P)

FREQÜÈNCIA	CRITERI	VALOR
<b>Molt baixa</b> (improbable)	Cap defecte es pot associar a processos idèntics ni s'han produït mai en el passat, malgrat tot són possibles	<b>1</b>
<b>Baixa</b>	Defectes aïllats en processos similars o gairebé idèntics. Es poc probable que succeeixi tot i que es raonable esperar-ho al llarg de la vida del sistema.	<b>2 - 3</b>
<b>Moderada</b>	Defectes apareguts ocasionalment en processos similars o previs a l'actual. Probablement es produirà al llarg de la vida del sistema.	<b>4 - 5</b>
<b>Alta</b>	El defecte s'ha presentat amb certa freqüència en el passat en processos similars o previs que han fallat.	<b>6 - 8</b>
<b>Molt alta</b>	El defecte és gairebé inevitable. És segur que es produirà amb freqüència.	<b>9 - 10</b>

Taula 10: Classificació de la facilitat de detecció del defecte (D)

DETECTABILITAT	CRITERI	VALOR
<b>Molt alta</b>	El defecte és obvi. Resulta molt improbable que no sigui detectat pels controls existents	<b>1</b>
<b>Alta</b>	El defecte tot i ser obvi i fàcilment detectable, podria en alguna ocasió escapar a un primer control, tot i que amb tota seguretat seria detectat a posteriori	<b>2 - 3</b>
<b>Mitjana</b>	El defecte és detectable i possiblement no arribi a causar problemes al sistema perquè s'hagi detectat abans de formar-ne part.	<b>4 - 6</b>
<b>Petita</b>	El defecte és de tal naturalesa que resulta difícil detectar-lo amb els procediments establerts fins el moment.	<b>7 - 8</b>
<b>Improbable</b>	El defecte no es pot detectar. Si succeeix gairebé segur que passarà a formar part del sistema.	<b>9 - 10</b>

$$\text{Risc (R)} = S \cdot P \cdot D$$

Amb aquest sistema, el rang de puntuacions de l'avaluació de risc va de l'1 (mínim) al 1000 (màxim).

Les puntuacions assignades durant una anàlisi de riscos tenen en consideració la rellevància i transcendència de l'atribut a avaluar en el procés, la importància d'un eventual defecte en l'atribut, la probabilitat de què aquest es produeixi i la capacitat del sistema per detectar-lo sense que passi desapercbut pels mecanismes ordinaris de control. Així, les preguntes a les que cal donar resposta en una avaluació de riscos són: a) Què pot anar malament?, b) quina probabilitat hi ha de que vagi malament?, c) quines són les conseqüències (severitat)?, d) en cas que surti malament quines probabilitats tenim de detectar-ho prematurament (detectabilitat)?.

### 7.2.3. Tecnologia Analítica de Procés (PAT)

Es considera la PAT com un sistema per dissenyar, analitzar i controlar la fabricació a través de mesures periòdiques (p.e durant el procés ) dels atributs crítics de qualitat i funcionament dels materials de partida, dels materials en procés i dels processos, amb la finalitat d'assegurar la qualitat del producte final, no obstant, cal matissar que el terme *analítica* s'ha de considerar en un sentit ampli per incloure l'anàlisi química, física, microbiològica, matemàtica i de riscos concebuda d'una manera integral. L'objectiu de la PAT és incrementar la comprensió i control dels processos de fabricació de manera que sigui coincident amb el sistema de qualitat del medicament produït. La qualitat no pot ser determinada en els productes, hauria de ser construïda amb ells o formar part ja del seu disseny.

L'aproximació PAT proporciona una base per identificar i entendre les relacions existents entre els diversos factors crítics de formulació i de procés. Les dades i informacions per ajudar a la comprensió d'aquestes relacions es nodreixen de programes de pre-formulació, desenvolupament, estudis d'escalat així com a la utilització de millores d'anàlisi de les dades de fabricació al llarg del cicle de vida del producte.

Hi ha moltes eines disponibles que permeten la comprensió del procés pel desenvolupament científic i farmacèutic gestionat pel risc, fabricació i garantia de la qualitat. Aquestes eines, quan s'utilitzen dintre d'un sistema, poden proveir medis efectius i eficients per adquirir informació per facilitar la comprensió del procés, la millora continua i les estratègies de mitigació de risc. Dintre del marc de treball PAT, aquestes eines poden categoritzar-se d'acord amb el següent: eines pel disseny multivariant, adquisició de dades i anàlisi, analitzadors de procés, eines de control de procés, millora continua i coneixement de les eines de gestió. Una combinació apropiada d'algunes o totes aquestes eines pot ser aplicable per una operació d'una sola unitat o bé per un procés de fabricació complert i l'assegurament de la qualitat.

S'intenta donar suport a la innovació i eficiència en el desenvolupament farmacèutic, fabricació i garantia de qualitat. El marc de treball es basa en la comprensió del procés per facilitar la innovació i les decisions basades en l'avaluació del risc.

### 7.3 Disseny d'experiments (DoE)

El disseny d'experiments (DoE), és una de les eines que permet la comprensió sobre com les variables de la formulació poden influir la qualitat del producte mitjançant la definició d'un "espai de disseny" entesa com a regió de l'espai experimental a on una combinació multidimensional, la interacció de les variables estudiades i els paràmetres del procés han demostrat que es garanteix la qualitat (FDA, 2004) i aquesta pot ser descrita en termes de relacions matemàtiques. Amb l'ajut del disseny experimental, es poden trobar les relacions entre les diferents variables independents i el funcionament del sistema, de tal manera que no es podria assolir aquesta informació amb els experiments tradicionals d'una sola variable a cada moment (Singh i col., 2005).

El DoE utilitza les superfícies de resposta com una de les metodologies més eficients en tant implica l'ús de dissenys experimentals diferents per generar relacions matemàtiques polinomials i una associació de la resposta a un domini experimental per tal de seleccionar els paràmetres de procés i de formulació òptims (Montgomery, 1991). La metodologia de les superfícies de resposta permet dur a terme l'optimització sistemàtica de formulacions o processos mitjançant la selecció d'una funció objectiva, trobant els factors de contribució més importants i investigant la relació entre les respostes (Candiotti i col., 2006) per l'optimització estadística dels paràmetres de formulació.

#### 7.3.1. Dissenys factorials

Els dissenys més utilitzats per establir les superfícies de resposta són els dissenys factorials que poden ser complerts o fraccionats. Si bé els dissenys factorials poden ser utilitzats per la determinació de superfícies de resposta simples que són lineals en tots els factors investigats, habitualment s'utilitzen per a determinar quins factors experimentals són més interessants d'investigar i quins factors són els que no afecten significativament el resultat experimental.

Quan la interacció és negligible, la superfície de resposta és plana. Com més important sigui el terme d'interacció més gran és el grau de plegament de la superfície de resposta plana. Si el model lineal no és suficient per representar les dades experimentals adequadament es poden fer més experiments a banda d'aquells del disseny factorial.

El terme *disseny factorial* es refereix a un disseny experimental que permet avaluar la influència d'una variable independent en conjunció amb altres variables independents sobre

un o més efectes a estudiar (variables dependents). També permet avaluar la interacció que es produeix entre les diferents variables que actuen simultàniament.

El disseny experimental contempla la realització d'un nombre determinat de repeticions del l'experiment per poder establir d'una forma estadísticament representativa i totalment parametritzada la relació entre les variables estudiades, l'efecte i les interaccions.

La necessitat d'estudiar conjuntament diversos factors obeeix a la possibilitat de què l'efecte d'un factor canviï segons els nivells d'altres factors, és a dir que els factors interactuïn entre ells o bé que hi hagi interacció depenent d'un determinat nivell.

També es fan servir els dissenys factorials quan es vol optimitzar la resposta o variable dependent, és a dir que el que es vol és trobar la combinació de nivells dels factors que produeixin un valor òptim de la variable dependent (superfície de resposta). Quan s'investiga un factor per separat, el resultat pot ser diferent a l'obtingut de l'estudi conjunt i és molt més difícil descriure el comportament general del procés o trobar-ne l'òptim.

Els dissenys experimentals basats en el disseny factorial tenen múltiples aplicacions dins el camp de la tecnologia farmacèutica. Dins l'àmbit concret del desenvolupament de formulacions farmacèutiques, els dissenys factorials permeten establir la influència de determinats excipients, les interaccions entre ells i les proporcions més idònies per una composició òptima d'acord amb la finalitat perseguida, així com el coneixement del paper d'aquests excipients en el conjunt de la formulació.

Així, quan afrontem formulacions amb diferents possibilitats de components, de concentracions i de procediments de preparació, el disseny factorial suposa una eina útil per establir com aquests elements influeixen en el resultat final i delimitar així l'espai dins el qual circumscriure els experiments futurs, orientant així el treball experimental cap a les condicions amb probabilitats més altes d'èxit.

Els avantatges dels experiments basats en dissenys factorials són:

- Economització de materials utilitzats amb l'experimentació. S'obté informació sobre diferents factors sense haver d'augmentar la mida de l'experiment. Totes les unitats experimentals es fan servir per a l'avaluació dels efectes.
- S'amplia la base de la interferència en relació a un factor en tant s'estudia sota les diferents condicions representades pels nivells d'altres factors. S'amplia el rang de validesa de l'experiment.
- Permet l'estudi de la interacció, és a dir, estudiar el grau i la forma en la qual es modifica l'efecte d'un factor pels nivells dels altres factors.

Un inconvenient dels experiments sota disseny factorial és que es requereix un nombre d'unitats experimentals elevat si s'assagen molts factors o molts nivells d'alguns factors. Aquest fet obliga a trobar un equilibri entre factors i nivells que faci viable l'experiment i permeti establir les interaccions i delimitar l'espai de disseny.

### 7.3.2 Disseny de tractaments

En el disseny factorial, s'anomena *disseny de tractaments* a la selecció dels factors a estudiar, els seus nivells i les combinacions dels mateixos.

Per realitzar un disseny experimental de tipus factorial, es seleccionen les variables independents que es volen estudiar (per exemple la concentració de determinats excipients). Es seleccionen els nivells d'assaig per cada variable (per exemple una concentració baixa, una concentració mitja i una concentració alta de cada excipient).

Així, el disseny experimental pot ser completament a l'atzar, blocs a l'atzar, blocs al atzar generalitzats, quadre llatí etc... i per a cadascun d'aquests dissenys es pot tenir una organització factorial dels tractaments, si aquests es formen per la combinació de nivells de diversos factors.

En funció del nombre de variables i els seus nivells s'estableix un nombre d'experiments a realitzar i un tipus de tractament dels resultats determinat pel model matemàtic resultant del propi disseny.

Quan es tracta d'un disseny factorial, els tractaments es formen combinant els nivells dels factors en estudi de manera que l'efecte del tractament ( $Y_i$ ) es considera a la vegada compostat dels efectes dels factors i les seves interaccions.

Per exemple si són dos factors (k i l) en estudi el que es té és:

$$Y_i = Y_{kl} = \alpha_k + \beta_l + \gamma_{kl}$$

Tractament = factor A + factor B + interacció AB

A mesura que anem introduint factors, els polinomis implicats es van fent més complexes. Habitualment els dissenys factorials inclouen un nombre limitat de factors degut a la dificultat d'anàlisi i interpretació que impliquen dissenys experimentals molt complexes en els que s'utilitzen experiments factorials.

Del tractament de les dades experimentals, en resulta una funció matemàtica basada en polinomis que permet establir *un model matemàtic predictiu* sobre la incidència de cada variable estudiada en l'efecte estudiat. Així, per exemple davant una composició no assajada, entrant la concentració exacta de cada excipient a la funció obtinguda del disseny factorial, podem predir la seva viscositat, estabilitat, grau de coloració, duresa, etc..



**PART EXPERIMENTAL**





## 1 . HIPÒTESI DE TREBALL



## 1. HIPÒTESI DE TREBALL

El propòsit del present treball, és l'estudi de l'ús de biopolímers per la formulació d'hidrogels basats en xarxes polimèriques i xarxes polimèriques interpenetrants com a matrius per la microencapsulació de lisinat d'ibuprofè i així modular les propietats d'alliberament d'aquest fàrmac en funció d'estímuls externs com el pH, evitant l'alliberament gàstric i orientant aquest a llocs específics del tracte gastrointestinal com pot ser el còlon. Per aquest objectiu cal caracteritzar i optimitzar el mètode de preparació, la caracterització de les matrius biopolimèriques obtingudes i els paràmetres que regeixen l'alliberament del l'ibuprofè en forma de lisinat, tant pel que fa al lloc selectiu d'alliberament, així com altres funcions de la microencapsulació que poden resultar útils com l'emascament del seu sabor o la millora de l'estabilitat.

L'ibuprofè és un AINE descobert ja fa temps però totalment vigent i dels més utilitzats a l'actualitat, l'opció de revisar-lo des d'un punt de vista dels sistemes d'alliberament i de noves activitats farmacològiques pot ser un punt de partida per donar noves oportunitats terapèutiques a un fàrmac antic però molt ben conegut, de baix cost i amb molt bona tolerància (Rainsford, 2003; 2013).

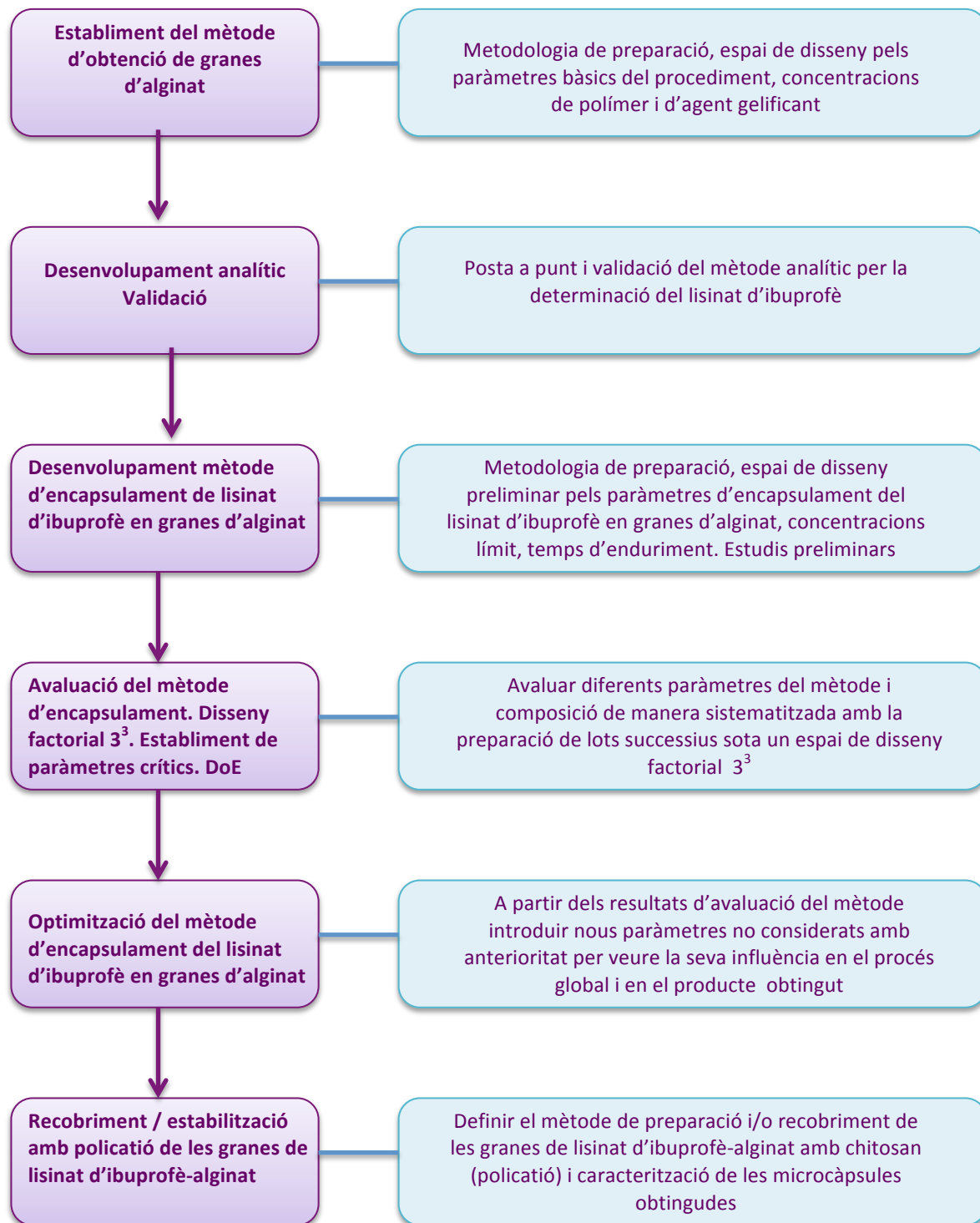
El lisinat d'ibuprofè, és una sal d'ibuprofè amb una elevada solubilitat en aigua respecte altres sals o l'ibuprofè àcid, aquesta característica pot ser útil per a integrar-se en matrius de sistemes biopolimèrics d'alliberament. El fet d'estar soluble en aquestes matrius ofereix també la possibilitat de què la interacció dins la matriu no es redueixi només al mer aspecte d'atrapament físic, sinó també químic, en tant la lisina i l'ibuprofè tenen naturalesa iònica, el que permet interaccionar amb elements estructurals de la matriu de signe contrari i esdevenir també elements estructurals a la vegada que elements bioactius.

Diversos estudis posen de relleu la possibilitat d'utilitzar els AINEs en general i l'ibuprofè en particular, per la prevenció / tractament de determinats tipus de càncer colorectal, no obstant, aquesta possibilitat passa per disposar de formes farmacèutiques d'alliberament específic al lloc d'acció, en aquest cas el còlon i amb la finalitat d'evitar els efectes secundaris derivats de l'administració crònica d'un AINE, necessària quan el tractament és de caràcter preventiu (Cheng i col. 1997).

Per altra banda, els biopolímers, són entitats amb la capacitat de formar estructures suficientment estables i consistents com per incorporar un fàrmac a concentracions elevades i per actuar de manera diferent en funció de paràmetres del medi extern com el pH, permetent la modulació de l'alliberament en funció d'aquest. A banda, es tracta de substàncies de baix cost i elevada tolerància en els organismes vius. Aquestes característiques i la seva manca de toxicitat els fan candidats ideals per formes d'administració en tractaments crònics. En particular se selecciona un candidat de naturalesa aniònica (Alginat) i un candidat de naturalesa catiònica (Chitosan). Aquesta diferent naturalesa ha de permetre la preparació de matrius mixtes i la modulació de les característiques d'alliberament.

L'objectiu del treball és l'estudi de l'ús de l'alginat i el chitosan com a biopolímers per la formació d'hidrogels capaços d'encapsular de manera efectiva el lisinat d'ibuprofè amb el propòsit de poder modular el seu alliberament en resposta a estímuls externs com el pH, amb la finalitat que aquest pugui ser específic d'un lloc o condicions determinades. Els objectius més específics són la caracterització i optimització d'un mètode de preparació de microcàpsules, així com la caracterització de les matrius biopolimèriques obtingudes amb lisinat d'ibuprofè encapsulat i la manera en què es produeix l'alliberament del fàrmac.

## 1.1. Diagrama de flux del treball experimental



## 2 . MATERIALS



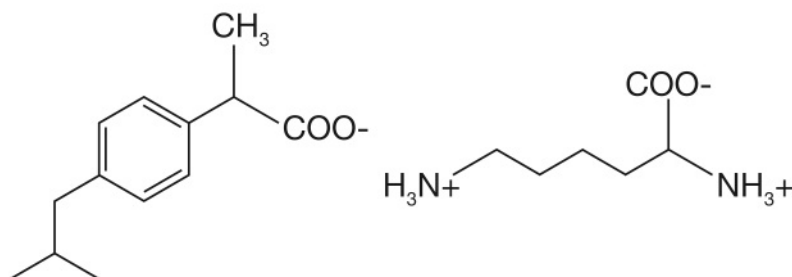
## 2. MATERIALS

### 2.1. Substàncies i reactius

#### 2.1.1. Lisinat d'ibuprofè

LABORATORIS FARDI (Barcelona) Lot 16M179. CAS [57469-77-9]

2-(4-isobutylphenyl)propanoic acid-lysine (1:1)). El seu pes molecular es de 352,48.



Pols cristal·lina molt fina de color blanc o quasi blanca amb una solubilitat elevada en aigua destil·lada mentre que la del ibuprofè àcid és inferior al 0,1%.

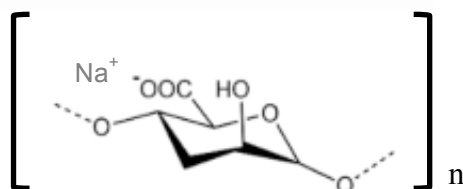
El lisinat d'ibuprofè pertany al grup dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) caracteritzat per ser una sal (lisinat) d'un derivat arilpropioníc que és l'ibuprofè. Presenta activitat antipirètica, antiinflamatòria i analgèsica.

Donat que és una sal, presenta els avantatges de què l'absorció és més ràpida i completa a banda d'un menor efecte nociu sobre la mucosa gàstrica (Bjarnason i col., 2018).

#### 2.1.2. Alginat sòdic

MANUGEL DMB (FMC BioPolymer) Lot 370821 CAS [9005-38-3]

El seu pes molecular es de 198,11.



L'alginate sòdic és una pols fina, pràcticament inodora i insípida, de color blanc groguenc.



Les solucions d'alginat tenen un pH proper a la neutralitat ( $\text{pH} \approx 7,2$  solució 1% p/v). Es tracta d'una substància que es solubilitza en aigua de manera lenta originant una solució col·loïdal viscosa. En solucions aquoses àcides ( $\text{pH} < 3$ ), l'alginat és pràcticament insoluble degut a la formació d'àcid alginic. No és soluble en dissolvents orgànics com l'etanol, l'èter o el cloroform.

L'alginat sòdic és un copolímer lineal no ramificat constituït per unitats monomèriques de  $\beta$ -D-manuronat (M) i  $\alpha$ -L-guluronat (G). Aquestes unitats es troben distribuïdes en llargues regions homomèriques que anomenem blocs.

Els alginats es troben a la natura principalment en forma de sals càlciques, magnèsiques i sòdiques, no obstant, del processat del material natural en resulta àcid alginic a partir del qual se'n obté la seva sal sòdica (alginat sòdic) que és un polímer hidrosoluble.

### 2.1.3. Clorur de calci dihidrat

## CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

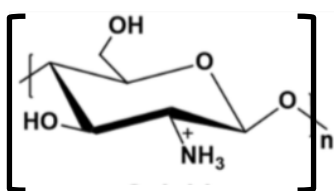
Fagron Ibérica (Barcelona) CAS [10035-04-8]

Cristalls sòlids inodors blancs. Soluble en aigua (98 g en 100 mL a 0°C) i soluble en etanol, àcid acètic i acetona. Presenta valors de pH de 4,5-6,4 (100 g/L a 20°). El seu pes molecular es de 147.

### 2.1.4. Chitosan

Fagron Ibérica (Barcelona) Lot 0306316. CAS [9012-76-4]

2-Amino-2-deoxy-D glucosamina. El seu pes molecular es de 161,16.



Grau de desacetilació superior al 85%. El grau de desacetilació s'ha determinat mitjançant valoració àcid-base segons mètode descrit per Czechovska-Biscuk i col. (2012) (Mètode: Titration III).

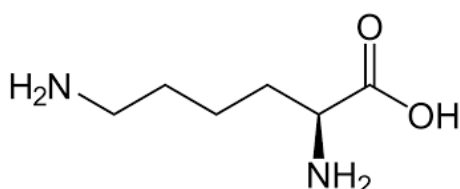
El Chitosan es presenta en forma de pols o d'escates de color blanc o lleugerament cremós i lleuger olor característic.

Químicament el chitosan és un copolímer que presenta una estructura molt similar a la de la cel·lulosa constituïda aquesta per unitats de D-glucosa enllaçades per unions  $\beta$ (1-4) amb grups hidroxil a les posicions C2 dels anells de glucosa. Així el chitosan, també presenta unions  $\beta$  (1-4) però en aquest cas per unir anells de D-glucosamina (2-amino-2-desoxi-D-glucosa) i N-

acetilglucosamina (2-acetamido-2desoxi-D-glucosa). El chitosan el podem trobar com a base o en forma de sal com a clorhidrat, glutamat o maleat de chitosan.

### 2.1.5. Lisina

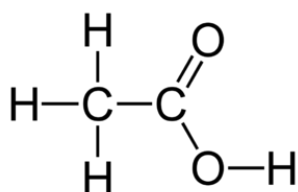
Metapharmaceutical (Barcelona) Lot 0130315. CAS [657-27-2]



### 2.1.6. Àcid acètic

Panreac® Barcelona CAS [64-19-7]

També anomenat àcid etanoic. Es tracta d'un líquid incolor amb una olor molt característica.



### 2.1.7. Dihidrogen Fosfat potàssic

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; CAS [7778-77-0]

És un compost inorgànic soluble en aigua de pes molecular 136,086.

### 2.1.8. Hidrogen fosfat disòdic

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  ; CAS [7758-79-4]

El fosfat d'hidrogen de disodi es presenta en forma de cristalls blancs o pols cristal·lina. És soluble en aigua i insoluble en etanol amb un pes molecular de 358,10.

## 2.2. Solucions reguladores de pH

### 2.2.1 Solucions utilitzades en els estudis d'inflament i d'alliberament de fàrmac

#### 2.2.1.1. Simulació de medi gàstric pH = 1,2

Solució d'àcid clorhídric 0,1 M.- per simulació condicions de pH gàstric.

#### 2.2.1.2. Simulació de medi intestinal pH = 6,8

S'utilitza la dissolució salina tamponada amb fosfat a pH 6,8 de la Farmacopea USP: SIF (Simulated intestinal fluid).- per simulació condicions de pH intestinal.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,805 g
NaOH	0,896 g
H <sub>2</sub> O desionitzada	q.s.p 1 Litre

#### 2.2.1.3. Simulació de medi intestinal pH = 7,4

S'utilitza la solució reguladora de pH 7,4 (4004600 Eur. Phar.) per simulació de condicions colòniques.

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,4 g
NaCl	5,85 g
H <sub>2</sub> O desionitzada	q.s.p. 1 Litre

### 2.2.2. Solució utilitzada en els estudis d'encapsulament

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1 g
NaOH 1 M	q.s.p. pH =8
H <sub>2</sub> O desionitzada	q.s.p. 1 Litre

Aquesta solució s'utilitza pel trencament i dissolució de les granes.

### 3 . MÈTODES



### 3. MÈTODES

#### 3.1 Equips i tècniques instrumentals

##### 3.1.1. Espectrofotòmetre UV-VIS

Espectrofotòmetre HELWLETT PACKARD® VECTRA 286/12 (8452 A DIODE ARRAY). SOTWARE: UV-VIS HP 89532A UV-VIS Software Rev. 1.00.00

S'utilitza per determinar el contingut de lisinat d'ibuprofè a les granes, al bany de coagulació i al medi d'alliberament.

##### 3.1.2 Microscopi Electrònic de Rastreig (SEM)

Per l'observació de la morfologia de les mostres sòlides s'ha utilitzat un microscopi electrònic de rastreig GEOL JSM-7001F amb detectors d'electrons secundaris i retrodispersats.

S'utilitza per la observació topogràfica de les granes.

##### 3.1.3. Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)

Els espectres de ressonància magnètica nuclear s'han obtingut amb un espectròmetre BRUKER AVANCE 300 amb freqüències de precisió de 300 MHz pel protó i de 75 MHz pel carboni.

S'utilitza per la identificació dels ingredients utilitzats en la composició de les granes.

##### 3.1.4. Difracció per Raigs X

S'ha utilitzat un difractòmetre PANanalytical X'Pert PRO MDP amb goniòmetre  $\Theta/\Theta$  de 240 mm de radi, configuració de feix convergent amb mirall el·líptic focalitzant i geometria de transmissió i mostra plena encapsulada entre làmines de material poc absorbent.

Radiació  $K\alpha$  del Cu ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ )

Potència de treball 45 kW – 40 mA

Finestres en el feix incident que determina l'alçada del feix a 0,4 mm

Finestres *Soller* de 0,02 en el feix incident i en el feix difractat

Detector *PIXcel* amb longitud activa de 3,347°

Escombrat  $\Theta/2\Theta$  de 2 a 60°  $2\Theta$  amb mida de pas de 0,026° i temps de mesura de 300 s per pas.

S'utilitza per la identificació dels ingredients utilitzats en la composició de les granes i per determinar la seva naturalesa cristal·logràfica.

### 3.1.5. Calorimetria diferencial de rastreig (DSC)

Calorímetre diferencial de rastreig: DSC-822E/400 i DSC-30 (Mettler Toledo®).

Mètode de 30 a 300°C amb una rampa de 10,00°C/min i en atmosfera de nitrogen (50 mL/min).

S'utilitza per la identificació dels ingredients utilitzats en la composició de les granes i per determinar les variacions termodinàmiques típiques durant la transició d'estats.

### 3.1.6. Equip de dissolució

L'aparell de dissolució utilitzat ha estat un ERWEKA DT80. Aquest consta de 8 vasos de dissolució immersos en un bany termostatitzat. Els vasos de dissolució tenen un volum de 900 mL.

S'utilitza per a dur a terme els estudis d'alliberament de les granes.

## 3.2. Altres equips i utilitatge involucrat a la preparació de les granes

### 3.2.1. Balances

Balança analítica model PCE ABZ200C amb una capacitat de lectura  $d = 0,0001$  g, una reproductibilitat de 0,00015 g, una linealitat de  $\pm 0,00015$  g i capacitat màxima de pesada de 200 g.

Granatari COBOS Precision Model CB-junior amb una capacitat de lectura  $d = 0,1$  i capacitat màxima de pesada de 6000 g.

### 3.2.2. Micropipetes

Micropipetes model PCE-PIP de volums: 2-20  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L i 1000-5000  $\mu$ L.

### 3.2.3. Bany d'ultrasons

Bany d'ultrasons model TRANSONIC DIGITAL S amb una capacitat del tanc de 2.75 L, i una freqüència d'ultrasons de 40 kHz. Consta d'un sistema calefactor que permet escalfar les mostres fins a 80°C.

### 3.2.4. pH-metre

pH-metre digital CRISON GLP21.

### 3.2.5. Agitador magnètic

Agitador SELECTA Model Agimatic-N amb sonda per monitorització i regulació de temperatura durant el procés d'escalfament i agitació amb r.p.m. regulables.

### 3.2.6. Cistells

Cistells d'acer inoxidable amb diàmetre de malla <0,5 mm compatibles amb aparell de dissolució.

### 3.2.7. Software utilitzat

Paquet STATGRAPHICS®: S'ha utilitzat per configurar les taules de disseny experimental i posterior anàlisi del disseny factorial, contrast de variables, regressió no lineal i anàlisi multivariant ( Statgraphics® Technologies, VA, USA).

Paquet PRISM™: Per anàlisi estadística, tractament gràfic de resultats i modelització mitjançant anàlisi lineal i no lineal (GraphPad® Software, CA, USA).

Paquet MICROSOFT® EXCEL®: Càlculs generals, tractament matemàtic i estadística (Microsoft® Corporation, NM, USA).

App MICRO-MEASUREMENTS: Per mesurar el diàmetre de les granes a través d'anàlisi d'imatges. Fometescu Octavian (Romania).

### 3.2.8. Dispositiu d'extrusió

El dispositiu emprat per l'extrusió de les solucions de polímer es compon d'un cilindre rígid de polipropilè i un èmbol amb apèndix de rosca estàndard per a fixar-hi una agulla BD Micro-Fine® de 8 mm de llarg i 0,25 mm de diàmetre.

Pels experiments que han requerit agulles de diàmetre superior s'han utilitzat com a dispositiu d'extrusió xeringues convencionals ICO PLUS 3 de 20 ml amb una agulla de 40 mm de llarg i 0,8 mm de diàmetre.

## 3.3. Caracterització dels materials a utilitzar en la preparació de granes

Els ingredients compleixen els següents estàndards de qualitat:

ALGINAT SÒDIC.- Monografia Farmacopea Europea 01/2017: 0625

CHITOSAN.- Monografia USP-NF

LISINAT D'IBUPROFÈ.- El lisinat d'ibuprofè no té monografia de Farmacopea. En aquest cas la caracterització de puresa i determinacions han estat efectuades per laboratoris FARDE.



### 3.4. Avaluació i posta apunt del mètode de preparació de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè

#### 3.4.1 Preparació de granes d'alginat (placebo)

Les granes d'alginat (microesferes) es preparen pel mètode de gelificació ionotròpica consistent en l'extrusió del polímer sobre un bany d'una solució que conté l'ió gelificant o d'entrecruament, en aquest cas calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Inicialment, per a la posta a punt de la metodologia i procediment de preparació de les microesferes, es preparen granes placebo, amb la finalitat d'establir els paràmetres bàsics del procediment sense la interferència del principi actiu, així com la idoneïtat del mateix. A banda, les granes obtingudes durant aquesta fase, s'utilitzaran com a control blanc en els diferents experiments i per la validació dels mètodes analítics.

Es fa la preparació de granes d'alginat placebo. Amb aquesta finalitat es parteix d'una adaptació del mètode descrit per Murata i col. (2003).

##### 3.4.1.1. Solucions de polímer

Es preparen diferents solucions d'alginat a l'1, 2, 3 i 4 % (p/v). Es disposa d'un vas de precipitats amb aigua sota agitació al que s'addiciona la quantitat necessària d'alginat. Un cop completament dissolt s'enrasa a 100 ml.

##### 3.4.1.2. Solucions de clorur de calci

Es preparen solucions de clorur de calci a l'1% p/v [68 mM], 2 % p/v [136 mM], 3% [204 mM], 4% [272 mM]. Es dissol la quantitat necessària de clorur de calci en aigua i s'enrasa a volum final.

##### 3.4.1.3. Preparació bany de gelificació

Per preparar el bany de gelificació, s'incorporen 100 ml de solucions de  $\text{CaCl}_2$  del 1%, 2%, 3% i 4% (p/v) dins respectius vasos de precipitats de 250 ml i s'hi disposa la sonda de temperatura i de pH per monitoritzar aquest paràmetre durant el procés de gelificació.

La solució de polímer, s'introdueix dins del cilindre del dispositiu d'extrusió, s'hi col·loca l'agulla roscada i es fixa tot el dispositiu a una alçada entre 15 i 20 cm des del final de l'agulla (punt de formació de la gota d'alginat) fins la superfície del bany.

Es procedeix al procés de preparació de les granes exercint pressió sobre l'èmbol de manera que comenci el degoteig a través de l'agulla. Aquest degoteig ha de ser amb un pressió i velocitat constants per afavorir la homogeneïtat de les granes obtingudes. Un cop esgotada la solució d'alginat, es deixa el bany amb les granes formades a dins en repòs durant 30 minuts.

Transcorregut aquest període es procedeix a la separació i rentat. La separació es fa filtrant la solució a través d'un sedàs de diàmetre < 0,5 mm. Sobre el mateix sedàs s'efectuen tres rentats de les granes amb aigua purificada. Les granes es deixen assecar durant una hora sobre el mateix sedàs i s'acaben d'assecar a temperatura ambient fins tenir el pes constant

transferint-les a un recipient plàstic de polietilè d'alta densitat (HDPE) que es posa dintre d'un dessecador acoblat a un sistema de buit per reduir la durada del procés d'assecat.

Es fa una valoració de la idoneïtat del procés considerant:

- 1.- La facilitat d'extrusió del polímer
- 2.- La facilitat de formació de les granes
- 3.- L'aspecte i consistència de les granes

#### 3.4.1.4. Caracterització del procés i les granes obtingudes

La idoneïtat del procés s'avalua inicialment de forma visual i ve determinat per la capacitat d'aquest per formar granes d'alginat de característiques adequades, d'una manera homogènia, continua i reproducible dins un mateix procés o lot, així com en diferents lots de preparació. S'avalua també la capacitat del sistema d'extrusió generador de les gotes. Les solucions d'alginat són de naturalesa viscosa i poden plantejar certes dificultats a l'hora de fer-ne la seva extrusió a través d'una agulla de petit diàmetre.

La caracterització es fa observant la formació de les granes quan entren en contacte amb el bany gelificant, aquesta ha de ser instantània i les granes resultants han de tenir una densitat superior a la de la solució que compona el bany gelificant, desplaçant-se així cap el fons del recipient un cop formades on han de mantenir-se durant el temps establert pel procés d'enduriment, també anomenat '*curat*'.

Las granes que no arriben a formar-se, es destrueixen després d'entrar en contacte amb la superfície del bany gelificant, o bé es queden surant a la superfície del mateix, es consideren incorrectes i per tant, les condicions d'obtenció inadequades. Les granes formades han de tenir forma perfectament esfèrica o lleugerament fusiforme.

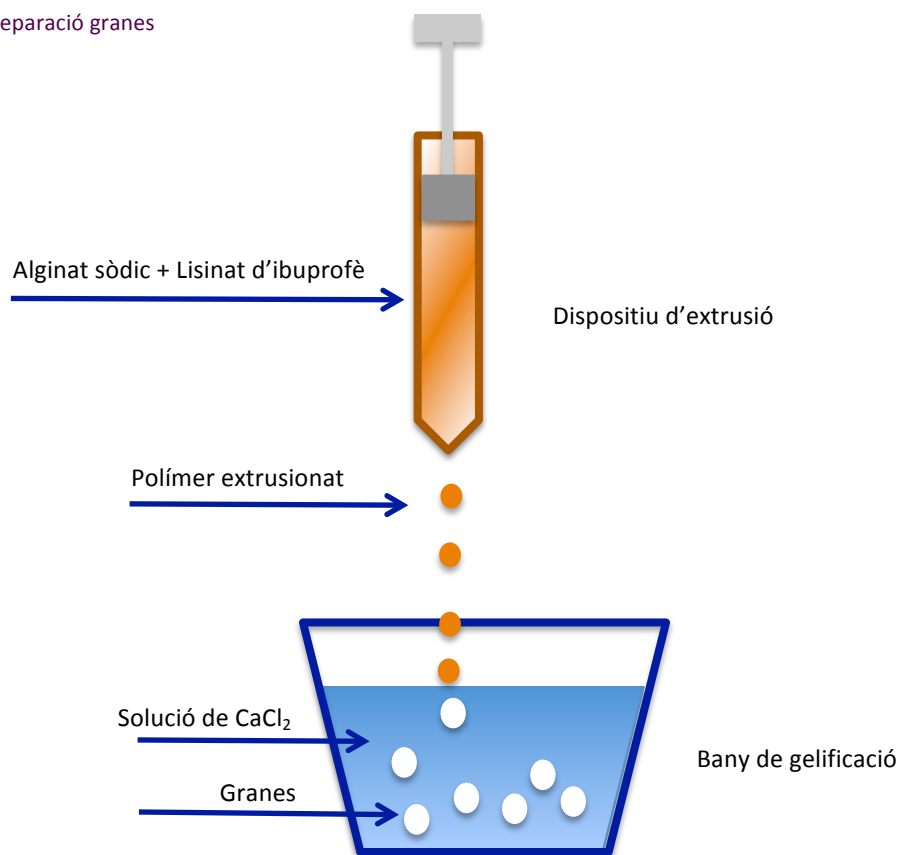
La uniformitat de la mida de les granes es determina mitjançant la mesura del diàmetre amb un Calibrador Vernier (peu de rei) per les granes més grans > 1 mm i l'aplicació *Micro-Measurements* per les granes < 1 mm. Aquesta aplicació permet a partir d'una fotografia de les granes analitzar la imatge amb dispositiu Android (*tablet*). Es defineix un patró de mesura a la mateixa imatge que es manté en les successives ampliacions. L'aplicació dona les mesures de diàmetre seleccionades a la imatge ampliada.

#### 3.4.2. Granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè encapsulat

El lisinat d'ibuprofè s'incorpora a la solució de polímer. Es pesa la quantitat de polímer necessària i a continuació i sota agitació s'hi afegeix el lisinat d'ibuprofè lentament fins total dissolució. Durant aquest procés es forma força escuma de tal manera que un cop dissolt el lisinat d'ibuprofè es tapa el recipient i es deixa reposar durant un mínim de dues hores amb la finalitat que desaparegui l'escuma.

La solució de polímer amb el fàrmac ha de ser homogènia, sense bombolles i totalment transparent per a poder ser utilitzada. Es procedeix com en l'apartat anterior 3.4.1. i les granes són avaluades sota els mateixos criteris.

Figura 11: Esquema preparació granes



### 3.4.2.1 Proves de càrrega

Partint del procediment anterior, excepte la condició de polímer del 4% per ser excessivament viscosa i no poder-se extrusionar en el dispositiu emprat, se seleccionen diferents concentracions de lisinat d'ibuprofè: 5, 10, 20, 25 i 40 % p/p, es tracta de definir la quantitat òptima d'ibuprofè per successius experiments.

La caracterització del procés s'efectua de la mateixa manera, utilitzant les solucions d'alginat a les concentracions prescrites amb el fàrmac dissolt així com els banys corresponents. Per cada lot s'utilitza un total de 10 ml de solució d'alginat amb lisinat d'ibuprofè i el temps d'enduriment es comença a comptar a partir de què s'esgota el polímer i s'extrusiona, per tant, la darrera gota.

Si bé el lisinat d'ibuprofè és molt soluble en les solucions d'alginat i poden assolir-se fins a concentracions del 50 %, s'estudia la formació de granes amb diferents concentracions de fàrmac i s'observa que en aquelles solucions on el lisinat d'ibuprofè supera concentracions del 20% p/p, la formació de les granes es precària, en alguns casos no arriben a formar-se i en altres, les granes formades resulten febles i es destrueixen poc després d'haver-se format.

S'estableix una concentració de lisinat d'ibuprofè òptima per a l'obtenció de granes i que sigui suficient per la seva potencial utilització amb finalitats terapèutiques del 17% (equivalent a 10% d'ibuprofè expressat en forma de base). Aquesta concentració serà constant per a tots els experiments següents i ja no formarà part de les variables contemplades en els experiments de disseny factorial.

### 3.4.2.2. Temps de coagulació

El temps de coagulació ve determinat pel temps transcorregut entre l'extrusió de la darrera grana i la filtració de les granes.

S'utilitzen temps de coagulació en els diferents experiments entre 30 i 120 minuts.

### 3.4.2.3. Concentració de polímer

Es realitzen diferents proves amb diverses concentracions de polímer: 1%, 2%, 3% i 4% p/v, respectivament.

### 3.4.2.4. Definició dels límits de l'espai de disseny

En base a l'avaluació dels resultats de la fase experimental, es determinen els límits de treball de cara a propers experiments d'optimització. Aquests límits dintre dels quals la producció de granes és viable:

- 1.- Rang de concentració de polímer : [1 – 3]% (p/v)
- 2.- Rang de concentració de  $\text{CaCl}_2$  : [1 – 4]% (p/v)
- 3.- Rang de temps d'enduriment:  $\geq 30$  minuts
- 4.- Rang de concentració de lisinat d'ibuprofè [5 – 20]% (p/v) (es selecciona un valor fix de 17% de lisinat d'ibuprofè per correspondre a un valor 10% d'Ibuprofè com a base)

## 3.5. Mètode analític per la determinació del lisinat d'ibuprofè

### 3.5.1. Espectre UV-VIS

Amb la finalitat de determinar l'espectre UV-VIS i la longitud d'ona a on es produeixen els pics d'absorció, es realitza l'escanejat d'una solució d'ibuprofè (1 mg/ml). L'espectre UV-VIS del lisinat d'ibuprofè en les nostres condicions experimentals ens dona un màxim d'absorció a 258 nm, coincidint amb el que indica la bibliografia per l'ibuprofè (Clarke, 263 nm, USP 27 = 254 nm).

S'estableix per tant, una longitud d'ona de 258 nm per realitzar les determinacions.

### 3.5.2 Descripció del mètode analític

La determinació del lisinat d'ibuprofè en els diferents experiments es realitza per espectrofotometria i s'efectua de manera diferent en funció de si es determina el fàrmac contingut a les granes, la seva concentració en el medi de coagulació per determinar l'eficiència d'encapsulament o bé quan les determinacions es fan en els experiments d'alliberament. Així, quan es tracta de quantificar el fàrmac a les granes o al medi de coagulació, es fan mesures d'absorbància puntuals extraient tot el contingut de les granes o bé mesurant directament el medi i es fa el càlcul respecte un patró de referència.

Quan es determina l'ibuprofè en els experiments d'alliberament, aquestes determinacions es fan per lectura directa mitjançant mesures puntuals als temps de mostreig predeterminats, o bé en continu, fent passar un flux continuat de medi de dissolució que fa un circuit tancat des dels vasos de dissolució fins a les cel·les de lectura de l'espectrofotòmetre per retornar de nou als vasos de dissolució.

#### 3.5.2.1. Preparació de la solució estàndard

Es pesen 50 mg de lisinat d'ibuprofè i es dipositen en un matràs aforat de 100 mL i s'enrasa a volum amb tampó fosfats pH= 8

#### 3.5.2.2. Preparació de la solució problema per la determinació del contingut de lisinat d'ibuprofè a les granes preparades

En un matràs aforat de 100 ml s'hi introdueixen aproximadament 0,200 g de les granes a analitzar pesades de forma exacta. S'afegeixen aproximadament 75 ml de solució reguladora pH = 8,0 i s'agita fins a total dissolució de les granes amb l'ajut del bany d'ultrasons. Aquest procediment, en funció de la naturalesa de les granes, pot requerir de la prèvia trituració de les mateixes en un morter i així facilitar el procés d'extracció del lisinat d'ibuprofè.

A continuació s'enrasa fins a 100 ml amb solució reguladora de fosfats a pH=8.

S'agafen 2,5 ml de la solució anterior, prèviament filtrada amb un filtre de xeringa Millipore®Milliflex de 0,45 µm de diàmetre per eliminar qualsevol resta no dissolta de polímer i es dilueix fins a 10 mL amb la mateixa solució reguladora de pH. Aquesta és la solució analítica que ha de contenir al voltant de 0,5 mg/mL de lisinat d'ibuprofè. Es procedeix a la seva lectura a l'espectrofotòmetre.

#### 3.5.3. Validació del mètode espectrofotomètric per a la determinació de lisinat d'ibuprofè en granes de biopolímers

El mètode analític per a la determinació de lisinat d'ibuprofè en granes de biopolímers ha estat validat seguint els criteris de la ICH Q2 mitjançant la determinació dels següents paràmetres.

##### 3.5.3.1. Especificitat

Per determinar l'especificitat s'ha preparat una solució de 1 mg/mL de lisinat d'ibuprofè (50 mg de lisinat d'ibuprofè en 50 mL de tampó fosfats).

A partir d'aquesta solució es preparen 2 mostres. Una mostra amb placebo, *Solució placebo (+)* i una altra mostra sense placebo, *Solució placebo (-)*.

Solució placebo (-) : s'agafen 5 mL de la solució mare (1 mg/mL) i es dilueixen fins a 10 mL en un matràs aforat amb tampó fosfat pH = 8.

Solució placebo (+): Es pesen 200 mg de granes placebo (sense ibuprofè). S'introdueixen en un matràs aforat de 50 mL que conté 30 mL de solució reguladora pH=8. Es dissolen les granes mitjançant agitació i amb l'ajut del sonicador. Un cop dissoltes s'enrasa a volum. Es transfereixen 5 mL de la solució mare a un matràs aforat de 10 mL i s'enrasa amb la solució placebo preparada anteriorment i prèviament filtrats per filtre de xeringa de 0,45 µm.

### 3.5.3.2. Linealitat

Per determinar la linealitat es preparen duplicats de solucions estàndard d'ibuprofè que van del 50% al 150% del rang de mesura esperat.

Es calcula la recta de regressió i el coeficient de correlació per regressió lineal.

Es calcula el factor de resposta i es determina un criteri d'acceptació de CV (%)  $\leq 2\%$ .

Es fa la verificació de prova de sensibilitat i la verificació de proporcionalitat mitjançant la prova de *t-Student* de la pendent i de l'ordenada d'origen, respectivament.

També es determina l'homogeneïtat de la varianza de la concentració al llarg del rang de linealitat estudiat.

### 3.5.3.3. Exactitud

Per calcular l'exactitud es duen a terme 6 determinacions independents fetes al 80%, 90%, 100%, 110% i 120% de la concentració esperada, partint de pesos aproximats de granes placebo de 0,050 g per a totes les preparacions, a les que s'han afegit 0,080 g, 0,090 g, 0,100 g, 0,110 g i 0,120 g de lisinat d'ibuprofè pesats de manera exacte que es dissolen en solució reguladora de fosfats de pH = 8 agitant durant 15 minuts amb ajut del bany d'ultrasons i enrasant a 100 mL amb el mateix tampó.

Es transfereixen 5 mL d'aquesta solució i s'enrasen a 10 mL amb tampó fosfats pH = 8.

La solució resultant conté 0,500 mg/mL de lisinat d'ibuprofè i 0,250 mg/mL d'alginat.

Es mesura l'absorbància a 258 nm, utilitzant com a blanc per fer el 0 d'absorbància la solució tampó de fosfats només amb solució de granes placebo equivalent a 0,250 mg/mL.

Es determina el percentatge de recuperació mitja, el coeficient de variació, la desviació estàndard i coeficient de correlació lineal.

### 3.5.3.4. Precisió (repetibilitat)

Es determina la precisió del sistema instrumental, la precisió del mètode i la precisió intermèdia.

Precisió del sistema: es fan 6 mesures consecutives d'una mateixa mostra i cubeta de 0,500 mg/mL de lisinat d'ibuprofè dissolt en tampó fosfat, corregint a cada mesura el blanc amb solució de tampó fosfat pH = 8.

Després de cada mesura es determina el coeficient de variació.

Precisió del mètode: Es prepara una mostra amb placebo i patró (0,500 mg/mL de lisinat d'ibuprofè) de la que s'extreuen 6 alíquotes que es mesuren a l'espectrofotòmetre.

Es determina el coeficient de variació com a criteri d'acceptació.

Precisió intermèdia: s'efectua la comparació de resultats obtinguts a l'anàlisi d'una mostra en 2 condicions: A i B. Es fan 6 determinacions a cada condició d'una mostra corresponent al nivell del 100% (500 mg/mL).

Cada condició correspon a un analista diferent i dies d'anàlisi diferents utilitzant el mateix espectrofotòmetre.

Es determina la diferència entre els 2 resultats en % i l'existència de diferències estadísticament significatives entre els 2 grups mitjançant un test d'ANOVA.

### 3.6. Caracterització de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè encapsulat i optimització del mètode de preparació

#### 3.6.1. Disseny d'experiments (DoE)

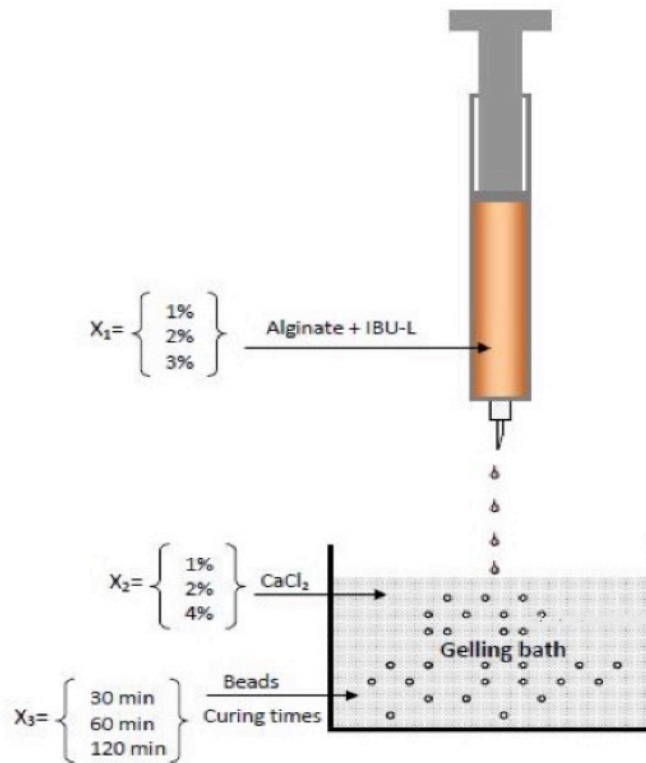
Per optimitzar les condicions de preparació de les granes de lisinat d'ibuprofè es planteja un disseny factorial amb tres variables independents i tres nivells per variable (disseny  $3^3$ ) que origina una matriu experimental d'un total de 27 preparacions. Per cadascuna de les preparacions es determina la quantitat de fàrmac encapsulada i l'eficiència d'encapsulament.

A la Taula 11 es descriuen les variables i els valors assignats a cada nivell amb la codificació corresponent utilitzada per la matriu experimental. A la Taula 12 es descriu la matriu experimental amb els valors codificats. A la fig 12 es representa de manera esquemàtica les variables i la seva disposició en el procés de preparació.

**Taula 11:** Variables codificades. Descripció i valors

	Variables Independents	Unitats	Valor dels nivells		
			Baix -1	Mig 0	Alt 1
X <sub>1</sub>	Concentració de polímer	%	1	2	3
X <sub>2</sub>	Concentració de CaCl <sub>2</sub>	%	1	2	4
X <sub>3</sub>	Temps de curat	min	30	60	120
Variables Dependents		Unitats			
Y <sub>1</sub>	Quantitat de fàrmac encapsulat	mg/g			
Y <sub>2</sub>	Eficiència d'encapsulament	%			

Figura 12: Esquema i variables en la preparació de les granes



Taula 12: Matriu experimental amb codificació dels nivells experimentals per les variables independents

Preparació	Codificació del nivell de variable		
	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	0
3	-1	-1	1
4	-1	0	-1
5	-1	0	0
6	-1	0	1
7	-1	1	-1
8	-1	1	0
9	-1	1	1
10	0	-1	-1
11	0	-1	0
12	0	-1	1
13	0	0	-1
14	0	0	0
15	0	0	1
16	0	1	-1
17	0	1	0
18	0	1	1
19	1	-1	-1
20	1	-1	0
21	1	-1	1
22	1	0	-1
23	1	0	0
24	1	0	1
25	1	1	-1
26	1	1	0
27	1	1	1



Les granes obtingudes en cadascun dels lots preparats d'acord amb el disseny factorial, es caracteritzen mitjançant els procediments i mètodes que es descriuen a continuació.

Per determinar l'eficiència del procediment i la capacitat per produir granes que retinguin més o menys quantitat de fàrmac, s'avalua la quantitat de fàrmac encapsulat per unitat de massa i l'eficiència d'encapsulament.

### 3.6.2. Determinació de la quantitat de fàrmac encapsulada

Es defineix la presència de fàrmac per unitat de massa en les granes resultants de les diferents preparacions, essent un indicador de la idoneïtat del procediment de preparació per produir granes amb un contingut de fàrmac adequat. Aquest valor, és útil a efectes pràctics ja que ens indica el contingut de fàrmac encapsulat dintre les granes obtingudes i per tant, ens permetrà calcular la quantitat de granes per assolir un determinat nivell de dosificació.

Per determinar la quantitat de fàrmac que contenen les granes es procedeix segons el mètode analític descrit al l'apartat 3.5.2.

La quantitat de fàrmac encapsulada s'expressa en mg de lisinat d'ibuprofè per gram de granes.

### 3.6.3. Determinació de l'eficiència d'encapsulament

Aquest paràmetre defineix l'aprofitament del fàrmac amb el procediment d'encapsulació aplicat. Es tracta de la mesura relativa de la quantitat de fàrmac que s'encapsula respecte la quantitat de fàrmac de partida.

El càlcul de la quantitat de lisinat d'ibuprofè encapsulada es fa de forma indirecta, fent la diferència de la quantitat de lisinat d'ibuprofè que queda en el bany de gelificació un cop finalitzat el procés respecte el lisinat d'ibuprofè total utilitzat en el procés.

Per poder determinar l'eficiència d'encapsulament, abans d'iniciar la producció de les granes, cal tenir present que s'hauran d'efectuar les següents mesures durant el procés per tal de determinar exactament la quantitat ( $Q_c$ ) de solució consumida.

Determinació exacta de la solució consumida:

Pesar el dispositiu d'extrusió ple un cop carregat ( $P_i$ )

Pesar novament el dispositiu cop finalitzat el procés d'extrusió ( $P_f$ )

Quantitat de solució consumida ( $Q_c = P_f - P_i$ )

Sabent  $Q_c$  es podrà saber l'ibuprofè total utilitzat en el procés de preparació de les granes.

Si es fa més d'una càrrega del dispositiu per un mateix lot, el pes del dispositiu carregat amb el polímer i un cop buidat es registra per a cadascuna de les càrregues efectuades per sumar-ne les quantitats i obtenir el total gastat.

Quan es faci el filtrat de les granes, es recupera el medi del bany de coagulació i es determina espectrefotomètricament la concentració de lisinat d'ibuprofè present. La quantitat d'ibuprofè del bany ( $Q_{IBU-L \text{ bany}}$ ) es determina fent lectures del sobrenedant final ( $\lambda = 258 \text{ nm}$ ) respecte patró segons mètode validat descrit a l'apartat 3.5.

Calculant la concentració de lisinat d'ibuprofè present al bany i la quantitat total de solució del bany es determina la quantitat de lisinat d'ibuprofè que no s'ha encapsulat. Per diferència respecte l'ibuprofè total extruït, s'obté el fàrmac total encapsulat, sent la quantitat total de lisinat d'ibuprofè extruïda ( $Q_{IBU-L total} = Q_c \times 0,17$ ).

L'eficiència d'encapsulament es calcularà restant la quantitat que hi ha al bany de la quantitat inicial dividit per la quantitat inicial segons l'equació següent:

$$EE\% = \frac{Q_{IBU-L total} (mg) - Q_{IBU-L bany} (mg)}{Q_{IBU-L total} (mg)} \times 100$$

### 3.6.4. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística dels resultats obtinguts en la sèrie de preparacions a partir del disseny factorial es realitza mitjançant el software STATGRAPHICS®.

L'optimització sistemàtica dels procediments es duu a terme seleccionant una funció objectiva que inclogui els factors que tinguin una contribució o influència en el procediment i estudiant les relacions entre respostes. El disseny factorial, s'utilitza com a mètode per a l'optimització estadística dels paràmetres de formulació i per avaluar els efectes principals, els efectes interactius i els efectes quadràtics dels elements del procés per les variables dependents observades, l'eficiència d'encapsulament màxima i càrrega màxima de fàrmac a les granes.

S'utilitza un disseny de tres nivells i tres factors per ser adequat per l'exploració de superfícies de resposta quadràtica i la construcció de models polinomial de segon ordre.

L'avaluació de les respostes experimentals es fa sota un model quadràtic no lineal que inclou termes polinomials interactius representat per la següent expressió:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{22} X_2^2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{33} X_3^2$$

A on Y representa la variable dependent;  $b_0$  és una intercepció; de  $b_1$  a  $b_{33}$  són els coeficients de regressió obtinguts a partir dels valors experimentals observats de Y; Les variables  $X_1$ ,  $X_2$  i  $X_3$  són els nivells codificats a la taula 1 corresponents a les variables independents. Els termes  $X_{1-2}$ ,  $X_{2-3}$  representen la interacció i  $X_i^2$  ( $i = 1, 2, 3$ ) representa els termes quadràtics (Box i Behnken, 1960).

### 3.6.5. Efecte del pH del bany de gelificació

Amb la finalitat d'establir l'efecte del pH del bany de gelificació sobre les granes, es porta a terme la preparació de les granes de lisinat d'ibuprofè sota diferents condicions de pH del bany. Així, es preparen 5 banys amb solució de  $CaCl_2$  al 4%, als quals s'ajusta el pH amb HCl o NaOH a valors de 2, 4, 6, 8, i 10. Durant la preparació el pH es monitoritza en continu amb un pH-metre Crison GLP-21. En cas de variació significativa durant el procés (pH inicial  $\pm 1,0$ ) es reajusta al valor d'inici. Per la determinació de la influència del pH en el bany, s'utilitzen solucions de polímer del 2% i  $CaCl_2$  al 4% durant 60 minuts d'enduriment, per ser aquestes condicions les que en experiments previs i a partir del disseny factorial han demostrat ser les més adequades pels valors d'eficiències d'encapsulament i quantitat de fàrmac encapsulat.

### 3.6.6. Característiques d'inflament de les granes

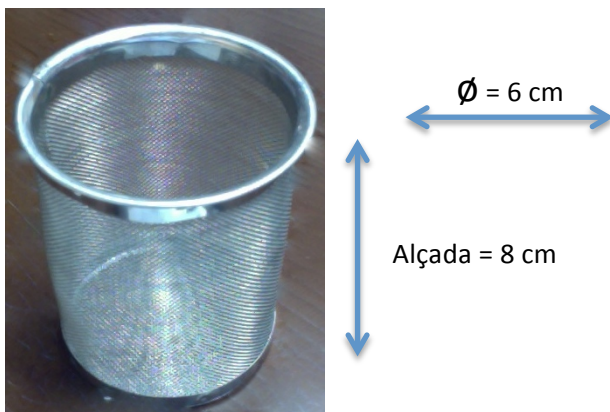
Estudis previs han permès demostrar una relació directa (Pasparakis i Bouropoulos 2006) entre la capacitat d'inflament del polímer i l'alliberament del fàrmac, així doncs com més contret està el polímer, major és la retenció del fàrmac encapsulat, i a mesura que aquest es va inflant, el fàrmac es va alliberant.

La capacitat d'inflament de les granes es determina per la capacitat d'absorció d'aigua que aquestes presenten. La quantitat d'aigua absorbida a cada moment es determina fent mesures successives de pes de les granes.

Per tal de disposar d'informació sobre la manera que es pot produir l'inflament de les granes en condicions fisiològiques, es fa la determinació utilitzant un medi a pH 1,2 i un medi a pH 7,4, dins els quals s'hi dipositen les granes obtingudes a diferents pHs segons apartat anterior.

Per determinar la capacitat d'inflament, es pesa de forma exacta 0,200 g de granes totalment seques i es dipositen dins un cistell cilíndric, les parets del qual estan formades per un sedàs de llum  $\varnothing < 0,5$  mm que s'introdueix dins d'un vas de precipitats que conté el medi en el que es farà la determinació (100 ml de solució HCl 0,1N per la determinació a pH 1,2 o bé 100 ml de tampó fosfat per la determinació a pH=7,4).

Figura 13: Cistell d'acer utilitzat per fer l'avaluació de l'inflament



Les determinacions es fan en intervals d'entre 5 i 120 min després de submergir les granes a avaluar en el medi, anotant el temps real al què es fa la determinació. Per determinar el pes a cada temps de mostreig, es treu el cistell de dintre del medi i es posa sobre una superfície amb paper assecat amb la finalitat d'eliminar qualsevol resta de medi retingut al fons del cistell. Les granes es dipositen en un vidre de rellotge i es pesen eliminant qualsevol resta d'aigua externa. Després es tornen de nou al cistell que es torna a dipositar dins el bany. Mentre duren les operacions de mesura i des del moment que el cistell es treu del medi fins que s'hi torna a posar, el cronòmetre s'atura i tornant-lo a posar en marxa en el moment d'introduir de nou el cistell dins el bany.

El càlcul de la capacitat d'inflament s'efectua aplicant la següent equació:

$$\% \text{ Inflament } t_n = \frac{P_n - P_0}{P_0} \times 100$$

$P_0$ : Pes inicial (granes seques)

$P_n$ : Pes al temps que es realitza la mesura (granes humides)

### 3.6.7. Avaluació de l'alliberament estàtic del lisinat d'ibuprofè

Amb la finalitat de conèixer la difusió passiva del fàrmac cap al medi a través de les matrius d'alginat, s'efectuen determinacions de l'alliberament del fàrmac en condicions estàtiques, és a dir, sense agitació. Per fer les determinacions, es pesa exactament una quantitat de 200 mg de granes i es deixa durant 5 hores dins una cubeta sense agitació a 37°C. Les mostres s'extreuen en intervals de 1 h.

### 3.6.8. Avaluació de l'alliberament dinàmic del lisinat d'ibuprofè

Es realitzen mesures d'alliberament en aparell de dissolució, inicialment a pH neutre, utilitzant aigua desionitzada com a medi de dissolució i més tard amb variacions de pH per simular els fluids del tracte gastrointestinal mitjançant l'ús de solucions reguladores de pH.

#### 3.6.8.1. Alliberament sense canvi de pH

Es fan les determinacions a pH 1,2 i a pH 7,4 amb granes diferents i de manera respectiva, amb l'objectiu d'observar el comportament de les granes a cadascun d'aquests pHs simulant la resposta de les granes a pH gàstric i a pH intestinal. Les mesures es fan a l'espectrofotòmetre ( $\lambda=258$  nm) agafant alíquotes a diferents temps i que es retornen al medi de dissolució un cop feta la mesura.

#### 3.6.8.2. Alliberament amb canvi de pH

Es fan determinacions a pH 1,2, 6,8 i 7,4 o a 1,2 i 7,4 depenent de l'experiment, però aquestes determinacions es fan sobre les mateixes granes, canviant només el medi de dissolució i mantenint les granes.

L'objectiu, és conèixer la influència que té en el comportament de les granes el fet de sotmetre les granes de manera seqüencial a pHs diferents, simulant així el que pot succeir en condicions fisiològiques durant el seu trànsit pel tracte gastrointestinal.

Per conèixer el perfil d'alliberament s'efectua un estudi utilitzant un aparell de dissolució ERWEKA amb les següents condicions:

Temperatura del bany: 37°C

Velocitat d'agitació: 50 rpm

Volum del medi de dissolució : 300 ml

pH del medi: Medi de simulació de fluids intestinals a pH 2, 6,8 i 7,2 durant els intervals:

Per pH = 2 (2 h)

Per pH = 6,8 (2 h)

Per pH= 7,4 (fins assolir la màxima resposta i com a màxim a les 24 h de l'inici de l'experiment)

La mesura es realitza espectrofotomètricament a una longitud d'ona  $\lambda=258$  nm.

### 3.6.9. Estabilitat de les granes

Per determinar l'estabilitat de les granes, es van emmagatzemar durant 36 mesos a temperatura ambient dintre d'un dessecador. Dins aquest període s'avaluen les granes als 12, 24 i 36 mesos després de la seva preparació, determinant les seves característiques organolèptiques i el contingut de lisinat d'ibuprofè mitjançant el mètode espectrofotomètric validat.

### 3.6.10. Morfologia de les granes obtingudes

La morfologia i característiques topogràfiques de la superfície de les granes d'alginat amb ibuprofè s'ha examinat mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (SEM).

## 3.7. Preparació de granes mixtes d'alginat i chitosan amb el mètode de la gelificació ionotròpica mixta

### 3.7.1. Fonament del mètode

El mètode de la gelificació ionotròpica mixta (Gonzalez-Rodriguez i col. 2002) consisteix en partir d'una solució de polímer d'alginat i gelificar-la en un bany que conté a l'hora ions de calci i el polícatió chitosan. Aquest és un dels mètodes més citats a la bibliografia per la seva senzillesa i facilitat d'adaptació respecte el mètode que utilitza només alginat gelificat amb ions de calci.

Abans de preparar granes amb principi actiu, s'assaja la viabilitat de la tècnica preparant granes placebo, aquestes ens serviran per posar a punt el procediment de preparació, fer avaluacions de control i com a placebos analítics.

Segons la bibliografia consultada (Gonzalez Rodriguez i col. 2002) la majoria d'autors utilitzen concentracions de chitosan al bany de gelificació que van del 0,5 al 1% (p/v). Es preparen granes en les dues condicions. Concentracions superiors no són possibles ja que el bany de gelificació adquireix una viscositat excessiva, en aquestes condicions les gotes de polímer no poden penetrar la superfície viscosa en no superar les forces de tensió superficial generades, destruint-se al impactar sobre aquesta i no poder-se submergir en el líquid coagulant.

### 3.7.2. Mètode de preparació de granes mixtes placebo amb chitosan al 0,5% i 1%

Es prepara el bany de coagulació amb 100 ml de solució de  $\text{CaCl}_2$  (4%) i àcid acètic (1%) en un vas de precipitats. S'afegirà 0,5 g o 1 g de chitosan i s'agitarà fins total dissolució. Ajustar a pH = 5,0 amb NaOH 0,1 N.

Carregar el dispositiu d'extrusió amb solució d'alginat al 2%. Es produiran les granes fent degotar la solució de polímer sobre el bany de coagulació. Transcorreguts 60 minuts d'enduriment de les granes dintre el bany, es treuen i es renten amb aigua destil·lada per eliminar les restes de la solució de coagulació.

### 3.7.3 Obtenció i caracterització de granes mixtes amb lisinat d'ibuprofè encapsulat

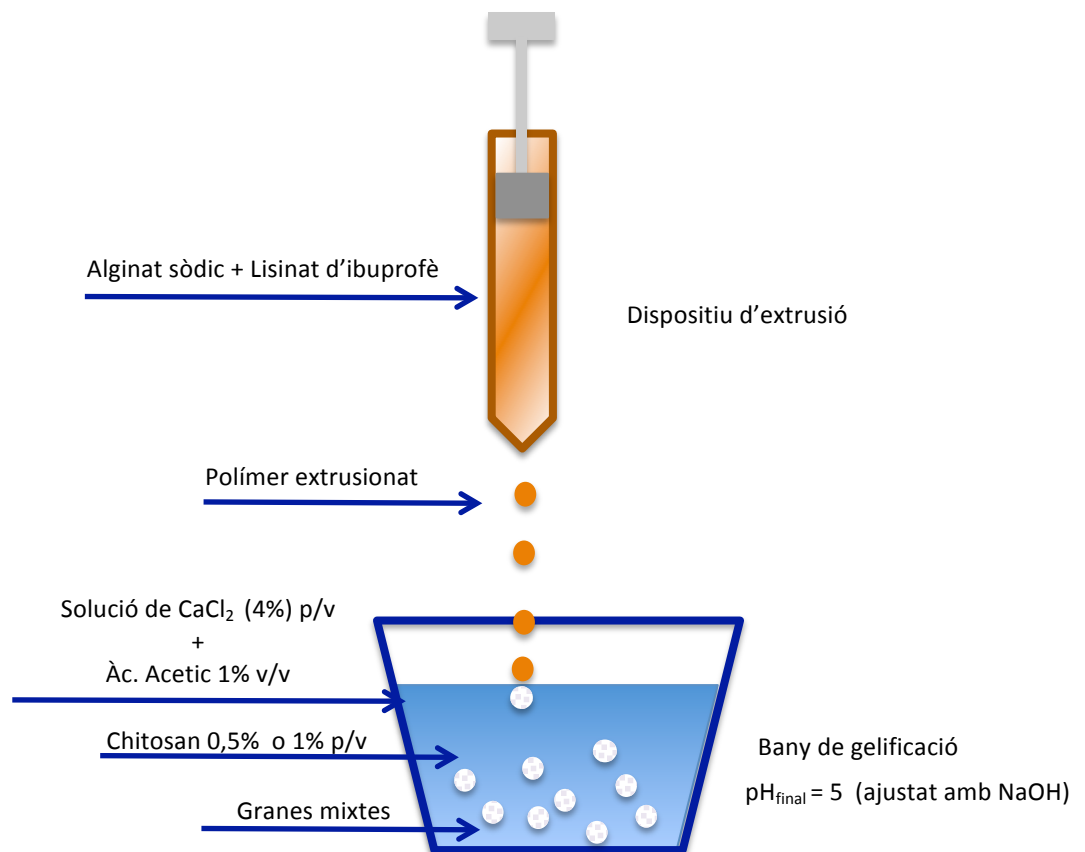
Es fa servir la mateixa tècnica anterior (3.6.2.) i les mateixes solucions de coagulació al 0,5 i 1% p/v de chitosan.

La solució de polímer que s'extruirà serà la estàndard amb un contingut del 17% (p/p) de lisinat d'ibuprofè en una solució d'alginat sòdic al 2% (p/v).

### 3.7.4. Determinació de l'eficiència d'encapsulament

L'eficiència d'encapsulament es determina segons la metodologia descrita a l'apartat 3.6.3.

**Figura 14:** Diagrama preparació granes mixtes alginat-chitosan amb lisinat d'ibuprofè



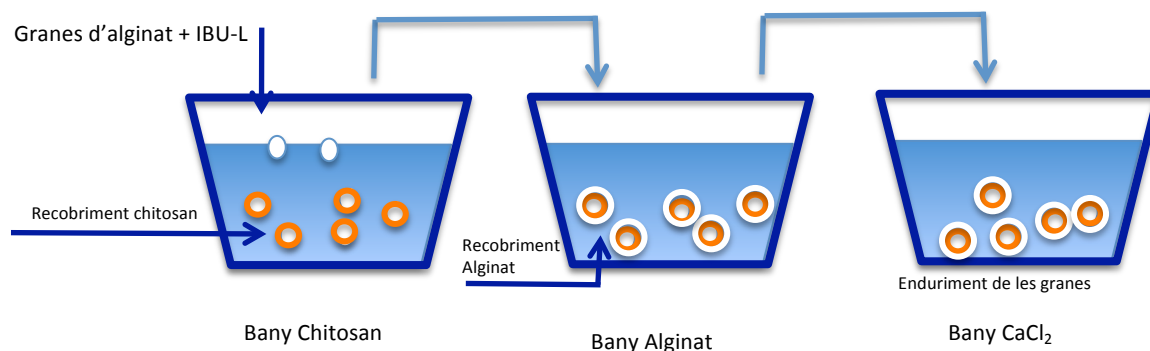
### 3.8. Granes d'alginat amb recobriment doble de chitosan i d'alginat

#### 3.8.1. Procediment de preparació

Es parteix de les granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè optimitzades (alginat 2% p/v + clorur de calci 4% p/v + 17% p/p lisinat d'ibuprofè / 60 minuts i pH neutre).

S'utilitza una adaptació de la tècnica descrita per Shi i col. 2007. Les granes es submergeixen en una solució de chitosan del 0,5% o 1% dissolt en una solució d'àcid acètic del 1% v/v en aigua destil·lada. S'ajusta el pH a 5. Es deixa 30 minuts de contacte. Es separen les granes i es dipositen en una solució del 0,4% d'alginat de sodi. Després de 30 minuts de contacte, les granes es separen i es submergeixen en una solució de clorur de calci al 0,5% p/v durant 30 minuts. Les granes es separen, es renten amb aigua i es deixen assecar al dessecador.

Figura 15: Diagrama preparació granes d'alginat amb recobriment doble de chitosan i d'alginat



#### 3.8.2. Caracterització de les granes

Es fan determinacions d'inflament segons el descrit a l'apartat 3.5.5 i d'alliberament a pH 1,2 i 7,4 amb granes diferents per cada pH, segons el que descriu l'apartat 3.7.1.

### 3.9. Granes mixtes d'alginat-chitosan preparades amb prebarreja de polímers

Per a la preparació de les granes mixtes de chitosan i alginat s'han assajat mètodes diferents. Si bé amb tots ells s'obtenen granes estables, s'han observat comportaments diferents en funció del mètode de preparació utilitzat.

Com en experiments anteriors, s'han preparat granes mixtes d'alginat i chitosan amb la tècnica de la prebarreja de polímers. Primer, sense principi actiu per conèixer les singularitats del mètode i establir-ne els paràmetres de preparació, i posteriorment s'ha procedit a la preparació amb el principi actiu.

Aquest mètode consisteix en incorporar els dos polímers barrejats a una mateixa solució d'extrusió. Es requereix un control del pH de la solució de polímers per evitar incompatibilitats, en tant aquests biopolímers són de signe elèctric oposat, de manera que per poder dur a terme la barreja de forma efectiva cal que es mantingui un cert equilibri en els seus estats d'ionització, evitant així la seva precipitació i a l'hora una interacció excessiva entre ells per no coagular la solució.

#### 3.9.1. Mètode de preparació

Per tal de conèixer el comportament de les granes obtingudes mitjançant aquest mètode i fer els ajustos de procediment, s'obtenen granes sense principi actiu. El plantejament consisteix en anar variant la relació de chitosan respecte l'alginat mantenint una concentració final de polímer sempre fixa del 2 % (p/v) que a la vegada ens permetrà, més endavant, que les relacions polímer/principi actiu siguin sempre les mateixes amb independència de la proporció que hi hagi de cada polímer.

Amb la finalitat d'assolir concentracions de polímer adequades i valors de pH idonis per tal d'optimitzar el desenvolupament experimental, s'han dut a terme diversos experiments de tanteig consistents en preparar barreges de polímer amb diferents relacions de cada polímer i variacions de pH del medi.

De partida s'han utilitzat concentracions que s'han iniciat en un 90% d'alginat i 10% de chitosan, fent variacions del 10% fins arribar a solucions de polímer amb un 10% d'alginat i el 90% de chitosan.

A partir d'aquest primers experiments s'observa com concentracions que superen el 50% de chitosan esdevenen excessivament viscoses i no és possible la seva manipulació i extrusió per les finalitats experimentals, pel que queden descartades per experiments posteriors.

Per aquest motiu es seleccionen relacions d'alginat: chitosan que van de 90:10 fins a un màxim de 50:50 en increments de 10.

De manera similar, per valorar el pH idoni per mantenir les condicions de solubilitat dels polímers i de viscositat adequada, es fan proves de solubilitat ajustant el pH a diferents valors entre 2 i 6. Els valors on el comportament de les solucions és òptim se situa en un rang de pHs entre 4 i 5,5. Dintre d'aquest rang garantim un equilibri de l'estat d'ionització dels dos polímers on el chitosan es troba solubilitzat i activat i l'alginat també, amb graus de ionització dels dos polímers suficients com per interaccionar sense gelificar el medi amb una viscositat que permet una fluïdesa suficient per dissoldre el lisinat d'ibuprofè i per extrusionar el polímer de manera adequada.

Per aquest motiu es seleccionen per a tots els experiments valors de pH de la solució de polímer entre 5 i 5,5.



### 3.9.1.1. Descripció del mètode de preparació

Es preparen solucions amb un contingut total de polímer del 2% (p/v) i proporcions variables d'alginat i chitosan. Es parteix d'una proporció màxima de chitosan del 50% que es va reduint.

Es preparen 20 ml de solució de polímer partint d'una solució d'alginat del 2% (p/v) a la que s'afegeix aigua i s'hi dissol la quantitat necessària de chitosan per obtenir proporcions d'alginat chitosan de 50:50, 60:40, 70:30, 80:20 i 90:10, respectivament.

Les diferents solucions de polímer contindran:

**Taula 13:** Proporcions alginat : chitosan, contingut de les diferents solucions de polímer

Proporció alginat/chitosan	Alginat 2% (p/v) (ml)	Chitosan (mg)	Aigua (ml)
50:50	10	200	10
60:40	12	160	8
70:30	14	120	6
80:20	16	80	4
90:10	18	40	2

Quantitats per preparar 20 ml de polímer

### 3.9.1.2. Procediment de preparació de les granes

Es parteix de la quantitat necessària de solució d'alginat 2% p/v que s'acaba d'ajustar amb aigua a la concentració requerida seguint valors de la taula 3. Afegim 0,2 ml d'àcid acètic, essent el pH resultant idoni per evitar la gelificació de l'alginat i permetre la correcta dissolució del chitosan. S'afegeix la quantitat requerida de chitosan (Taula 13) i es deixa en agitació fins la total dissolució. Un cop dissolt el chitosan s'ajusta a pH 5 - 5,5 amb NaOH (0,1N) i es deixa en agitació 30 minuts.

Un cop preparat el polímer, es carrega el dispositiu d'extrusió. En aquest cas, el dispositiu d'extrusió s'ha hagut de variar en tant el polímer preparat d'aquesta manera obtura les agulles de diàmetre 0,25 mm utilitzades fins el moment i per tant, s'han utilitat agulles de 0,8 mm de diàmetre.

### 3.9.2. Preparació de granes placebo

S'inicia el procediment d'obtenció de les granes buides seguint el procediment habitual de gelificació ionotrópica mitjançant el degoteig de la solució polimèrica sobre el bany de gelificació format per  $\text{CaCl}_2$  al 4% (p/v) a on es deixen endurir les granes durant 60 minuts. A continuació es treuen les granes, es renten amb aigua desionitzada i es deixen al dessecador aplicant buit fins a pes constant.

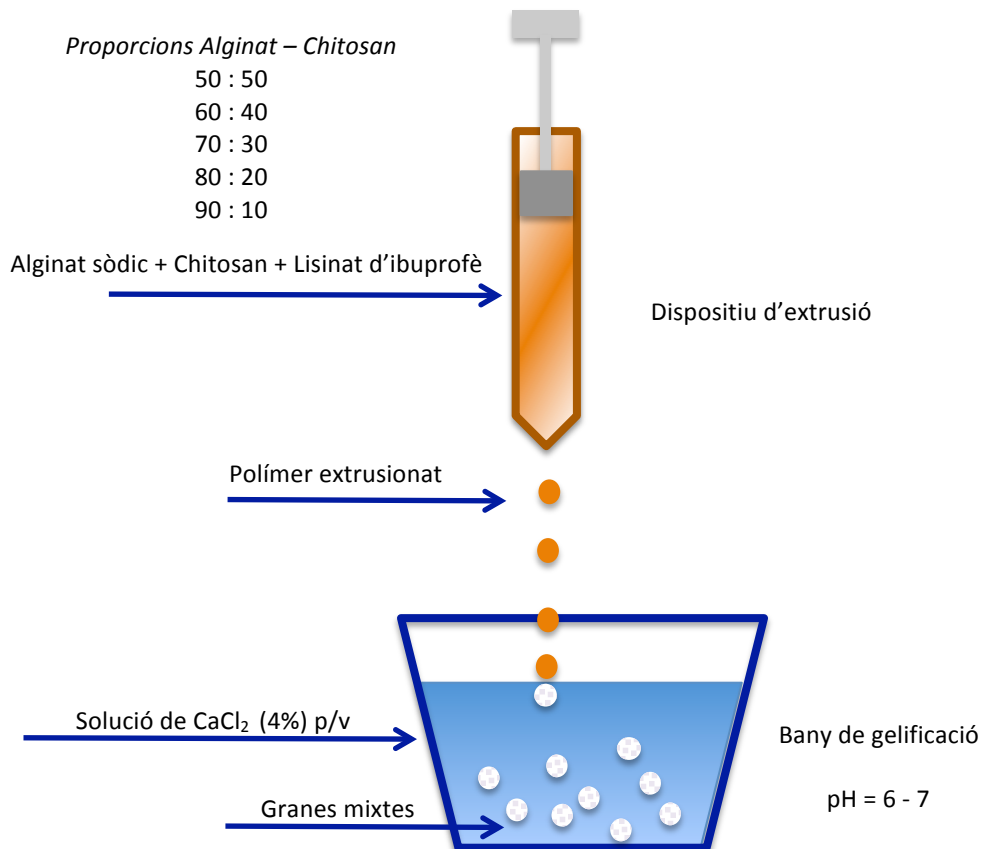
### 3.9.3. Preparació de granes mixtes amb lisinat d'ibuprofè

A una quantitat de polímer de 16,6 g preparada segons indicacions de l'apartat anterior, s'hi afegeixen sota agitació 3,4 g de lisinat d'ibuprofè fins la seva total dissolució, el que resulta en una solució final de fàrmac del 17 % p/p, essent aquesta la mateixa concentració utilitzada en tots els experiments previs.

### 3.9.4. Preparació de granes de lisina

La lisina és una molècula anfotèrica que es pot comportar a l'hora com a anió i com a catió en funció del pH del medi. Per veure la influència de la lisina en el comportament de les granes, s'encapsula aquesta en granes preparades amb la proporció de polímers 70:30. La preparació es fa de la manera indicada, afegint al polímer, lisina en una proporció final del 7% (p/p) equivalent a la quantitat equivalent de lisina que contindria la concentració habitual de lisinat d'ibuprofè del 17% p/p.

Figura 16: Diagrama preparació de granes mixtes preparades amb pre-barreja de polímers



### 3.9.5. Avaluació del mètode de preparació

La idoneïtat del mètode s'avalua considerant la solubilització dels polímers i la capacitat de formar granes pel mètode ionotròpic amb clorur de calci. L'avaluació inicial es fa de manera visual constatant que les granes es formen correctament amb forma esfèrica i romanen de manera estable en el medi durant l'enduriment i fins la seva separació i rentat finals.

### 3.9.6. Grau d'inflament de les granes placebo i de les granes de lisina

De les granes buides obtingudes s'estudia el seu perfil (grau) d'inflament en funció del pH del medi. Segons mètode descrit a l'apartat 3.6.7.

S'estudia l'inflament per separat a pH 1,2 i a pH 7,4.

### 3.9.7. Cinètica d'alliberament i del grau d'inflament en les granes que contenen lisinat d'ibuprofè

L'alliberament del fàrmac i l'inflament de les granes de lisinat d'ibuprofè s'estudien de manera simultània. A cada punt de mostreig es determina la concentració de lisinat d'ibuprofè així com el grau d'inflament.

Aquestes dos cinètiques s'estudien de manera simultània i simulant condicions fisiològiques.

Per fer-ho, se seguirà el procediment estandarditzat en els experiments anteriors, consistent en mesurar l'alliberament i la captació d'aigua de l'estructura polimèrica a pH gàstric de 1,2 a pH duodenal 6,8 i colònic de 7,4.

Les granes es dipositen en un cistell d'acer inoxidable en el bany de dissolució a 37°C i amb agitació de 50 rpm.

**Simulació de la fase gàstrica:** S'utilitza la solució pH 1,2 durant 120 minuts. Durant els primers 60 minuts s'agafa mostra cada 10 minuts i cada 30 minuts en la següent hora.

A continuació es canvia el medi de dissolució a pH 6,8.

**Simulació de la fase duodenal:** S'utilitza solució reguladora de fosfats de pH = 6,8 durant 120 minuts. Durant els primers 60 minuts s'agafa mostra cada 10 minuts i cada 30 minuts en la següent hora.

A continuació es canvia el medi de dissolució a pH 7,4.

**Simulació de la fase colònica:** S'utilitza solució reguladora de fosfats de pH = 7,4 fins a finalitzar experiment a les 24 h de l'inici.

Durant els primers 30 minuts s'agafa mostra cada 10 minuts. Posteriorment es va espaiant aquest temps fins a fer una última determinació al dia següent.

## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ



## 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.1. Caracterització dels materials a utilitzar en la preparació de microesferes

#### 4.1.1. Lisinat d'ibuprofè

##### 4.1.1.1. Nomenclatura

Denominació comú internacional (DCI)

Ibuprofen Lysinate

Nom químic

2-(4-Isobutylphenyl)propanoic acid - lysine (1:1)

Altres noms

Soluphene

p-Isobutylphenyl-2-propionatylsine

2-[4-(2-methylpropyl)phenyl]propanoate

L-Lysinemono(4-isobutyl-alpha-methylbenzeneacetate)

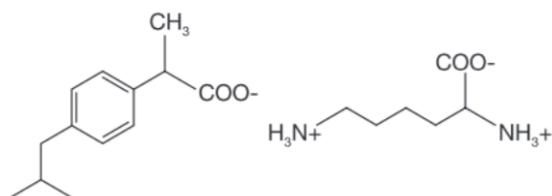
Lisiprofen

Número CAS

[57469-77-9]

##### 4.1.1.2. Estructura

Fórmula estructural



Fórmula molecular

$C_{19}H_{32}N_2O_4$

Pes molecular

352,48

#### 4.1.1.3. Propietats generals

##### Aspecte y Forma física

Pols cristal·lina molt fina de color blanc o quasi blanca.

##### Solubilitat

Les proves de solubilitat efectuades sobre la matèria activa ens permeten classificar el lisinat d'ibuprofè segons criteris de la Farmacopea Europea com a soluble en aigua i a pH neutre (pH= 6,8-7,4) i com a molt poc soluble a pH àcid (pH =1,2).

##### Punt d'ebullició

319,6°C p.a.

##### Punt de fusió

(177 °C – 181,0 °C)

#### 4.1.1.4. Identificació i caracterització

##### Elucidació de l'estructura i altres característiques

La confirmació de l'estructura de la substància activa, s'ha dut a terme mitjançant l'anàlisi espectroscòpica <sup>1</sup>H-RMN (Figura 17). S'observen els pics característics que corresponen a protons de l'estructura arilpropionica i de la lisina, confirmant que es tracta del lisinat d'ibuprofè.

També s'ha analitzat el criteri de puresa cristal·logràfica mitjançant difracció de raigs X (Figura 18) i calorimetria diferencial de rastreig (DSC) (Figura 19).

## Altres assajos

**Taula 14:** Resultats d'assajos químics i físico-químics realitzats sobre el lisinat d'ibuprofè utilitzat

Assaig	Especificació	Resultat
Aspecte	Pols blanc cristal·lí	Conforme
Identificació IR	Conforme referència	Conforme
pH	Sol. 1% H <sub>2</sub> O 6,2 - 7,0	6,7
Aigua KF	Max 0,5 %	0,07
Rotació òptica	-0,1° - +0,1°	0,0°
Punt de fusió	177° C - 181° C	177° C
Contingut Lisinat Ibuprofè (HPLC)	98,5 – 101 % sps	100,3 %
Contingut Ibuprofè (HPLC)	57,6 – 59,4 % sps	58,1 %
Contingut Lisina (Potenciometria)	40,9 – 42,1 %	40,9
Substàncies relacionades (HPLC)	≤ 2%	≤ 0,03 %
Solvents residuals	Isopropanol: ≤ 500 ppm	174

Les proves realitzades sobre l'ingredient actiu confirmen que l'estructura d'aquest coincideix amb el lisinat d'ibuprofè i que aquest té les característiques de puresa i d'idoneïtat per a ser utilitzat com ingredient actiu en productes farmacèutics.



Figura 17: Espectre RMN del Lisinat d'ibuprofè

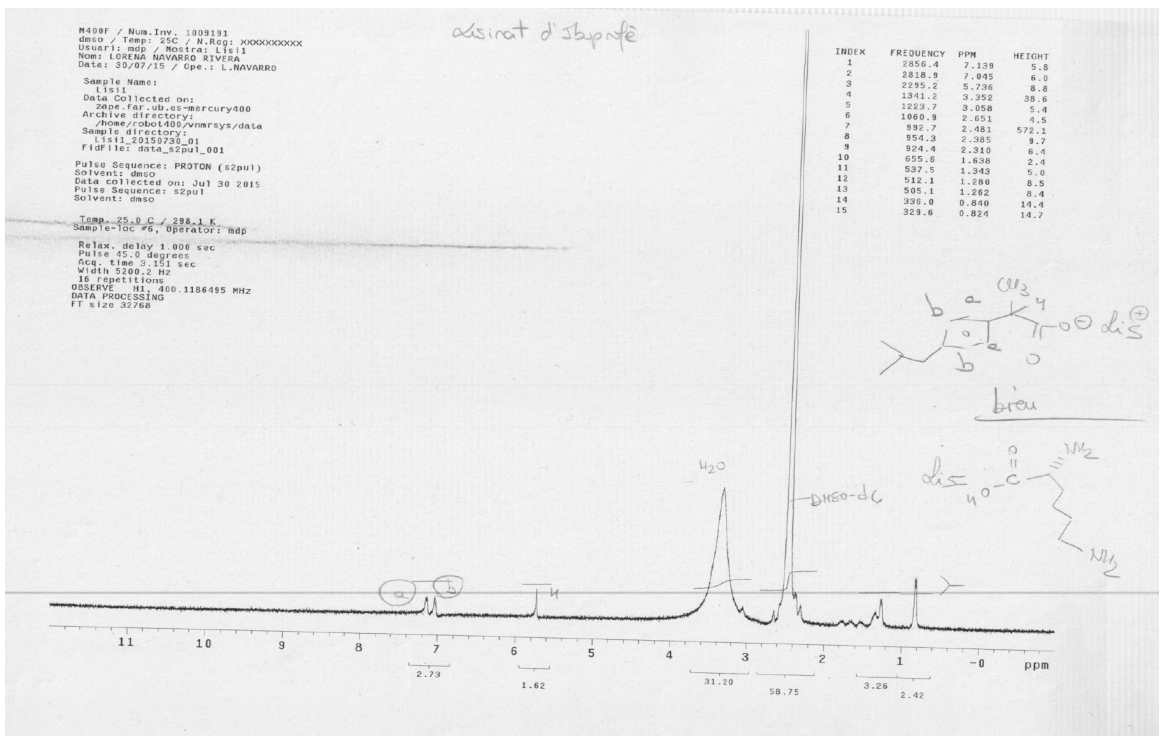
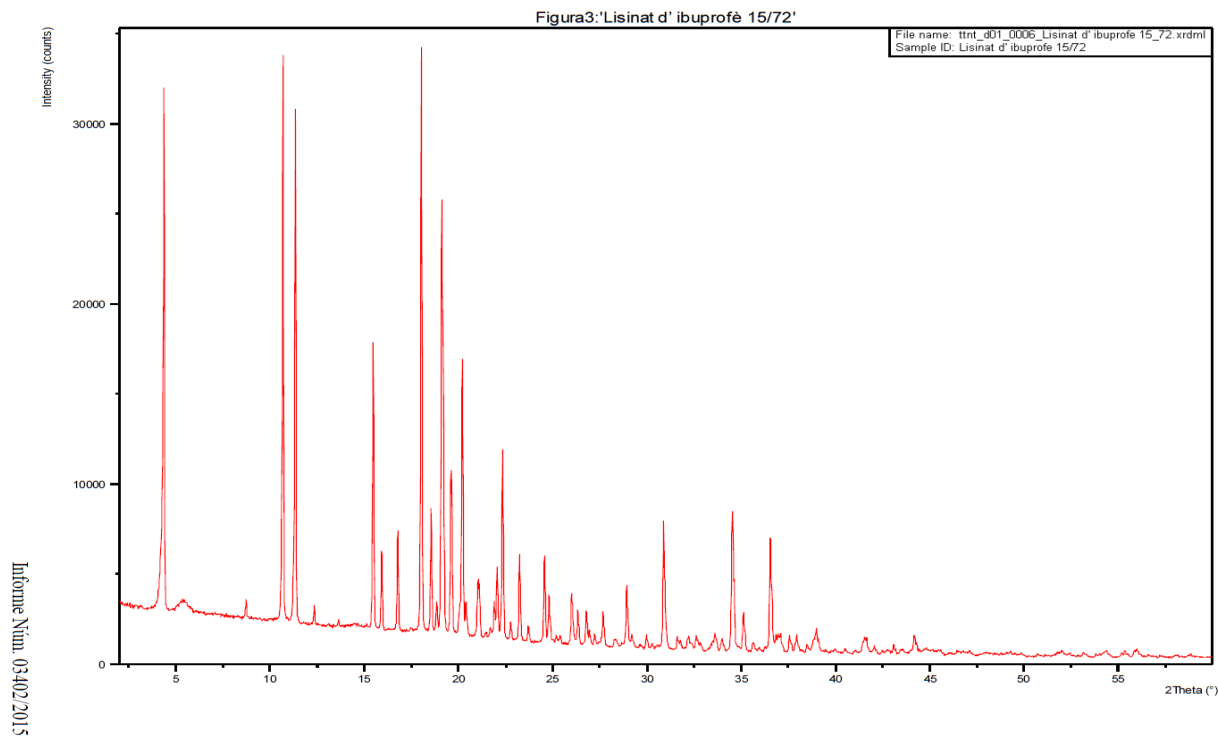
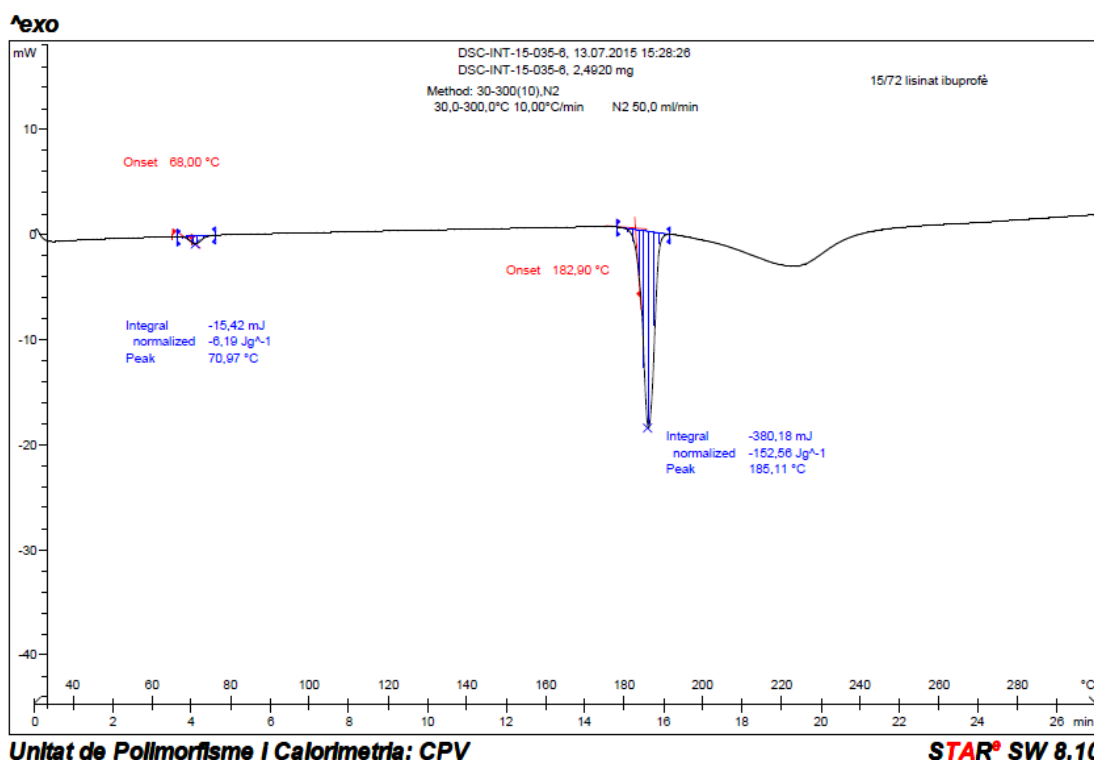


Figura 18: Difractograma de Raigs X del Lisinat d'ibuprofè



**Figura 19:** Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) del Lisinat d'Ibuprofè

L'anàlisi de la mostra per difracció de raigs X ens indica que el lisinat d'ibuprofè té una estructura cristal·lina.

Una de les característiques del lisinat d'ibuprofè és l'existència de dos formes polimòrfiques reversibles que es succeeixen per escalfament. Una de les formes és la que existeix a baixes temperatures i l'altra a temperatures elevades (Vladiskovic i Masciocchi, 2015). Aquesta característica s'ha de tenir en compte en aquells processos farmacèutics que impliquin temperatures per sobre de l'ambiental, com l'assecat, la granulació o processos de fusió-extrusió.

L'anàlisi DSC de la Fig 19 mostra una petita transició endotèrmica a 70,97 °C, (inici del pic a 68°C) amb una rampa d'escalfament de 10°C i un pic de fusió a 185,11°C. El pic endotèrmic al voltant de 70 °C està descrit a la literatura com una transició completa i també reversible a un altre polimorf (McCauley, 1991).

El termograma DSC obtingut coincideix amb el descrit a la literatura pel lisinat d'ibuprofè amb transicions endotèrmiques i de fusió a les temperatures descrites (Vladiskovic i Masciocchi, 2015).

#### 4.1.2. Alginat de sodi

##### 4.1.2.1. Nomenclatura

Denominació comú internacional (DCI)

Sodium Alginate

Nom químic

(2S,3S,4S,5S,6R)-3,4,5,6-tetrahidroxitetrahydro-2H-piran-2-carboxilat de Sodi

Altres noms

Algin

Sal sòdica d'àcid algínic

Sal sòdica d'àcid polimanurònic

Polimanuronat de sodi

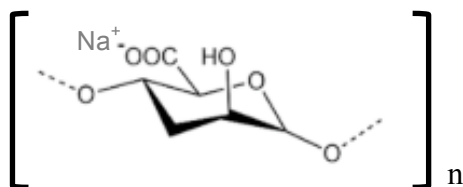
E-401

Número CAS

[9005-38-3]

##### 4.1.2.2 Estructura

Fórmula estructural



Fórmula molecular

$(C_6H_7NaO_6)_n$

Pes molecular

198,11

##### 4.1.2.3 Propietats generals

Aspecte i Forma física

Pols gruixuda o fina, pràcticament inodora i insípida, de color blanc o lleugerament groguenc.

Solubilitat

Es dissol en aigua, formant una solució col·loïdal viscosa, insoluble en alcohol o solucions hidroalcohòliques en les quals el contingut d'alcohol és superior al 30% en pes. Insoluble en cloroform, èter o àcids, quan el pH de la solució es menor de 3.

**Punt d'ebullició**

495,2°C p.a.

**Punt de fusió**

211,1°C

**4.1.2.4 Identificació i caracterització****Elucidació de l'estructura i altres característiques**

La confirmació de la seva estructura s'ha dut a terme mitjançant anàlisis espectroscòpiques de IR, 1H-RMN, difracció per raigs X i calorimetria de rastreig (DSC).

La fig 20 mostra l'espectre 1H-RMN de l'alginat sòdic amb un pic característic del guluronat, mentre els característics del manuronat queden confosos amb els pics principals de l'aigua i el solvent utilitzat per preparar la mostra (DMSO).

La Fig 22 mostra el difractograma R-X de l'alginat sòdic. S'observa una estructura de naturalesa semicristal·lina amb un pic 2 $\theta$  al voltant de 13° compatible amb els difractogrames publicats per aquesta substància i de perfil cristal·logràfic similar (Jana i col., 2015).

**Altres assajos****Taula 15:** Resultats d'assajos químics i fisicoquímics realitzats sobre l'alginat sòdic utilitzat

Assaig	Especificació	Resultat
Aspecte	Pols groguenc	Conforme
Identificació A, B (EP)	Positiva	Positiva
Aspecte dissolució S (0,10g/30 ml) EP	Conforme	Conforme
Solubilitat en Etanol 96°	Insoluble	Insoluble
Pèrdua per dessecació	≤ 15%	9,6%

Figura 20: Espectre RMN de l'alginat sòdic

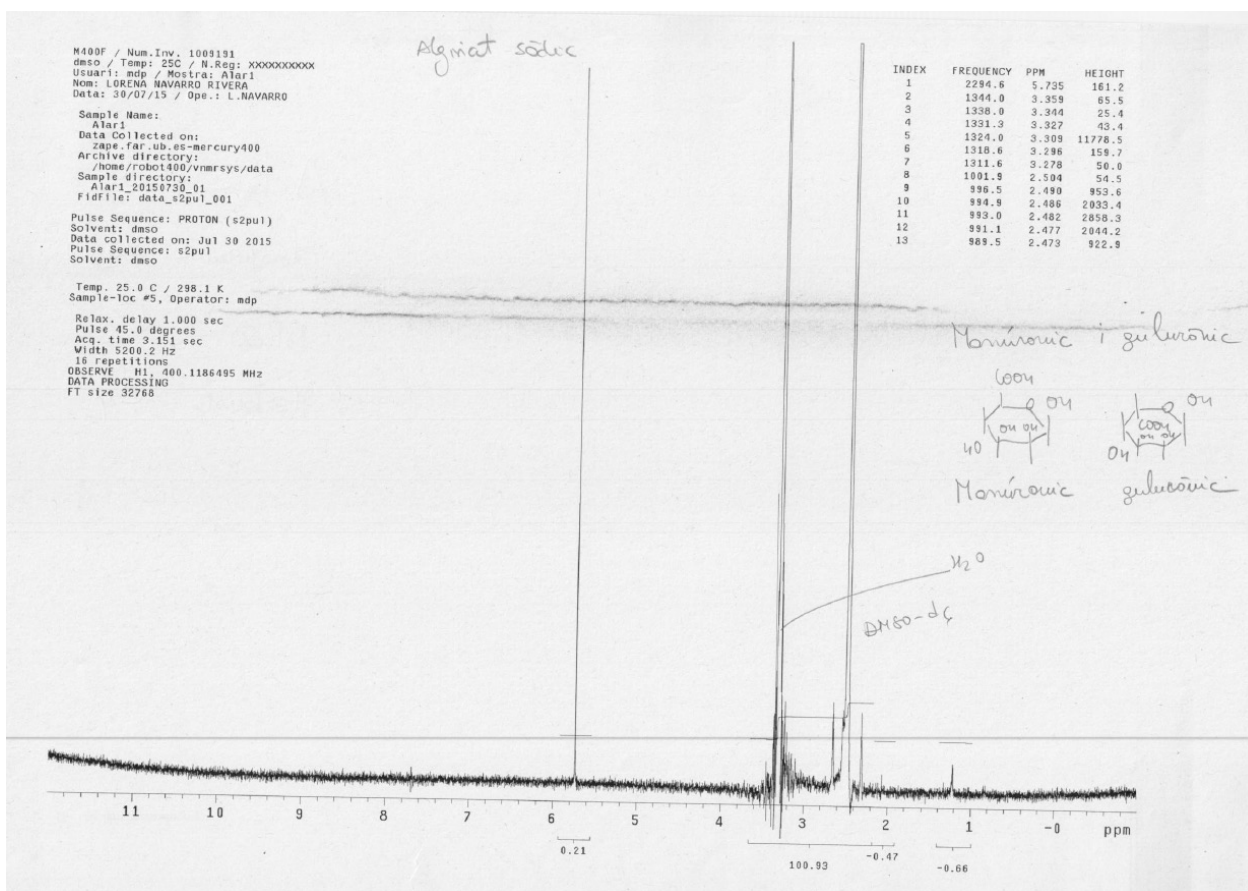
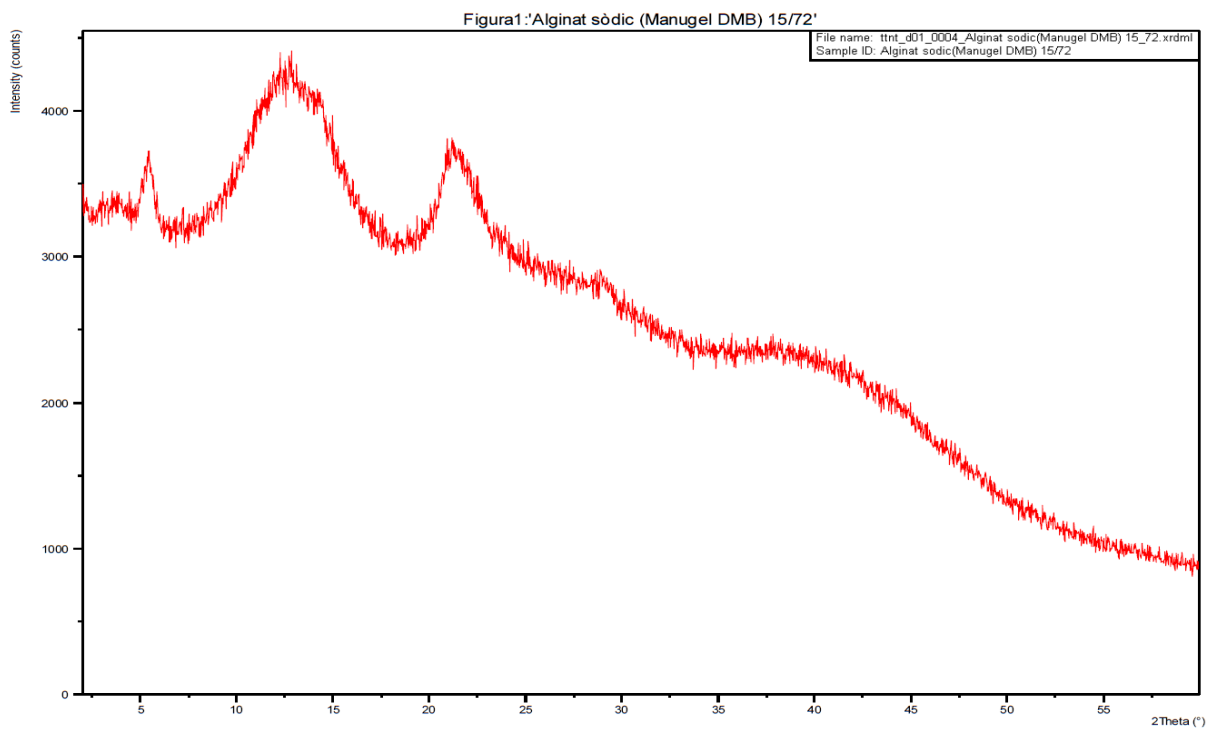
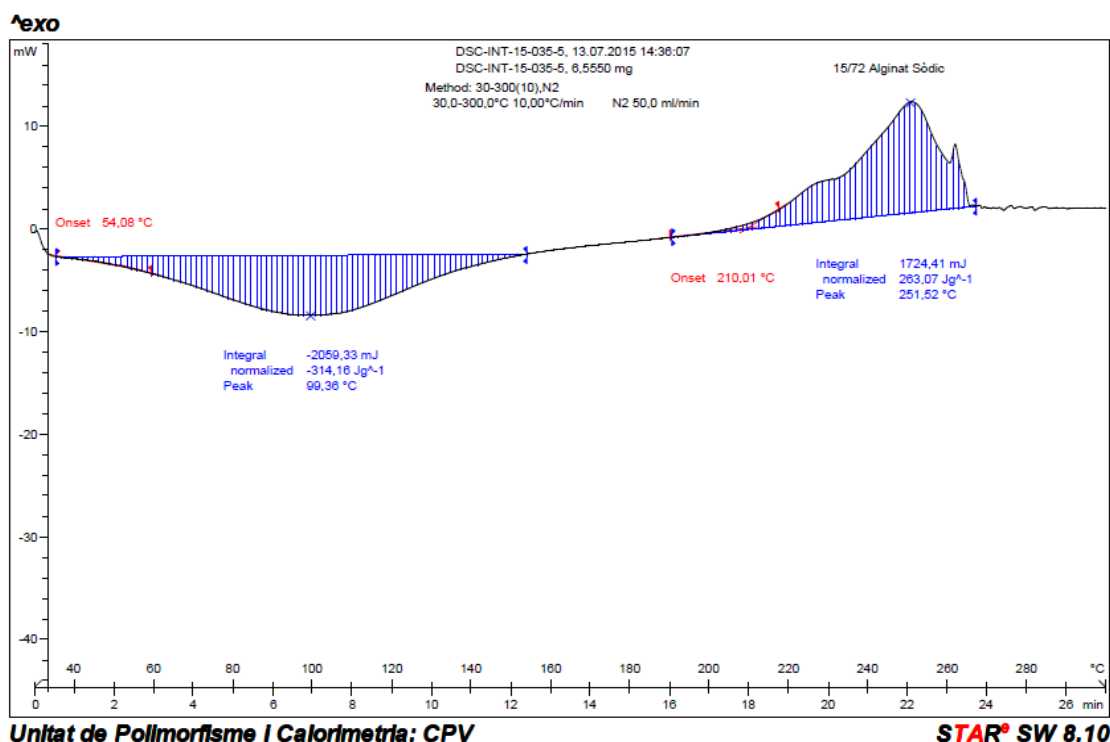


Figura 21: Difractograma de Raigs X de l'alginat sòdic



**Figura 22:** Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) de l'alginat sòdic

La figura 22 mostra el comportament tèrmic de l'alginat sòdic en atmòsfera de nitrògen. Es pot observar un pic endotèrmic centrat a 99,36°C que s'inicia a 54,08 °C amb una rampa de temperatura de 10 °C/min. Aquest pic s'atribueix al procés de deshidratació. S'observa també un gran pic exotèrmic que s'inicia a 210,01 °C amb el màxim a 251,52 °C. Aquest pic correspondria a la descomposició del biopolímer per reaccions de piròlisi que resulta en un residu carbonitzat. Aquest perfil coincideix amb el que es descriu a la bibliografia per l'alginat sòdic (Soares i col., 2004).

### 4.1.3. Chitosan

#### 4.1.3.1. Nomenclatura

Denominació comú internacional (DCI)

Chitosan

Nom químic

(1,4)-2-Amino-2-desoxy- beta-D-glucan

Altres noms

Poly(beta-(1,4)-2-amino-2-deoxy-d-glucose)

Poly(beta-(1,4)-d-glucosamine)

Poly(d-glucosamine);

Poly-(1,4)-beta-d-glucopyranosamine;

Beta-(1,4)- 2-amino-2-deoxy-d-glucose;

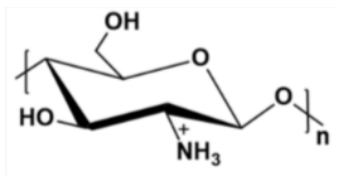
Deacetylated chitin

Número CAS

[9012-76-4]

#### 4.1.3.2. Estructura

Fórmula estructural



Fórmula molecular

(C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub>)<sub>n</sub>

Pes molecular

161,16

#### 4.1.3.3. Propietats generals

Aspecte y Forma física

Sòlid de color blanc o lleugerament cremós.

Solubilitat

Insoluble en aigua.

Soluble en solucions diluïdes d'àcids orgànics, incloent àcid fòrmic, acètic, tartàric i àcid cítric.

Soluble en àcids inorgànics excepte àcid fosfòric i sulfúric.

Densitat  
1,75 g/cm<sup>3</sup>

Índex de refracció  
1,7

#### 4.1.3.4. Identificació i caracterització

##### Elucidació de l'estructura i altres característiques

La confirmació de la seva estructura s'ha dut a terme mitjançant:

- Anàlisis espectroscòpics de 1H-RMN, RX

A la figura 23 podem observar a l'espectre RMN-H del chitosan, els pics identificats com "ac" i "d" que correspondrien als grups acetil de la glucosamina i a l'hidrogen dels grups desacetilats respectivament. Els residus corresponents a grups acetilats queden ocultats pel pic corresponent a H<sub>2</sub>O i al solvent.

La figura 24 mostra el difractograma del chitosan amb un pic intens 2 $\theta$  igual a 20°, el que coincidiria amb els difractogrames del chitosan que hi ha a la literatura (Jana i col., 2015).

##### Altres assajos

**Taula 16:** Resultats d'assajos químics i fisicoquímics realitzats sobre el chitosan utilitzat

Assaig	Especificació	Resultat
Aspecte	Pols groguenc - beig	Conforme
Olor	Característica (a peix)	Conforme
Aspecte de les solucions	Clara, viscosa, lleugerament groc –marró	Conforme
Solubilitat en aigua	Poc soluble	Conforme
Solubilitat en etanol	Insoluble	Conforme
Solubilitat en àcid acètic 1% (v/v)	Soluble	Conforme
Grau de desacetil·lació	≥85%	Conforme



Figura 23: Espectre RMN del Chitosan

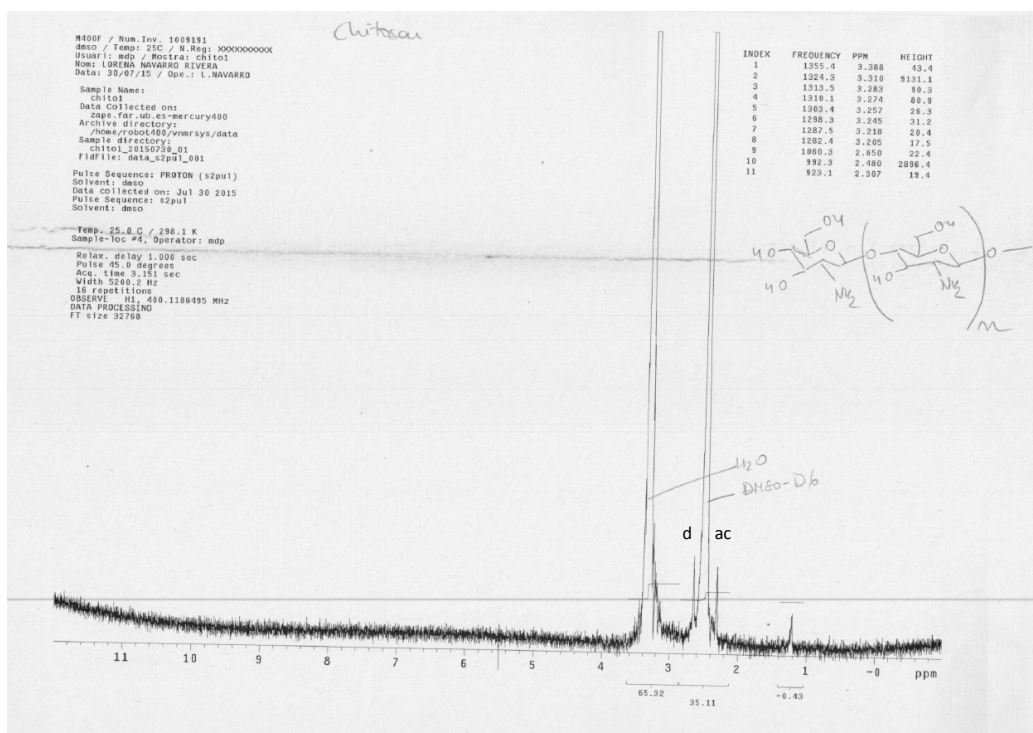


Figura 24: Difractograma de Raigs X del Chitosan

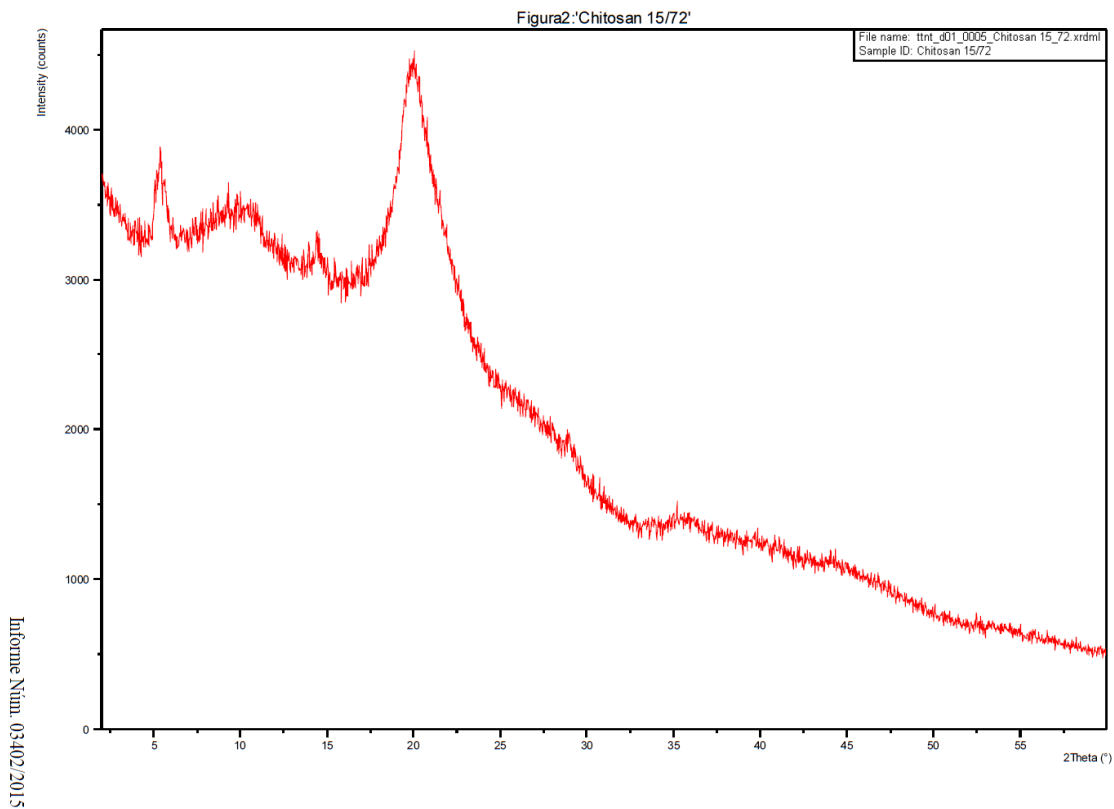
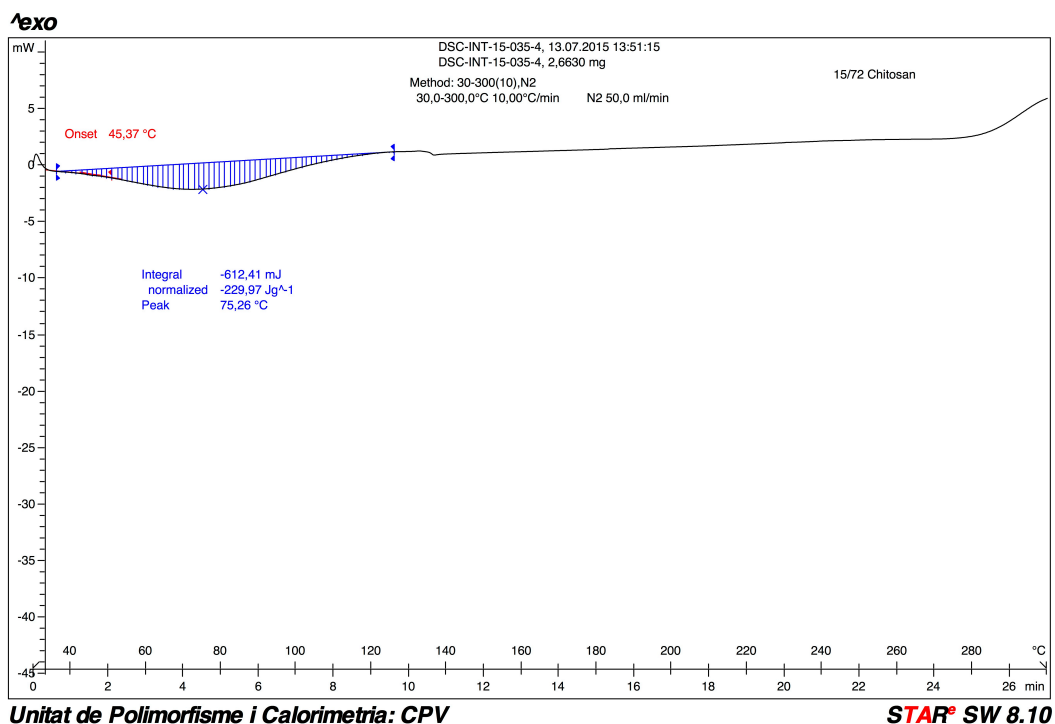


Figura 25: Termograma de Calorimetria Diferencial de Rastreig (DSC) del Chitosan



Al termograma de la figura 25 s'observa una endoterma suau centrada a 75,26°C amb inici als 45,37 °C i acaba al voltant dels 120 °C que podria explicar-se per l'eliminació d'aigua unida a la mostra. Podem veure com el rastreig de temperatura es va fer en un rang de 30 a 300 °C. Els estudis publicats posen de manifest l'aparició d'una exoterma important entre 300 i 325 °C (Jana i col., 2017). En aquest cas l'exoterma no apareix probablement degut al rang de rastreig insuficient, tot i que cap al final del termograma s'aprecia un lleuger pendent que podria ser l'inici d'aquesta exoterma.

Pel chitosan no s'observa cap temperatura de transició cristal·lina, el que s'atribueix a la seva naturalesa cristal·lina rígida i les fortes interaccions intra i intermoleculars per ponts d'hidrogen. Això també justificaria l'elevada temperatura de descomposició, (Jana i col., 2017) no observada en el termograma per succeir a temperatures superiors i fora del rang avaluat.



## 4.2. Avaluació i posta a punt del mètode de preparació de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè

### 4.2.1. Granes d'alginat (placebo)

La primera fase del treball ha consistit en posar a punt la metodologia d'obtenció de granes d'alginat, tant pel que fa a concentracions de polímer i de coagulant, com els procediments i condicions de preparació. La tècnica bàsica, és senzilla i està suficientment descrita a la literatura científica (Gombotz i col., 1998; Murata i col., 2003; Yeguín i col., 2007), no obstant, ha estat necessari transferir-la al nostre laboratori i posar-la a punt per tal que sigui reproduïble i fiable.

Per aquest motiu, els primers experiments s'han realitzat sense encapsular fàrmac amb l'objectiu de definir el procediment a utilitzar i veure la capacitat d'aquest per l'obtenció de granes d'alginat estables i de manera reproduïble, per posteriorment passar a la preparació de granes ja amb lisinat d'ibuprofè encapsulat.

En qualsevol cas, en aquesta primera fase s'ha tractat d'avaluar la viabilitat de la proposta i establir un espai de disseny preliminar dins el que posteriorment poder treballar per optimitzar el mètode de preparació, caracteritzar les granes i establir una composició i sistemàtica experimental.

En base a les dades bibliogràfiques es planteja experimentar amb diferents concentracions de polímer i de coagulant  $\text{CaCl}_2$ .

S'inicien els experiments amb concentracions baixes de polímer (solucions d'alginat de l'1% p/v) i també de coagulant (1%  $\text{CaCl}_2$  p/v) i s'obtenen granes d'uns 1,3 mm de diàmetre (humides), transparents i més denses que el medi de coagulació, pel que es submergeixen totalment en el medi de preparació, aspecte que resulta interessant en tant el procés de coagulació es produeix de manera més eficient al interaccionar el líquid coagulant amb el polímer de manera homogènia.

El mètode permet reproduir les granes en lots successius de manera correcta. Transcorreguda una setmana les granes dipositades en un dessecador es mantenen estables en la seva forma i aspecte havent perdut un cert volum degut a la pèrdua d'aigua per assecat .

No s'avaluen concentracions de polímer i de coagulant inferiors a l'1% p/v, es parteix d'aquest percentatge mínim referit en la literatura (Murata i col. 2003) i es va incrementant a 2%, 3% i 4%.

Les granes d'alginat sense fàrmac (placebo) es produeixen correctament a totes les concentracions de polímer i clorur de calci assajades. Es descarten concentracions de polímer superiors al 3% per mostrar-se excessivament viscoses i impedir una adequada extrusió amb els dispositius emprats i el diàmetre d'agulla seleccionat per aquesta sèrie d'experiments ( $\varnothing = 0,25$  mm). Aquesta constatació coincideix amb el que han trobat altres autors (Joshi i col., 2012). Existeixen treballs publicats a on s'utilitzen concentracions del 4 % p/v (Paparakis i Bouropoulos, 2012), no obstant, en aquests treballs es posa de relleu la utilització d'alginats sòdics de baixa viscositat, el que explicaria el fet que es puguin obtenir granes a concentracions d'alginat superiors al 3% p/v sense dificultats. Tanmateix aquests autors utilitzen pels seus treballs, agulles per l'extrusió de diàmetre superior (0,7 mm) el que encara

contribuiria més a no tenir dificultats per l'extrusió del polímer quan la viscositat d'aquest augmenta.

S'aprecia visualment que a mesura que es va augmentant la concentració de  $\text{CaCl}_2$  del bany de coagulació, la facilitat per formar-se les granes també augmenta i per tant millora notablement l'eficiència del procediment de preparació.

Una major concentració de clorur de calci, proporciona una major quantitat de calci disponible per formar els entrecreuaments de les cadenes d'alginat. L'excés de ions calci fa que el procés de formació dels entrecreuaments sigui més instantani i les granes es formen de manera immediata i homogènia tan bon punt la gota de polímer extrusionada penetra dintre el bany de coagulació (Tavakol i col., 2013).

Per les proves posteriors es selecciona aquest mètode com a vàlid i utilitzant per l'extrusió una agulla de 0,25 mm de diàmetre.

#### 4.2.2. Granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè

A partir de la metodologia bàsica i dels resultats satisfactoris obtinguts amb la producció de granes placebo, s'inicien els experiments per determinar la capacitat de l'alginat per retenir de forma efectiva lisinat d'ibuprofè i formar granes estables amb aquest fàrmac. Es tracta doncs, d'establir les capacitats del polímer per retenir el lisinat d'ibuprofè sense perdre l'estructura de la matriu (grana) i mantenir els entrecreuaments propiciats pels ions de calci que se situen a les cavitats electronegatives de l'alginat unint les diferents cadenes polimèriques. El lisinat d'ibuprofè s'ha d'integrar entre aquestes cadenes permetent a la vegada que es mantinguin els entrecreuaments i per tant l'estructura de la matriu no es trenqui.

Les diferents proves preliminars efectuades posen de manifest la necessitat d'utilitzar una matriu suficientment concentrada de polímer per tal de suportar l'encapsulació d'una quantitat apreciable i útil de principi actiu.

En el cas del lisinat d'ibuprofè i degut a la necessitat d'una dosificació relativament elevada per a tenir possibilitats d'utilitat terapèutica, entre 200 mg i 600 mg d'ibuprofè base per dosi, aquest aspecte resulta rellevant. Cal disposar de matrius suficientment concentrades com per poder ser utilitzades de manera tècnicament viable en la preparació d'un medicament. Tanmateix i per aquest motiu, es realitzen proves de càrrega amb la finalitat de determinar un espai de concentració adequat per la realització experimental posterior.

Les relacions en pes polímer/fàrmac utilitzades en treballs publicats van de 0,5:1 fins a 1:10 utilitzant l'ibuprofè àcid (Hwang i col 1995), el nicardipí (Takka i col., 1998) o la hidro cortisona (Murata i col 2003). En tots aquests estudis s'utilitza el fàrmac dispersat en la solució de polímer en comptes d'utilitzar-lo dissolt com es el cas del lisinat d'ibuprofè del present treball.

##### 4.2.2.1. Proves de càrrega

El rang de concentracions descrit a la bibliografia resulta a la pràctica insuficient per a les aspiracions terapèutiques d'un hipotètic medicament a base de lisinat d'ibuprofè i s'amplia fins a proporcions de polímer/fàrmac 1:25. Cal tenir present que la part inactiva del fàrmac, la lisina, fa una contribució relativament pesada al conjunt de la substància que suposa al voltant d'un 40% del pes molecular total del lisinat d'ibuprofè, per aquest motiu, cal disposar d'una

capacitat de càrrega suficientment elevada de les granes per tal que la part activa sigui adequada a una dosificació raonable i terapèuticament útil.

Les proves s'han realitzat inicialment amb concentracions de polímer a l'1% i Clorur de calci 3% posant de manifest la possibilitat d'obtenir granes amb una proporció de lisinat d'ibuprofè en el polímer del 20 % p/p.

Amb una matriu de l'1% p/v d'alginat s'aconsegueix l'encapsulació de lisinat d'ibuprofè actiu fins el 10% p/p, però no al 25% p/p. No obstant, s'aprecia que les granes obtingudes amb un 10% p/p són molt poc estables i perden consistència en pocs dies.

Quan la concentració de la matriu s'augmenta a 3% p/v, la capacitat d'encapsulació i d'estabilitat també aparentment s'incrementa. El resultat en aquesta fase experimental preliminar (taula 17) són *de visu* i no s'ha aplicat cap criteri de mesura quantitativa per definir la magnitud d'aquesta afirmació, altre que l'apreciació visual de la facilitat amb què les granes es formen i es mantenen de forma estable en el temps.

**Taula 17:** Influència de la càrrega de fàrmac en la formació de les granes

Concentració de fàrmac % (p/p)	Concentració de polímer % (p/v)		
	1	2	3
5	+	+	+
10	+	+	+
15	+	+	+
20	+/-	+	+
25	-	+/-	+

(+) formació de granes (-) No formació

Per tenir un marge suficient de treball i que la quantitat de lisinat d'ibuprofè no suposi una variable no controlada en l'optimització del mètode de preparació, en base a les proves de càrrega realitzades, es decideix establir per a tots els experiments posteriors una concentració fixa del 17% (p/p) de lisinat d'ibuprofè a les solucions de polímer. Aquesta quantitat correspon a aproximadament un 10% (p/p) d'ibuprofè base.

Aquesta concentració, és la quantitat dissolta a la solució del polímer, el que suposa relacions d'Alginat sòdic / lisinat d'ibuprofè de l'ordre de 1:17, 2:17 i 3:17 respectivament per les solucions de polímer de l'1, 2 i 3% (p/v), respectivament.

#### 4.2.2.2. Temps de coagulació

Anomenem temps de coagulació o temps d'enduriment, al temps que romanen les granes en el bany abans del seu filtrat i rentat. Aquest, pot ser un paràmetre a controlar, en tant uns temps excessius, sobre el paper poden provocar migracions a favor de gradient de concentració per part del lisinat d'ibuprofè encapsulat cap al bany de gelificació per processos de difusió passiva. No obstant, temps insuficients, podrien fer que l'estructura sigui feble per una insuficient formació d'entrecruaments intercatenaris amb els ions calci, sobretot a la part interior de la grana, donant com a resultat granes inestables que acabin perdent la seva integritat al ser extreïdes del bany i assecades.

Quan les granes es deixen 24 hores submergides en aigua desionitzada, s'observa que queden totalment transparents, fet representatiu de la total migració del principi actiu cap al medi, ja

que en un inici les granes obtingudes amb principi actiu encapsulat presenten un aspecte totalment blanc. Quan es deixen diversos dies (en el bany de gelificació) les granes tot i quedar transparents, no s'acaben dissolent, és a dir que la matriu no és soluble en aquestes condicions.

Tots els temps de coagulació permeten la producció de granes suficientment estables.

S'obtenen granes homogènies d'entre 1,0 i 1,5 mm de diàmetre, inicialment translúcides i un cop endureixes, de color blanc, totalment opaques i més denses que el medi, que no s'adhereixen entre elles un cop seques i amb molt poca adherència quan estan humides. El mètode d'obtenció de la grana és reproducible. La grana després d'un mes de la seva preparació continua mantenint el seu aspecte. No s'ha degradat, han perdut cert volum, gairebé be imperceptible, degut a l'eliminació d'aigua per l'assecat. Un cop assecades les granes tenen un diàmetre entre 0,7 i 1,3 mm.

A la taula 18 es presenten els resultats relatius a la influència del temps de coagulació i endureiment en la formació i estabilitat de les granes en el medi de coagulació.

**Taula 18:** Influència del temps de coagulació en la formació i estabilitat de les granes

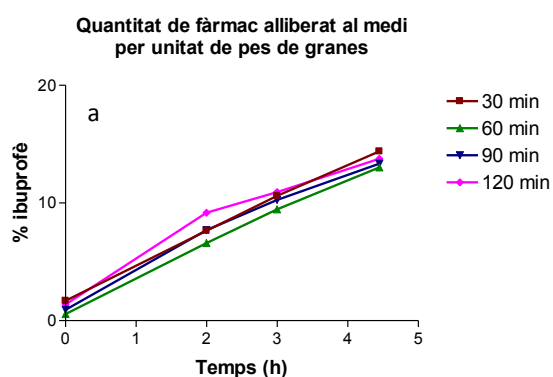
Temps de coagulació (min)	Concentració de polímer % (p/v)		
	1	2	3
30	+	+	+
60	+	+	+
90	+	+	+
120	+	+	+

(+) formació de granes (-) No formació

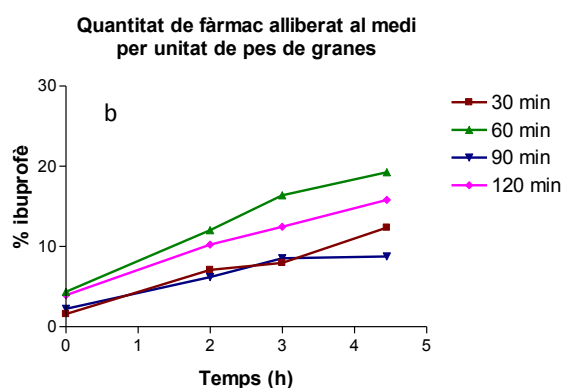
Per aquestes granes s'ha avaluat el perfil d'alliberament estàtic (sense agitació) i en aigua desionitzada.

**Figura 26:** Influència del temps d'enduriment en l'alliberament estàtic

**Ibuprofè (lisinat) 10% - Alginat 2% - CaCl<sub>2</sub> 3%**



**Ibuprofè (lisinat) 10% - Alginat 2% - CaCl<sub>2</sub> 1%**



Els resultats de la figura 26b posen de manifest que diferents temps d'enduriment podrien donar lloc a perfils o quantitat de fàrmac encapsulat diferent. No obstant, cal tenir present que aquests resultats han estat obtinguts en els estudis preliminars amb granes que s'obtenen a concentracions de calci baixes (1%) mentre que les obtingudes amb concentracions més elevades (3%) donen perfils més homogenis (figura 26a).

Es pot observar a la figura 26b com no hi ha una relació clara entre el temps d'enduriment i el perfil d'alliberament estàtic obtingut. Granes endurides a 30 i 90 minuts presenten perfils similars amb quantitats d'ibuprofè inferiors, mentre que les obtingudes amb 60 i 120 minuts d'enduriment alliberen quantitats de fàrmac superiors. Aquesta manca de relació entre les variables pot ser indicatiu de què donades les baixes concentracions d'ió gelificant probablement s'obtinguin granes de contingut poc homogeni i amb pèrdues de fàrmac durant la preparació no controlades.

Així doncs, en base a aquests primers resultats preliminars (figura 26a) podríem deduir una certa independència respecte el temps d'enduriment, és a dir, que totes les granes donen perfil d'alliberament i càrregues de fàrmac molt similars, tant si els temps d'enduriment han estat curts com llargs, no obstant, caldrà verificar-ho amb l'experimentació posterior i amb la sistematització de les variables mitjançant un disseny experimental adient.

#### 4.2.2.3. Concentració de polímer

Veient la importància que té la concentració d'alginat, s'experimenta amb concentracions de polímer fins el 4% (p/v). La possibilitat d'incrementar la concentració d'alginat, queda limitada per l'elevada viscositat que adquireix la solució, el que impossibilita treballar-hi adequadament, concretament dissoldre el principi actiu i extrusionar la preparació per obtenir les granes.

Si bé com s'ha comentat amb anterioritat, alguns autors descriuen en els seus treballs granes obtingudes amb concentracions de polímer del 4% p/v i inclús superiors (Paparakis i Bouropoulos, 2012), això pot explicar-se pel tipus d'alginat utilitzat en tant en funció de la diferent composició en cadenes d'àcid manurònic i àcid gularònic presenten més o menys viscositat, el que suposa un diferent comportament a l'hora de barrejar-lo amb altres components i d'extrusionar-lo.

**Taula 19:** Capacitat del procediment per l'obtenció de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè (17% p/v)

Concentració CaCl <sub>2</sub>	Concentració de polímer % (p/v)		
	1	2	3
1	-	-	+
2	-	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+

(+) formació de granes (-) No formació

La concentració de polímer també afecta la mida de les granes i la seva homogeneïtat.

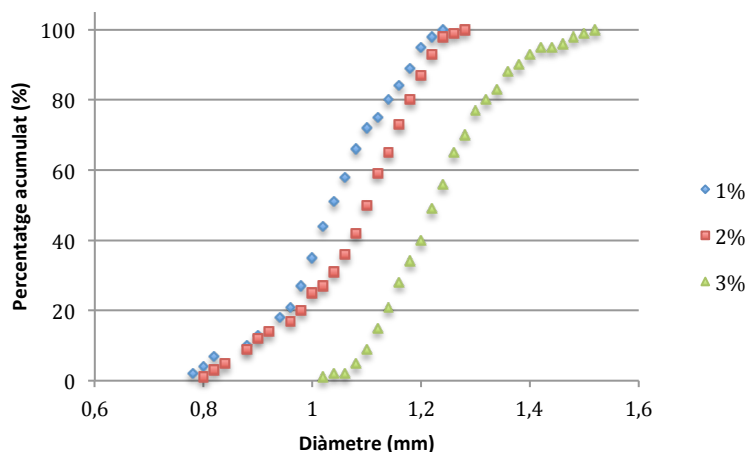
La viscositat de la solució polimèrica influeix, de tal manera que concentracions baixes d'alginat (1%) deriven en granes molt petites. Mentre que concentracions de polímer del 3% produeixen granes més grans.

Aquesta diferència de diàmetres es deu als fenòmens de la tensió superficial tal i com també descriuen altres autors (Badwan et al 1985).



També s'ha observat que concentracions elevades de polímer produeixen deformacions de les granes i a banda resulta més difícil la seva formació, donada l'elevada viscositat i per tant, la dificultat de passar a través de l'agulla d'extrusió.

Figura 27: Percentatges acumulats de la distribució de mides en funció de la concentració de polímer



Sota la base dels resultats obtinguts d'aquesta sèrie d'experiments de posta a punt del mètode de preparació, es confirma que el lisinat d'ibuprofè s'encapsula de forma apropiada amb l'alginat de sodi, a una concentració d'ibuprofè com a base del 10% en el polímer sense necessitat *a priori* d'altres recobriments, contràriament al que descriu alguna de la literatura existent (Sevgi i col., 2008) a on es suggereix la formació de granes excessivament poroses i en conseqüència amb escassa capacitat de retenció del principi actiu quan aquest és soluble.

El comportament i formació de les granes pot estar influenciat per la concentració de l'ió gelificant, el temps d'enduriment o altres factors que caldrà determinar en posteriors experiments.

Les matrius d'alginat són estables en el medi de dissolució utilitzat i no es dissolen en les condicions d'assaig. Caldrà verificar el seu comportament a diferents pHs i amb solucions reguladores de pH, simulant condicions fisiològiques (pHs gàstrics i intestinals) així com el grau d'encapsulament que s'assoleix en funció de les diferents variables a controlar.

En base als resultats preliminars es decideix sistematitzar la caracterització i optimització del mètode de preparació, així com aprofundir en les característiques de les granes d'alginat obtingudes valorant altres paràmetres del procediment com el comportament en funció del pH del bany de gelificació, l'avaluació de l'encapsulament, l'inflament i l'alliberament a diferents pHs.

Amb la finalitat de parametritzar aquests elements i consolidar un espai de disseny adequat per a futurs experiments, es planteja un disseny experimental de tipus factorial amb les següents premisses i objectius.

Controlar diferents paràmetres i establir experiments basats en disseny factorial, en base a les següents variables independents:

- Concentració de la solució inicial de polímer (rang de treball: entre 1 i 3% p/v)
- Concentració  $\text{CaCl}_2$  en la solució coagulant (rang de treball: entre 1 i 4% p/v)
- Temps d'enduriment (rang de treball entre 30 i 120 min)

Caracterització de les esferes obtingudes:

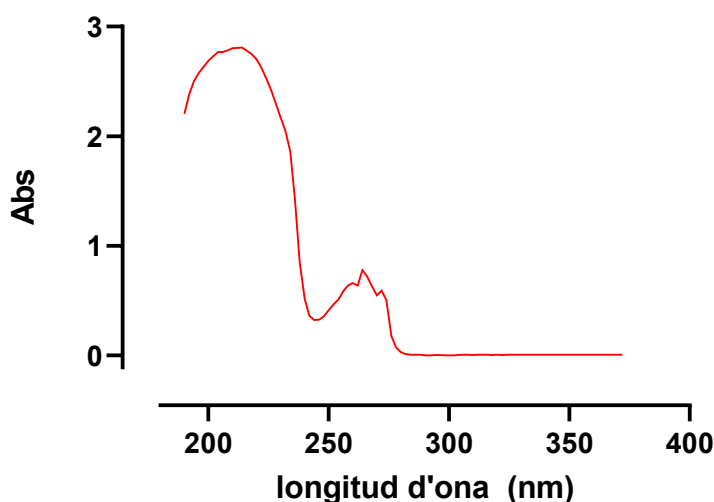
- Contingut de principi actiu i Eficiència d'encapsulament
- Estabilitat (integritat en el temps)
- Característiques d'inflament en funció del pH del medi
- Perfil d'alliberament del fàrmac en funció del pH del medi



### 4.3. Mètode analític per a la determinació del lisinat d'ibuprofè

Es fa necessari disposar d'un mètode analític fiable per a la determinació quantitativa del lisinat d'ibuprofè en els diferents experiments, principalment per mesurar l'encapsulament i contingut del fàrmac. El mètode analític utilitzat per a la determinació quantitativa del lisinat d'ibuprofè en els diferents experiments és l'espectrofotomètric per lectura UV a  $\lambda = 258$  nm. Aquest mètode es va seleccionar després de consultar diversa bibliografia com farmacopees i textos d'anàlisi (Moffat i col., 2011), així com realitzar l'espectre d'absorció UV pel lisinat d'ibuprofè i verificar un màxim d'absorció UV a aquesta longitud d'ona que no interferia amb els altres components de les granes (Figura 28).

Figura 28: Espectre d'absorció UV-VIS del lisinat d'ibuprofè



#### 4.3.1. Validació del mètode espectrofotomètric per a la determinació del lisinat d'ibuprofè en matrius biopolimèriques

A continuació es detallen els resultats dels diferents paràmetres avaluats per verificar la idoneïtat i fiabilitat del mètode a utilitzar per les determinacions quantitatives de lisinat d'ibuprofè en els diferents experiments.

##### 4.3.1.1. Especificitat

Determina la capacitat del mètode per quantificar de manera inequívoca l'analit i garantir que no es produiran interferències per altres elements o ingredients de la formulació.

Les microcàpsules preparades contenen només alginat càlcic i en alguns casos també chitosan. Es tracta de descartar la interferència dels biopolímers en la determinació del lisinat d'ibuprofè.

Per determinar la selectivitat s'avaluen mostres que contenen l'analit amb placebo, i mostres que contenen només l'analit sense presència dels biopolímers. Es procedeix a la lectura a  $\lambda = 258$  nm.

S'observa un lleuger increment en els valors d'absorbància a les mostres que contenen placebo respecte les mostres que només contenen el solvent. Tot i que és tracta d'una variació molt poc significativa, aquest resultat porta a fer sempre una correcció de la mesura amb una preparació placebo, corregint el valor d'absorbància del placebo en el valor d'absorbància obtingut a la determinació quantitativa de l'analit.

No obstant, el resultat que obtenim de la mostra placebo amb alginat i chitosan i a la que hem afegit el lisinat d'ibuprofè, no difereix de la mostra que conté només el tampó fosfats sense els biopolímers.

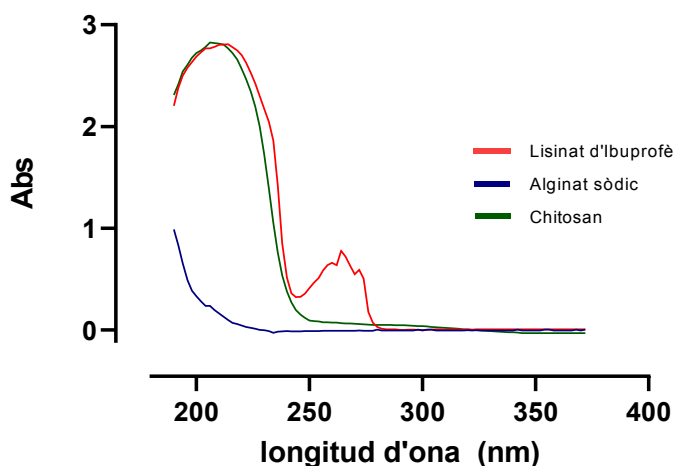
Les mesures s'han realitzat amb la correcció de blanc del tampó fosfats pH=8.

**Taula 20:** Resultats obtinguts en l'estudi d'especificitat del mètode

Determinació	Concentració teòrica (mg/ml)	Abs		Concentració observada (mg/ml)		Recuperació (%)	
		Placebo(+)	Placebo(-)	Placebo(+)	Placebo(-)	Placebo(+)	Placebo(-)
1	0,502	0,331	0,326	0,502	0,494	99,98	98,50
2		0,333	0,328	0,505	0,497	100,57	99,10
3		0,334	0,328	0,506	0,497	100,87	99,10
n =		3	3	3	3	3	3
mitja =		0,333	0,369	0,504	0,496	101,59	98,90
DE =		0,00153	0,0012	0,0023	0,0017	0,4519	0,3416
CV%=		0,460	0,357	0,450	0,345	0,445	0,345

Aquests resultats mostren una diferència del 1,6% quan l'analit està en presència de biopolímer. Per aquest motiu les mostres en les que hi hagi un contingut elevat de biopolímer, es prepararà un placebo equivalent per fer el zero de l'espectrofotòmetre. Les mostres en les que s'aplicarà aquesta correcció seran les utilitzades per a la determinació de les eficiències d'encapsulament, en tant, en aquest cas la mesura ha de ser el més fiable possible. No es corregirà quan es determinin mostres de cinètiques d'alliberament ja que en aquest cas la mostra està molt diluïda, la possible quantitat de polímer present en el medi molt baixa i l'exactitud quantitativa de la mesura no és un aspecte rellevant per determinar el perfil d'alliberament.

**Figura 29:** Espectre d'absorció UV-VIS del lisinat d'ibuprofè, de l'alginat sòdic i del chitosan



La superposició dels espectres d'absorció ultraviolada-visible posa de manifest la pràcticament nul·la absorció dels biopolímers utilitzats a la longitud d'ona de lectura del lisinat d'ibuprofè.

#### 4.3.1.2. Linealitat

La linealitat determina que el mètode produeix una resposta proporcional a la concentració dintre del rang de treball, en aquest cas el rang estudiat inclou de 50 a 150 % de les concentracions esperades a la mostra analítica.

Els resultats de linealitat es basen en les següents concentracions:

Punt 1a (50 %): 24,1 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 1b (50 %): 24,9 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 2a (70 %): 37,4 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 2b (70 %): 35,8 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 3a (85 %): 40,8 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 3b (85 %): 42,2 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 4a (100%): 50,2 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 4b (100%): 49,4 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 5a (115%): 58,2 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 5b (115%): 57,1 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 6a (130%): 64,3 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 6b (130%): 64,7 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 7a (150%): 74,5 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat  
 Punt 7b (150%): 75,2 mg de lisinat d'ibuprofè en 100 ml de tampó fosfat

#### Resultats de Linealitat

S'avaluen 7 punts per duplicat que inclouen del 50 al 150% de les concentracions de la mostra analítica (0,500 mg/ml).

**Taula 21:** Resultats de linealitat i factor de resposta

Id. mostra	X = concentració mg/ml	Y = resposta (ABS)	FR (y/x)
1a	0,241	0,157	0,653
1b	0,249	0,166	0,667
2a	0,374	0,239	0,639
2b	0,358	0,235	0,657
3a	0,408	0,270	0,662
3b	0,422	0,275	0,652
4a	0,502	0,335	0,667
4b	0,494	0,321	0,650
5a	0,582	0,388	0,667
5b	0,571	0,374	0,655
6a	0,643	0,424	0,659
6b	0,647	0,432	0,668
7a	0,745	0,493	0,662
7b	0,752	0,505	0,672

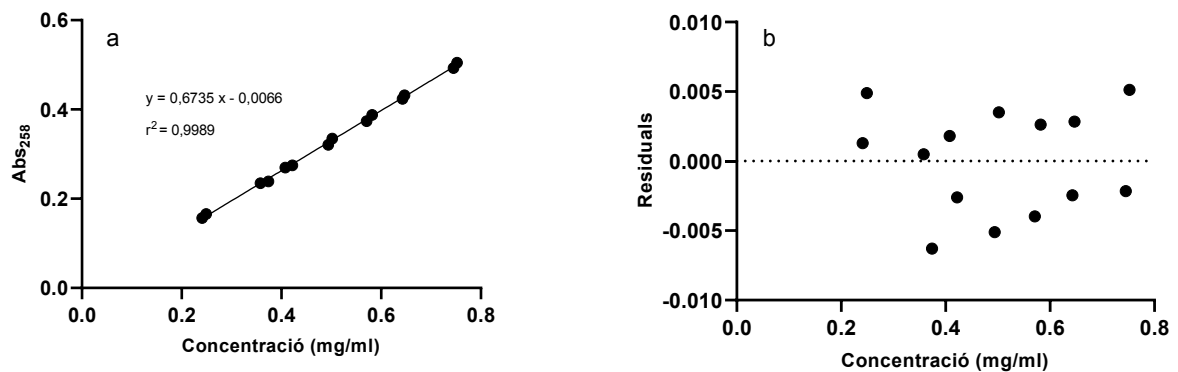
### Test de linealitat

Dels resultats experimentals s'obté la següent recta de regressió:

$$y = 0,6735 x - 0,0066$$

$$\text{amb } r = 0,9994 \quad \text{y} \quad r^2 = 0,9989$$

**Figura 30:** Recta de regressió lineal (a). Residuals (b)



Error estàndard de l'ordenada a l'origen:  $S_a = 0,003408$

Error estàndard del pendent:  $S_b = 0,006503$

Es demostra de manera inequívoca la correlació entre les variables  $x$  i  $y$ , essent explicat un 99,9 % dels resultats obtinguts mitjançant correlació.

El 99,9 % dels resultats compleixen amb la relació obtinguda.

$r$  i  $r^2$  es troben inclosos dintre dels límits d'acceptació per a la determinació ( $\geq 0,995$ ).

A partir dels valors experimentals pel factor de resposta (FR) s'obtenen els següents resultats:

### Càlculs del factor de resposta

Mitja del factor de resposta (FR) = 0,659

Desviació estàndard de FR: DE = 0,009

$$\text{Coeficient de variació} = \frac{\text{DE FR}}{\text{FR}} \times 100 = 1,31 \%$$

Criteris d'acceptació :  $\text{CV FR} \leq 2\%$

El coeficient de variació compleix amb el criteri d'acceptació.

**Verificació de la prova de sensibilitat**

Proba t:

$$t_{\text{exp}} = |b| / S_b = 103,57$$

$$t_{\text{taules}} = 2,179 \text{ (14-2 = 12 gl)}$$

Compleix la prova t-Student de la pendent on  $t_{\text{exp}} > t_{\text{taules}}$ **Interval de confiança**

$$\text{IC95\%} = b \pm t \cdot s_b = 0,6735 \pm 2,179 \cdot 0,006503 = (0,6593 \text{ a } 0,6877)$$

L'interval de confiança del pendent no inclou zero. El pendent per tant, és diferent de zero, el que demostra l'existència de correlació entre variables.

**Verificació de la variable independent o proporcionalitat**

Proba t:

$$t_{\text{exp}} = |a| / S_a = 1,94$$

$$t_{\text{taules}} = 2,179 \text{ (14-2 = 12 gl)}$$

Compleix la prova t-Student de l'ordenada a l'origen on  $t_{\text{exp}} < t_{\text{taules}}$ **Interval de confiança**

$$\text{IC 95\%} = a \pm t \cdot s_a = -0,0066 \pm 2,179 \cdot 0,003408 = (-0,01403 \text{ a } 0,00826)$$

L'interval de confiança de la ordenada a l'origen inclou zero. Es demostra, per tant, que l'origen a l'eix d'ordenades no difereix significativament de zero, el que verifica la idoneïtat del mètode sense veure's afectat per l'error sistemàtic.

**Test d'homogeneïtat de variància de Cochran aplicada a la variació de l'absorbància****Taula 22:** Valors d'Absorbància per a cadascun dels replicats

Mostra	1	2	3	4	5	6	7
A	0,653	0,639	0,662	0,667	0,667	0,659	0,662
B	0,667	0,657	0,652	0,655	0,655	0,668	0,672
Mitja	0,660	0,648	0,657	0,659	0,661	0,664	0,667
DE	0,0096186	0,0124861	0,0072156	0,0123978	0,0088171	0,0058605	0,0069704
Variància	0,0000925	0,0001559	0,0000521	0,0001537	0,0000777	0,0000343	0,0000486

$$S^2_{\text{max}} = 2,4306 \times 10^{-8}$$

$$\sum S_i^2 = 6,8785 \times 10^{-8}$$

$$G_{\text{exp}} = S^2_{\text{max}} / \sum S_i^2 = 0,3534$$

$$G_{\text{tabulada}} (\alpha=0,05; K=7; n=2) = 0,3726$$

$$G_{\text{exp}} < G_{\text{tabulada}}$$

La variància de la concentració és homogènia el que indica que el factor de concentració no afecta la variabilitat dels resultats.



#### 4.3.1.3 Exactitud

L'exactitud permet determinar la fiabilitat del mètode per donar un resultat analític proper al valor de contingut real. Com més propers siguin els valors del resultat analític i el real, més exacte és el mètode. La determinació de l'exactitud permet establir també la capacitat del mètode utilitzat per recuperar l'analít contingut a la mostra. La recuperació és un paràmetre de validació especialment rellevant quan el fàrmac, com és el cas de les microcàpsules, es troba retingut en una matriu i cal garantir que el procediment utilitzat és capaç d'alliberar-lo en un percentatge suficient per fer la determinació prou fiable.

Donat que el mètode per encapsular en si ja aporta incertesa i per tant no es pot disposar de granes patró amb una concentració coneguda de lisinat d'ibuprofè, per determinar l'exactitud es fa partint d'una barreja de granes blanques (sense principi actiu) a la que s'afegeix una quantitat de lisinat d'ibuprofè patró coneguda i similar a la que s'espera que contingui la preparativa analítica de les granes per l'eficiència d'encapsulament. El procediment seguit després és exactament el descrit per l'avaluació del contingut de les granes amb l'objecte de veure quant ibuprofè de l'inicial es recupera després de la preparació de la mostra. Les granes acaben totalment desintegrades i dissoltes en el medi el que ens garanteix l'alliberament complet de l'ibuprofè.

Per calcular l'exactitud del mètode s'han dut a terme sis determinacions independents fetes al 80%, 90%, 100%, 110% i 120% de la concentració esperada partint de pesos aproximats de granes placebo 0,050 g per totes les preparacions. Els resultats obtinguts es detallen a la següent taula.

**Taula 23:** Resultats estudi de l'exactitud

Determinació	Concentració teòrica (mg/ml)	Abs 1	Abs 2	Mitja	Concentració observada (mg/ml)	Recuperació (%)
1	0,408	0,262	0,261	0,262	0,399	97,72
2	0,443	0,291	0,298	0,295	0,448	98,83
3	0,498	0,318	0,325	0,322	0,488	97,95
4	0,554	0,362	0,365	0,364	0,550	99,31
5	0,614	0,403	0,400	0,402	0,607	98,80

Els resultats posen de manifest valors que corresponen a una recuperació mitja del 98,52%.

Considerant els valors obtinguts, s'han calculat els següents paràmetres:

% Recuperació mitja: 98,52 % (criteri d'acceptació: 100.0 ± 10%)

Desviació estàndard: 0,6221

Coefficient de variació: 0,672 % (criteri d'acceptació: ≤ 5%)

Coefficient de correlació lineal: 0,999 (criteri d'acceptació: ≥ 0.98)

La recuperació es mostra homogènia en el rang de concentracions estudiat, amb una variabilitat dintre els límits establerts i acceptables per aquest paràmetre, el que ens indica que és tracta d'un paràmetre independent de la concentració en aquest rang.

Es compleixen els requisits, per tant el mètode es considera exacte.

Cal tenir en compte que davant les dificultats de preparar granes que encapsulin una concentració exactament coneguda de lisinat d'ibuprofè i per tal de simular al màxim la realitat analítica, els valors de recuperació obtinguts s'han calculat preparant les mostres estàndard de lisinat d'ibuprofè conjuntament amb granes placebo. Per tant, no corresponen a la recuperació davant una mostra real amb l'ibuprofè encapsulat, que podria ser lleugerament inferior per les interaccions de l'ibuprofè amb la matriu, o altres dificultats d'extracció, el que pot donar un error no quantificable amb la mesura de recuperació.

#### 4.3.1.4. Precisió (Repetibilitat)

Indica la capacitat del mètode i del sistema instrumental per donar mesures reproduïbles sobre una mateixa mostra.

##### Precisió del sistema

S'han fet 6 lectures consecutives en la mateixa mostra i cubeta corregint a cada mesura amb blanc (zero).

**Taula 24:** Resultats de la precisió del sistema

Determinació	Concentració teòrica (mg/ml)	Abs
1	0,502	0,355
2		0,356
3		0,355
4		0,354
5		0,355
6		0,355
n =		6
mitja =		0,355
DE =		0,000577
CV%=		0,163

Criteri d'acceptació  $CV \leq 2 \%$

El sistema instrumental de mesura és precís, els resultats es troben dintre del criteri d'acceptació.

### Precisió del mètode

Es prepara una mostra amb placebo i patró i s'extreuen 6 alíquotes que es mesuren a l'espectrofotòmetre.

**Taula 25:** Resultats de la precisió del mètode

Determinació	Concentració teòrica (mg/ml)	Abs
1	0,554	0,362
2		0,365
3		0,357
4		0,364
5		0,368
6		0,358
n =		6
mitja =		0,362
DE =		0,00386
CV%=		1,065

Criteri d'acceptació  $CV \leq 2\%$

El mètode d'anàlisi és precís, els resultats es troben dintre del criteri d'acceptació.

### Precisió intermèdia

S'efectua la comparació de dades en la condició A i B. Cada condició correspon a un analista diferent i dies d'anàlisi diferents utilitzant el mateix espectrofotòmetre.

S'utilitzen 6 noves mostres corresponent al nivell del 100% (0,500 mg/ml).

**Taula 26:** Resultats de la precisió intermitja

Determinació	Concentració teòrica (mg/ml)	Abs		Concentració observada (mg/ml)		Recuperació (%)	
		Cond A	Cond B	Cond A	Cond B	Cond A	Cond B
1	0,554	0,362	0,333	0,548	0,538	98,91	97,09
2		0,365	0,338	0,552	0,546	99,71	98,57
3		0,357	0,341	0,541	0,551	97,57	99,45
4		0,364	0,332	0,551	0,536	99,45	97,38
5		0,368	0,336	0,557	0,543	100,52	97,97
6		0,358	0,345	0,542	0,561	97,84	100,63
n =		6	6	6	6	6	6
mitja =		0,362	0,369	0,548	0,546	99,00	98,51
DE =		0,00386	0,00515	0,00573	0,00678	1,034	1,329
CV%=		1,065	1,394	1,044	1,241	1,045	1,343

Condició A / Condició B x 100 = 99,63%.

Es compleixen els criteris de precisió intermèdia.

Entre els dos grups no hi ha diferències estadísticament significatives ( $p > 0,05$ ; ANOVA).

## 4.3.1.5. Resultats de validació

Taula 27: Resum dels paràmetres de validació del mètode espectrofotomètric

Paràmetre	Rang / Criteri	Resultat
Especificitat	No interfereix	Conforme
Linealitat	0,24 – 0,75 mg/ml R ≥ 0,995	$y = 0,6732 x - 0,0064$ R = 0,9994
Exactitud	Recuperació 100.0 ± 10%	97,72 a 80% 98,83 a 90% 97,95 a 100% 99,31 a 110% 98,80 a 120%  recup. mitja = 98,52%
	Coefficient de variació ≥ 5% R ≥ 0.98	CV = 0,672% R = 0,999
Precisió del sistema (repetibilitat)	Coefficient de variació ≤ 2%	CV = 0,163 %
Precisió del mètode	Coefficient de variació ≤ 2%	CV = 1,065 %
Precisió intermèdia	Diferència ≤ 1,5 %	Diferència 99,63%

Els resultats obtinguts demostren el compliment dels criteris d'acceptació del mètode i per tant, aquest es pot considerar fiable per a la determinació de lisinat d'ibuprofè a les matrius biopolimèriques basades en alginats.



#### 4.4. Caracterització de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè i optimització del mètode de preparació

##### 4.4.1. Fàrmac encapsulat i eficiència d'encapsulament

Per l'optimització del mètode d'obtenció de les granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè s'han realitzat una sèrie d'experiments sota un esquema de disseny d'experiments (DoE) d'acord amb els principis de qualitat per disseny (QbD).

S'ha dut a terme un tractament estadístic dels resultats obtinguts del disseny factorial plantejat  $3^3$  per tal d'esbrinar l'efecte de les 3 variables independents estudiades: concentració de polímer ( $X_1$ ), concentració  $\text{CaCl}_2$  en el bany ( $X_2$ ) i temps d'enduriment ( $X_3$ ) en la formació de granes de lisinat d'ibuprofè, mitjançant la mesura del fàrmac encapsulat i de l'eficiència d'encapsulament com a variables dependents. S'han escollit aquestes variables dependents per ser representatives de la bondat del mètode de preparació, en tant, no només indica l'aprofitament del fàrmac i que aquest queda retingut a les matrius, sinó també implícitament el rendiment del procés per formar les granes adequadament i sense pèrdues.

L'espai o domini experimental de cadascuna de les variables s'ha escollit en base als experiments preliminars amb aquesta finalitat. Concretament, les concentracions de l' 1, 2 i 3% p/v de polímers s'han seleccionat partint de l'experimentació prèvia i de la constatació de què quantitats superiors eren difícils de manipular i extrusionar degut a l'increment de viscositat (Sachi i col., 2012). Per altra banda, amb concentracions menors no s'aconseguiria formar estructures suficientment robustes i estables basant-nos en els resultats previs. Les concentracions de clorur de calci s'han fixat en 1, 2, i 4% en constatar que en els diferents experiments de tanteig permetien obtenir les granes d'una manera adequada.

Concentracions  $\text{CaCl}_2$  del 3% p/v també utilitzada en alguns experiments previs, es van desestimar perquè afegia complexitat al disseny, en tant elevava el nombre de factors i per tant d'experiments i probablement aportaria informació poc rellevant al disposar de la concentració de 4% p/v com a concentració superior vàlida. No es van incloure concentracions de  $\text{CaCl}_2$  superiors per tal d'evitar els possibles efectes negatius d'un excés d'ions divalents (Bourgeois i col., 2006).

A la taula 28 es mostra la codificació de variables estudiades i a la taula 29 es mostren els resultats d'eficiència d'encapsulament i quantitat de fàrmac encapsulada obtinguts a partir del disseny experimental i en cadascuna de les preparacions.

**Taula 28:** Variables codificades. Descripció i valors

		Valor dels nivells			
		Baix -1	Mig 0	Alt 1	
Variables Independents		Unitats			
$X_1$	Concentració de polímer	%	1	2	3
$X_2$	Concentració de $\text{CaCl}_2$	%	1	2	4
$X_3$	Temps d'enduriment	min	30	60	120
Variables Dependents		Unitats			
$Y_1$	Quantitat de fàrmac encapsulat	mg/g			
$Y_2$	Eficiència d'encapsulament	%			

Taula 29: Matriu experimental i respostes observades

Preparació	Codificació del nivell de variable			Resposta observada	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	-1	-1	-1	0	0
2	-1	-1	0	0	0
3	-1	-1	1	0	0
4	-1	0	-1	0	0
5	-1	0	0	0	0
6	-1	0	1	0	0
7	-1	1	-1	949	81,12
8	-1	1	0	966	83,29
9	-1	1	1	927	84,38
10	0	-1	-1	644	73,12
11	0	-1	0	663	75,94
12	0	-1	1	652	72,52
13	0	0	-1	883	79,48
14	0	0	0	878	78,10
15	0	0	1	863	78,83
16	0	1	-1	848	80,35
17	0	1	0	840	83,62
18	0	1	1	853	81,17
19	1	-1	-1	635	67,12
20	1	-1	0	624	68,33
21	1	-1	1	648	68,01
22	1	0	-1	837	74,21
23	1	0	0	887	77,52
24	1	0	1	868	73,30
25	1	1	-1	809	73,25
26	1	1	0	847	78,30
27	1	1	1	826	71,40

Quan les granes no es formen es considera la resposta 0

#### 4.4.2. Resultats estadístics

L'avaluació de les respostes es fa sota un model que inclou termes polinomials interactius representat per la següent equació:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_{11} X_1^2 + b_{11} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{22} X_2^2 + b_{23} X_2 X_3 + b_{33} X_3^2$$

El model resultant s'ha ajustat als resultats obtinguts per les variables dependents i permet fer prediccions en funció de les interaccions existents per les diferents variables independents.

A la taula 30 es poden observar les interaccions entre variables així com la seva significació estadística.

Taula 30: Interacció entre variables

Variable	Fàrmac encapsulat (Y <sub>1</sub> )		Eficiència d'encapsulament (Y <sub>2</sub> )	
	F ratio	Valor p	F ratio	Valor p
X <sub>1</sub>	25,80	0,0001	38,51	0,0000
X <sub>2</sub>	24,09	0,0001	20,23	0,0003
X <sub>3</sub>	0,00	0,9691	0,00	0,9884
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	9,83	0,0060	20,28	0,0003
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	11,61	0,0005	18,74	0,0005
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0,01	0,0034	0,01	0,9240
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0,02	0,9022	3,80	0,0680
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0,00	0,9752	0,00	0,9712
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0,01	0,9066	0,08	0,7797

L'anàlisi dels resultats obtinguts del disseny experimental utilitzat porta a les següents equacions que configurarien el model d'encapsulament i de càrrega de fàrmac en funció dels paràmetres avaluats.

#### 4.4.2.1. Càrrega de fàrmac

$$Y_1 = 749,7 + 229,9X_1 + 222,2 X_2 + 1,780X_3 - 245,8X_1^2 - 188,9X_1 X_2 + 6,91X_1X_3 + 72,17X_2^2 - 1,750X_2X_3 - 9,333 X_3^2$$

#### 4.4.2.2. Eficiència d'encapsulament

$$Y_2 = 71,20 + 22,37X_1 + 16,21X_2 + 0,053X_3 - 28,11X_1^2 - 19,11X_1X_2 - 0,428X_1X_3 + 12,17X_2^2 + 0,162X_2X_3 - 1,774 X_3^2$$

Es pot observar com, tant la quantitat total de fàrmac encapsulat, com l'eficiència d'encapsulament depenen de la concentració de polímer i de la concentració d'agent de gelificació ( $P < 0,05$ ). La influència de la concentració de polímer sobre l'eficiència d'encapsulament ha estat descrita per altres autors (Arica i col., 2005).

Aquestes interaccions entre variables ja s'havien intuït inicialment en els experiments preliminars quan proves fetes amb concentracions molt baixes de clorur de calci impedièen la formació de les granes i s'intuïa la independència del temps d'enduriment.

Els resultats de fàrmac encapsulat mostren la concentració real de lisinat d'ibuprofè contingut a les granes seques. Els resultats d'eficiència d'encapsulament, es refereixen a l'aprofitament del procés per encapsular el fàrmac, en tant, el que es mesura és la quantitat relativa de fàrmac perdut durant el procés de formació de les granes, per tant, l'eficiència d'encapsulament s'ha calculat de manera indirecta (Fernández-Hervás i col., 1998) i no a partir dels valors de fàrmac encapsulat per evitar resultats que no responguin a l'aprofitament real del fàrmac.

En efecte, l'eficiència d'encapsulament es determina per diferència, mesurant la concentració en mg/ml de lisinat d'ibuprofè al bany multiplicada per la quantitat total de líquid recuperada.



D'aquesta manera, es determina la quantitat d'ibuprofè que no s'ha encapsulat i per tant, per diferència, la que ha quedat incorporada a les granes. No obstant, l'eficiència d'encapsulament ens dona un resultat en relació amb la quantitat inicial utilitzada per obtenir les granes.

Cal remarcar que l'aprofitament de la solució de polímer amb lisinat d'ibuprofè no és absoluta, es tracta d'una solució viscosa, inclús amb viscositats diferents depenent de la concentració d'alginat de la que en queden restes importants tant en el recipient de preparació i barreja com en el dispositiu de degoteig. Per controlar de manera adequada aquestes quantitats i evitar que aquestes pèrdues computin al càlcul de la eficiència d'encapsulament, amb cada experiment es duu un recompte acurat de la quantitat invertida en l'obtenció de les granes, és a dir, la quantitat de polímer medicat que realment és extruïda al bany. Aquesta quantitat s'obté pesant el dispositiu d'extrusió ple i un cop buidat.

En aquest punt, també es subratlla la diferència entre l'eficiència d'encapsulament i la quantitat de fàrmac present a les granes i el motiu pel qual es van seleccionar aquests dos paràmetres que poden donar resultats coincidents en el sentit d'experimentalment equivalents o no fer-ho.

A efectes de rendiment del procés, interessa disposar d'eficiències d'encapsulament elevades, això vol dir que hi ha un aprofitament del principi actiu, no obstant, des d'un punt de vista d'aplicació i d'utilitat de les granes, no interessa tant disposar d'una elevada eficiència d'encapsulament com d'una concentració molt elevada de fàrmac a l'interior de les granes. L'ibuprofè s'utilitza a dosis elevades, les més comuns per via oral són 200 - 600 mg per dosi (Irvine i col., 2018), el que significa la necessitat de matrius altament concentrades per tal de que es puguin utilitzar en una forma farmacèutica convencional.

Tot i que és d'esperar que eficiències d'encapsulament elevades resultin en matrius més concentrades, l'eficiència d'encapsulament no necessàriament ha d'anar lligada a la concentració final de fàrmac present a les granes. Poden existir eficiències d'encapsulament altes, és a dir, amb un percentatge d'aprofitament del fàrmac elevat però amb proporcions de polímer també altes i per tant amb un resultat de granes amb quantitats de fàrmac inferiors en relació al seu pes total. Per contra, poden existir eficiències d'encapsulament baixes, i disposar de concentracions de fàrmac elevades a les granes obtingudes. En aquest cas es perdria tant ibuprofè com polímer que quedaria al medi de gelificació sense possibilitat de formar granes.

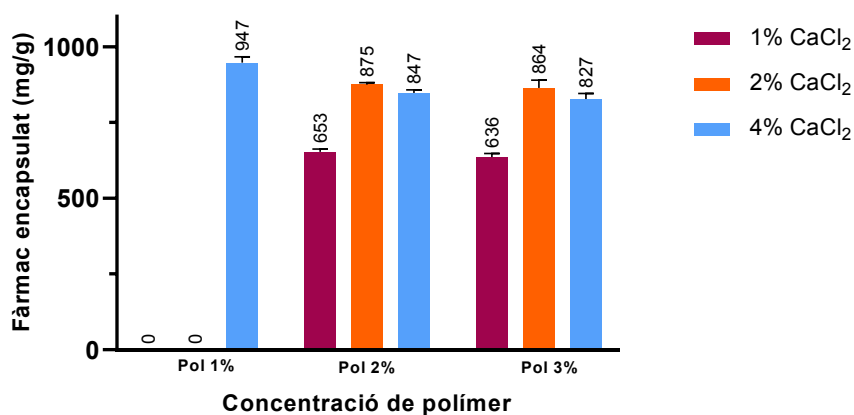
De fet, en els resultats s'observa com eficiències d'encapsulament similars donen càrregues de fàrmac diferents, el que ens indica que davant d'un determinat nivell d'aprofitament del fàrmac, la concentració assolida d'aquest en relació al pes de les granes no és la mateixa.

A partir dels resultats obtinguts es posa de manifest que la concentració de polímer i la concentració de  $\text{CaCl}_2$  en el bany gelificant afecten significativament ( $p < 0,05$ ) tant l'eficiència d'encapsulament com la quantitat de lisinat d'ibuprofè encapsulat a les granes. Aquests resultats no coincideixen del tot amb alguns estudis publicats, a on si bé, s'atribueix a la concentració de polímer un paper rellevant per l'eficiència d'encapsulament, també suggereixen que el temps de coagulació influeix en aquest paràmetre i no així per la concentració de gelificant (Sevgi i col., 2008).

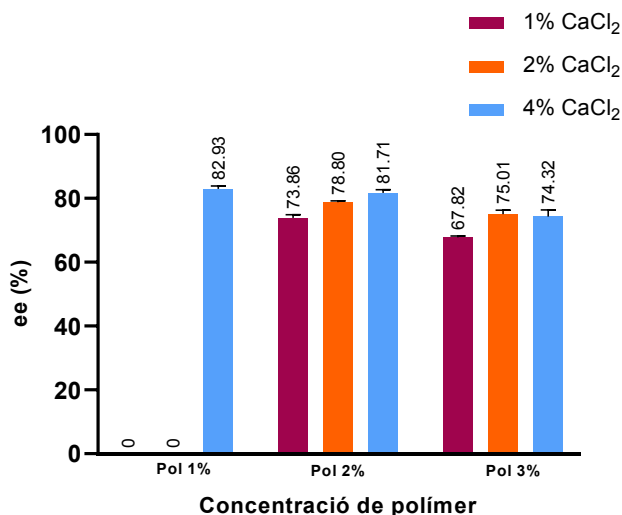
No obstant, en aquests treballs publicats, es posa de relleu la utilització de concentracions diferents de clorur de calci i l'encapsulament d'un fàrmac insoluble en aigua a proporcions molt inferiors de principi actiu en relació amb el polímer que les utilitzades en el present treball. Tanmateix, els autors exposen la manca d'idoneïtat del mètode de gelificació iotròpica per fàrmacs solubles en aigua degut a la pèrdua ràpida de la fase externa, aspecte

que contrasta amb els resultats obtinguts en el present treball on s'han obtingut bones eficiències d'encapsulament pel lisinat d'ibuprofè amb el mètode ionotròpic. Un altre aspecte remarcable de l'estudi de Sevgi i col. (2008), és la utilització de temps d'enduriment extraordinàriament llargs de 3h i 12h, atribuint-los significació en l'eficiència d'encapsulament. Val a dir que aquests temps són genuïns per aquest tipus de preparació i que altres autors han reportat com a element no rellevant per l'encapsulament, coincidint amb els resultats obtinguts en el present treball.

**Figura 31** Quantitat de fàrmac encapsulat en funció de les concentracions de polímer i de la concentració de clorur de calci



**Figura 32:** Eficiència d'encapsulament en funció de les concentracions de polímer i de la concentració de clorur de calci



#### 4.4.3. Efecte del pH

Quan la concentració de  $\text{CaCl}_2$  és del 4%, s'obtenen granes a qualsevol dels pHs assajats (pH= 2, 4, 6, 8 o 10).

No obstant, les granes òptimes s'obtenen utilitzant una concentració del 2% de polímer que conté 17% de lisinat d'ibuprofè (p/p) que s'extrusiona en un bany gelificant que conté  $\text{CaCl}_2$  4% p/v a pH=2.

En aquestes condicions s'obtenen granes homogènies, formades instantàniament, esfèriques i que presenten les proporcions més elevades de fàrmac encapsulat i també valors més elevats d'eficiència d'encapsulament (taula 31). Aquest millor comportament en condicions àcides (pH=2) s'atribueix a les propietats fisicoquímiques del lisinat d'ibuprofè i de l'alginat basades en la seva baixa solubilitat a aquest valor de pH.

Els resultats de fàrmac encapsulat i eficiències d'encapsulament es mostren a continuació:

**Taula 31:** Resultats de fàrmac encapsulat i eficiència d'encapsulament

Polímer (%)	$\text{CaCl}_2$ (%)	pH	Temps d'enduriment (min)	Q (mg/g)	EE (%)
2	4	2	60	940	95,35
2	4	4	60	852	79,35
2	4	6	60	778	80,33
2	4	8	60	824	81,14
2	4	10	60	853	81,09

Es constata que valors de pH baixos, al voltant de 2 produeixen granes petites i homogènies. No obstant, aquestes granes es van desfent amb el pas del temps i no es mantenen estables a llarg termini.

L'alginat és insoluble en medi àcid, es forma àcid alginic i les cavitats electronegatives propiciades pels grups carboxílics ionitzats al estar protonades queden bloquejades impeding la interacció electrostàtica amb els ions de calci, en aquest cas, el que succeeix és que hi ha una coagulació pel medi àcid que causa la insolubilitat de l'alginat convertit a àcid alginic però no hi ha l'entrecruament de cadenes produïda pel catió divalent, o si més no, hi ha una competència en el moment de formar-se la grana entre el calci del medi i els protons.

El resultat observat, és una ràpida coagulació per la suma dels dos fenòmens que atrapa de manera eficient el lisinat d'ibuprofè, no obstant, l'estructura resultant tindrà en realitat menys entrecruaments que quan fem la coagulació en un medi neutre o més alcalí a on hi haurà més grups electronegatius lliures per interaccionar amb els ions de calci (Bu i cols., 2005).

Els resultats a curt termini de realitzar el procés a pH àcid és l'obtenció de granes esfèriques i petites aparentment consistents, de ràpida i fàcil formació amb una elevada eficiència d'encapsulament. Probablement tingui influència la baixa solubilitat de l'ibuprofè en aquestes condicions àcides fet que fa que precipiti a l'interior de la matriu i quedi retingut amb més facilitat al no poder ser dissolt i en certa forma alliberat al medi de coagulació.

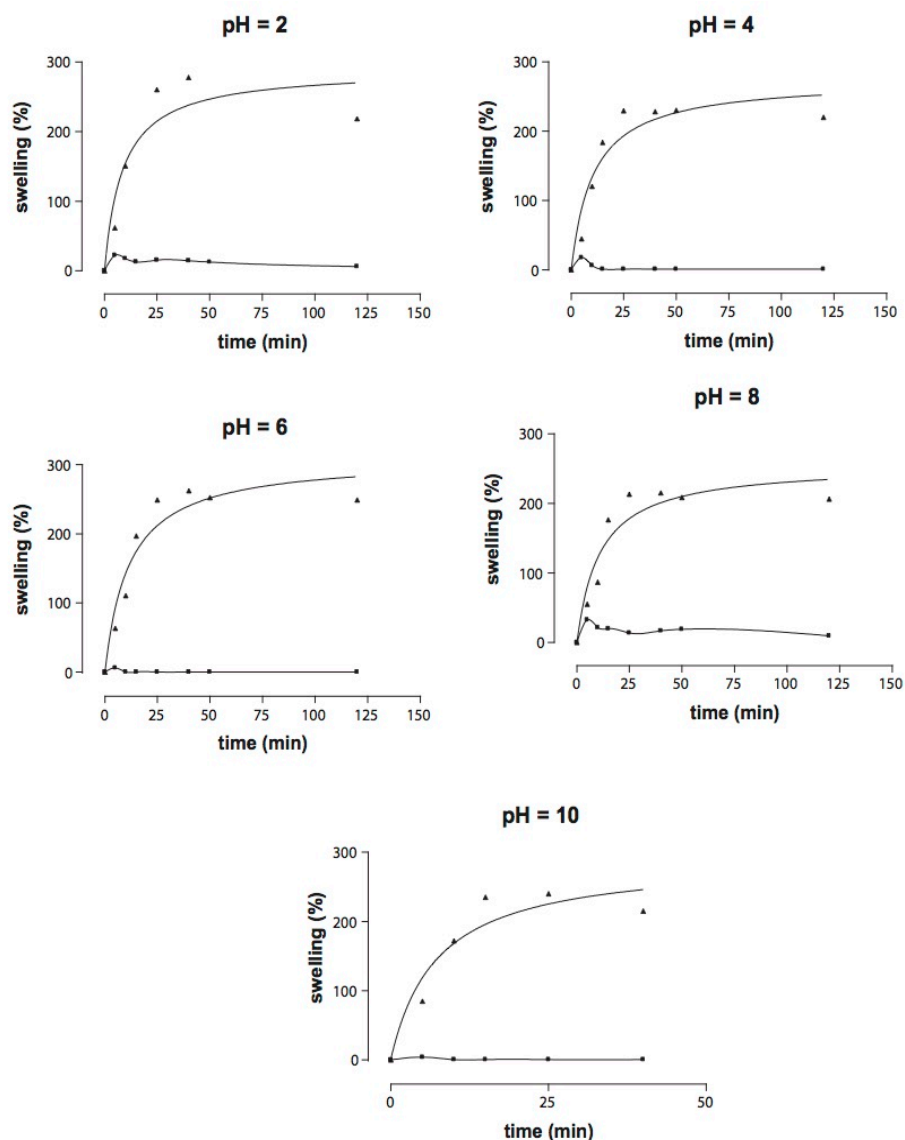
Altres treballs fets amb granes d'alginat obtingudes a diferents pHs (Chuang i col., 2016) demostren granes de diferent forma en funció dels pHs de les solucions de gelificació, no obstant, aquest efecte no ha pogut ser verificat amb les granes de lisinat d'ibuprofè, el motiu pot ser que Chuang i cols., 2017 van incorporar baixes concentracions de blau de Commassie (0,05%) , i per tant, a efectes pràctics es tractaria de granes placebo mentre que les granes de lisinat d'ibuprofè obtingudes contenen un 17% de fàrmac dissolt a la solució de polímer.

#### 4.4.4. Característiques d'inflament de les granes

El comportament d'inflament dels polímers d'alginat és un dels factors més determinants en l'alliberament del fàrmac (Bajpai i Kirar, 2016). L'inflament, permet el trànsit d'aigua a l'interior i la dissolució i alliberament del fàrmac. El grau d'inflament es mesura com a captació d'aigua mitjançant les variacions de pes. L'inflament de les granes s'hauria de correlacionar amb el perfil d'alliberament, que en el cas de l'alginat depenen del pH extern, no obstant, altres mecanismes com l'erosió o dissolució del polímer en el medi poden contribuir també a l'alliberament a banda de l'inflament i no sempre es pot atribuir l'alliberament a fenòmens d'inflament o captació d'aigua, si més no, d'una manera exclusiva (Peppas i col., 2000).

La figura 33 mostra els perfils d'inflament obtinguts després de sotmetre les granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè a pH=1,2 i a pH=7,4 respectivament.

**Figura 33:** Resultats d'inflament de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè obtingudes a diferents pHs



L'inflament es determina per la capacitat del polímer de captar aigua i per tant, com a variació relativa del pes de la grana en funció de la quantitat d'aigua captada (Darrabie i col, 2006).

En els perfils d'inflament de la figura 33 es pot observar com a pH 1,2 no hi ha pràcticament inflament i com en canvi a pH =7,4 l'inflament és molt evident amb valors de l'ordre de 250 %. En les granes d'alginat, s'observa a pH = 7,4 i a partir de 60 minuts una davallada en el grau d'inflament. Aquesta davallada no es real per una pèrdua d'aigua motivada per la contracció del polímer, en tant el que es produeix, d'una banda és una erosió de la grana degut a la seva fragilitat quan està inflada i per altra banda, la dissolució progressiva de part del polímer a aquest pH. Les granes s'acaben desintegrant completament i dissolent-se en el medi. Les granes produïdes a pH 10 es desintegren de manera molt més ràpida i no es van poder obtenir dades a partir dels 60 minuts ja que no era viable la seva manipulació per fer les determinacions sense que es desintegressin i que es veiés afectat el propi procés de mesura.

Tal i com s'esperava, la captació d'aigua és molt superior a valors de pH de 7,4 mentre que a pH àcid és nul·la. Aquests resultats són consistents amb els obtinguts en altres treballs a on es determina el comportament del polímer en funció del pH (Hwang i col. 1995; Fernández-Hervás, 1998) i suggereixen que el fàrmac quedarà retingut a l'interior de les granes durant el trànsit gàstric alliberant-se quan arribin al duodè.

En aquest cas, s'ha d'esperar absència d'alliberament de fàrmac a pH gàstric (pH = 1,2), d'una banda pel fet que no només no hi ha inflament, sinó que aparentment hi ha una contracció de les granes, el que impediria l'entrada d'aigua i per tant la dissolució del fàrmac.

Es demostra que les granes d'alginat que contenen lisinat d'ibuprofè són del tipus que responen al pH del medi i per tant, es pot modular l'alliberament en funció d'aquest el que obre una finestra d'oportunitats per a l'obtenció de formes d'alliberament controlades per pH i específiques de lloc. De fet, l'alginat es considerat com un polímer intel·ligent "*smart polimer*" per aquestes propietats (Bajpai, 2008).

Els efectes observats, és a dir que l'inflament a pH 7,4 assoleixi un màxim de manera relativament ràpida i després decaigui sobtadament fins el punt de la desintegració de l'estructura pot obeir a fenòmens de bescanvi iònic entre el sodi (present en la solució reguladora de fosfats) i el calci unit als grups carboxílics de l'alginat. Els ions monovalents ( $\text{Na}^+$ ) reemplacen els divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ) causant un trencament de l'estructura en forma de "capsa d'ous" i un increment de la distància entre les cadenes polimèriques afavorint l'absorció del medi fluid i per tant l'inflament del sistema fins que la pressió osmòtica dintre de les granes equilibra la força dels enllaços d'entrecruament que preserven l'estructura de les granes. A partir d'aquí, les granes comencen a desintegrar-se i el seu pes disminueix (Segale i col., 2016).

Aquesta explicació, contrasta també amb el que succeeix quan es realitzen determinacions de fàrmac encapsulat, en aquest cas, el que es produeix és la ràpida i completa desintegració de les matrius. Per aconseguir-ho, s'utilitza una solució reguladora de fosfats de pH = 8 però d'elevada força iònica propiciada per una concentració salina superior a la d'altres solucions reguladores de fosfats. S'explicaria la ràpida desintegració per l'elevada concentració d'ions  $\text{Na}^+$  que desplaçarien l'equilibri de manera més ràpida i eficient en aquest cas per la finalitat perseguida que és determinar el contingut de fàrmac a l'interior de les granes.

Quan en comptes de solució reguladora de fosfats amb presència d'ions  $\text{Na}^+$  s'utilitza aigua, s'observa que no es produeix la desintegració de les granes i aquestes romanen en el medi durant llarg temps inflades però sense perdre la seva estructura malgrat trobar-se a pH neutre,

el que confirmaria aquesta hipòtesi dels mecanismes de transformació de l'estructura de les matrius d'alginat en funció dels ions presents al medi de dissolució.

#### 4.4.5. Alliberament del Lisinat d'Ibuprofè

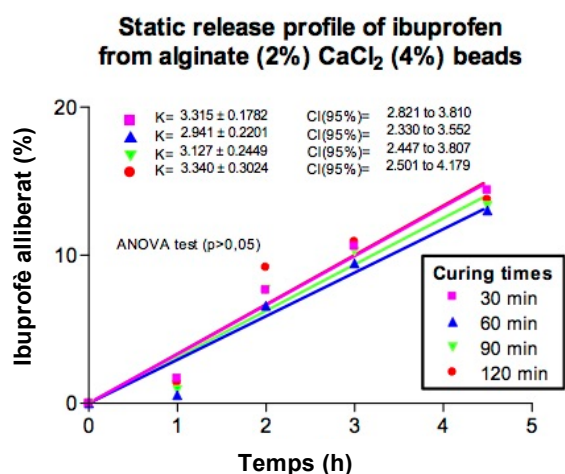
Els experiments d'alliberament del fàrmac s'han dut a terme en condicions estàtiques i dinàmiques, és a dir sense i amb agitació respectivament. Sense agitació és determina la difusió passiva del fàrmac cap a l'exterior a partir de que aquest s'infla.

##### 4.4.5.1. Alliberament estàtic

Aquest assaig es realitza per tal de comprovar l'habilitat de les matrius d'alginat per retenir el fàrmac encapsulat i també verificar les pèrdues de lisinat d'ibuprofè per difusió passiva degut als diferents temps d'enduriment.

Quan les granes es posen amb aigua destil·lada sense agitació i durant un temps de 5 h s'obté un perfil d'alliberament d'ordre 0 amb un alliberament del 12% (p/p) de lisinat d'ibuprofè sense haver-hi influència del temps d'enduriment (ANOVA  $p > 0,05$ ), el que demostra que les matrius d'alginat són capaces de retenir el lisinat d'ibuprofè, el qual s'allibera lentament al medi per difusió passiva.

**Figura 34:** Perfil d'alliberament estàtic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat (2%) i  $\text{CaCl}_2$  (4%)

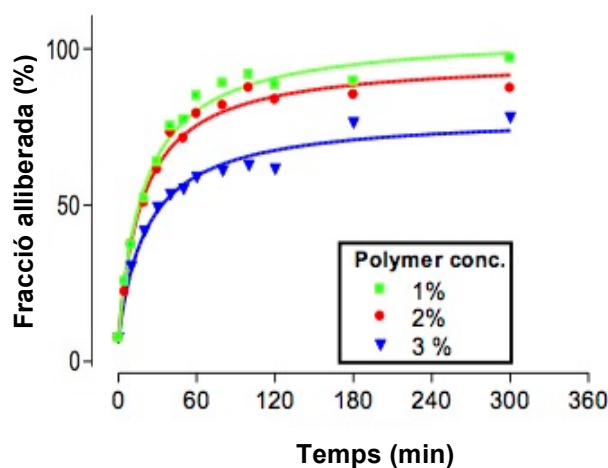


Els resultats de la figura 34 mostren com en situació estàtica, sense agitació es produeix un alliberament de lisinat d'ibuprofè durant 5 h que és independent del temps d'enduriment. Entre els valors de les constants trobades a les diferents rectes no s'observen diferències estadísticament significatives (ANOVA  $p > 0,05$ ).

#### 4.4.5.2. Alliberaments dinàmics

Quan els alliberaments es fan utilitzant un aparell de dissolució, és a dir amb agitació i temperatura controlada, s'observen els següents perfils d'alliberament. Aquests resultats s'obtenen d'experiments d'alliberament a pH neutre i sense gradients de pH mentre s'executa l'experiment.

**Figura 35:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat obtingudes amb diferents concentracions de polímer

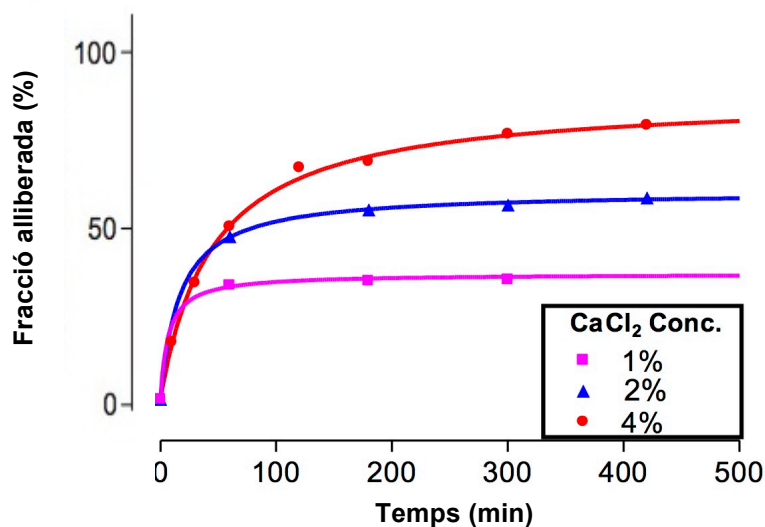


Respecte la influència de les concentracions de polímer a l'alliberament, a la figura 35 es pot observar com a mesura que s'incrementa aquesta, la retenció és superior i l'alliberament és més lent. A partir dels perfils obtinguts, podria semblar que a mesura que s'incrementa la concentració de polímer, la quantitat de fàrmac total alliberada és menor. Aquests experiments s'han fet amb una durada de 5 h i no es van allargar més enllà, en tant l'objectiu era observar la capacitat de les matrius d'alginat per retenir i alliberar de manera efectiva el lissinat d'ibuprofè.

El resultat d'encapsulament, posen de manifest que quan s'incrementa la concentració de polímer es redueix la concentració de fàrmac present. Aquest fet es pot explicar d'una banda, pel fet de què al tenir una relació superior de polímer respecte el fàrmac, la concentració percentual d'aquest a les granes és inferior, i per altra banda, hi ha una eficiència d'encapsulament inferior en tant a mesura que es disposa de solucions amb més viscositat, la formació de les granes es veu més dificultada i algunes no s'arriben a formar alliberant fàrmac directament al medi de gelificació.

Del tractament gràfic s'observa com l'encapsulament es veu afectat per la concentració de polímer. Amb una diferència més acusada per les concentracions del 3% i amb poca diferència a les concentracions de 1 i 2%, respectivament.

Figura 36: Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat obtingudes amb diferents concentracions de  $\text{CaCl}_2$



La figura 36 permet observar l'impacte directe de la concentració de clorur de calci en l'encapsulament. Respecte les granes del 4%, la reducció de l'agent gelant mostra una reducció de les concentracions màximes assolides d'ibuprofè. Aquest fet pot ser degut a que la gelificació i formació de la grana succeeix de manera més lenta. Tot i que la formació de la grana és instantània quan aquesta es submergeix en el bany, si que s'observa com a les granes formades amb concentracions de clorur de calci més baixes, l'aspecte va variant d'opalescent a un blanc més intens de manera més progressiva, mentre que a elevades concentracions de calci això succeeix de manera més immediata.

L'atrapament del lisinat d'ibuprofè és superior quan més ràpida és la formació de l'hidrogel, en tant aquest, que ja es troba dissolt amb el polímer, no té temps de migrar cap a l'exterior del bany, mentre que quan la formació és més lenta, hi ha un temps per l'intercanvi entre el polímer no gelificat i el bany, de fet, alguns autors postulen dificultats d'encapsular fàrmacs solubles per aquest motiu (Sevgi i col., 2008).

Aquest fenomen es pot relacionar directament amb la concentració d'ibuprofè que posteriorment es troba al bany. És justament aquesta concentració la que utilitzem per a calcular l'eficiència d'encapsulament i en aquest sentit, aquesta afirmació no aporta cap novetat o informació addicional, doncs la quantitat d'ibuprofè al bany i l'eficiència d'encapsulament s'obtenen a partir de la mateixa determinació, no obstant, si que es constata gràficament com la quantitat de fàrmac alliberada és inversament proporcional a la quantitat d'ibuprofè que es troba al medi, el que ens indica una menor quantitat encapsulada per unitat de massa. Visualment, es corrobora l'alliberament de la totalitat o de la pràctica totalitat del fàrmac de les granes perquè a mesura que es va alliberant l'ibuprofè aquestes van perdent la coloració blanca fins a quedar totalment transparents, indicant que la presència de fàrmac al seu interior és a la pràctica nul·la. Fet constatat experimentalment determinant l'ibuprofè residual a les granes. La quantitat d'ibuprofè retingut a les granes un cop finalitzades les cinètiques d'alliberament és indetectable respecte el blanc.

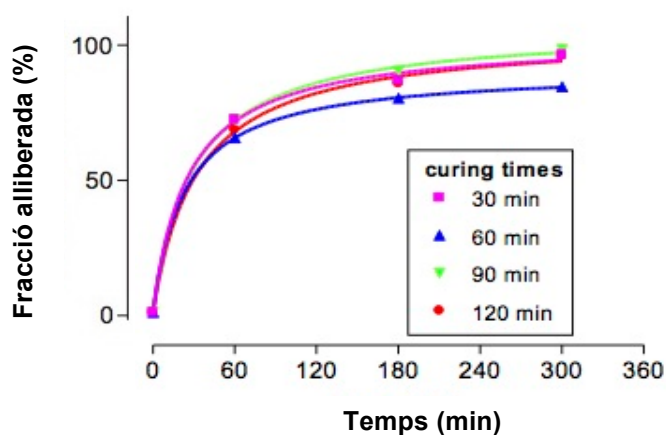
La concentració de calci influeix en la composició de les granes i per tant, també en el comportament d'inflament i d'alliberament. A mesura que s'incrementa la concentració de calci, les interaccions entre calci i alginat són més fortes i l'alliberament es veu afectat en



funció de la concentració de calci (Segvi i col., 2008), no obstant, Takka i col., 1998, van estudiar l'efecte de la concentració de calci en la producció de granes de Nicardipí, arribant a la conclusió que aquesta no influïa en l'alliberament a partir d'un estudi de disseny factorial en el que s'assajaven diferents concentracions de calci. En aquest estudi, els temps d'enduriment van ser de 12 hores, el que pot promoure la saturació dels llocs de les cavitats electronegatives pels llargs temps d'exposició al calci del medi perdent rellevància l'efecte de la concentració inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  en el medi de gelificació de les granes.

També influeix l'estructura molecular de l'alginat en relació amb el catió utilitzat. En aquest sentit, les granes riques en àcid manurònic s'inflen més que les que ho són en àcid gularònic, aquest fenomen es veu també influenciat pel tipus d'ió utilitzat, essent més prominent pels ions  $\text{Ca}^{2+}$  respecte altres ions divalents com el  $\text{Ba}^{2+}$  també utilitzats en la formació de granes d'alginat (Darrabie i col., 2006).

**Figura 37:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat i  $\text{CaCl}_2$  sotmeses a diferents temps d'enduriment

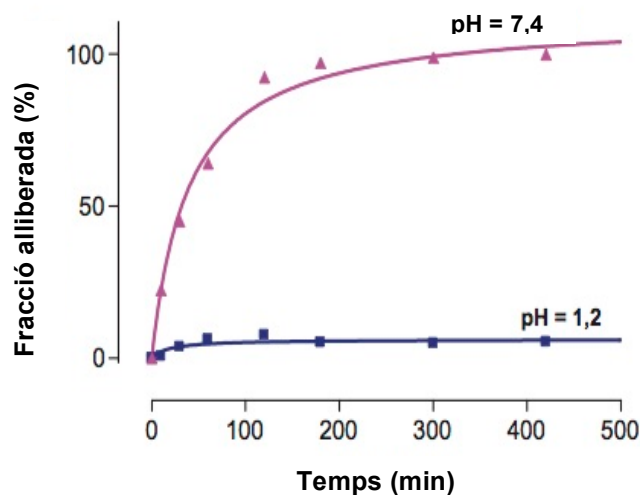


S'observa (Figura 37), com el temps d'enduriment no influeix de manera significativa en els perfils d'alliberament i en la quantitat de fàrmac encapsulada. De fet, es constata com un cop formada la grana aquesta ja no varia en aspecte. Tot i això, per motius operatius, d'organització experimental i per una major fiabilitat es va decidir que l'enduriment fos en períodes d'una hora. També, una part de la bibliografia consultada coincidia amb aquest temps, el que permet fer comparatives experimentals amb treballs d'altres autors (Joshi i col., 2012).

#### 4.4.5.3. Influència del pH en l'alliberament del lisinat d'ibuprofè

Quan es determina experimentalment l'alliberament a pH gàstric i intestinal, s'observa com es correlaciona amb les dades observades d'inflament. A pH gàstric, el lisinat d'ibuprofè queda totalment retingut, mentre que a pH intestinal s'allibera. Aquest perfils d'alliberament s'han fet en paral·lel però en cubetes separades i per tant, amb granes diferents de manera similar a com s'han realitzat els experiments d'inflament.

**Figura 38:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè a partir de granes d'alginat (2%) i CaCl<sub>2</sub> (4%) a pH gàstric i pH intestinal



En aquest cas, es pot observar a la figura 38 com a pH àcid l'alliberament de l'ibuprofè és nul. Aquest resultat era esperable d'una banda per la contracció de les granes i en conseqüència manca d'adquisició d'aigua i impossibilitat de dissoldre el fàrmac. Per altra banda l'ibuprofè té un pKa de 4,9 (Bjarnason i col., 2018), per tant, en medi gàstric ens trobem clarament en una situació de predomini de la forma no ionitzada i per tant insoluble. Si bé les formes no ionitzades poden travessar barreres biològiques i en alguns casos com l'aspirina o el mateix ibuprofè absorbir-se a través de la mucosa gàstrica, en aquest cas la manca d'ionització suposa la impossibilitat de solubilització del l'ibuprofè i en aquest sentit manca d'alliberament de l'estructura d'alginat càlcic que el reté.

El perfil d'alliberament a pH de 7,4 simulant condicions intestinals coincideix amb el que s'observa a les gràfiques anteriors. Tanmateix si ens fixem en la gràfica d'alliberament (Figura 38) es pot observar el mateix perfil que l'obtingut a les gràfiques d'inflament (Figura 33) el que permet correlacionar una cosa amb l'altra i concloure que el mecanisme més important d'atrapament del fàrmac en aquestes condicions, malgrat situar-se per sota de pKa de l'ibuprofè és la contracció del polímer i manca d'inflament, el que impedeix l'absorció d'aigua i alliberament del l'ibuprofè o difusió al medi (Hwang i col., 1998).

No obstant, aquests perfils posen de manifest una funció d'alliberament molt similar, inicialment comandada per l'inflament i a partir de les dues hores per la pròpia erosió i destrucció de l'estructura tal i com s'observa en els estudis d'inflament (Figura 33).

Degut a què a pHs neutres les granes s'inflen significativament al mateix temps que s'erosionen, llavors es poden esperar cinètiques d'ordre zero o de primer ordre degut als dos fenòmens implicats, d'una banda a la difusió i per l'altra a l'inflament (Hwang i col., 1995; Peppas i col., 2000). De fet, quan l'alliberament és estàtic, s'observa com el fàrmac difon passivament al medi i en una cinètica d'ordre zero, mentre que en condicions dinàmiques el comportament cinètic ja és d'ordre 1 (figura 37).

#### 4.4.5.4. Alliberament amb canvi de pH

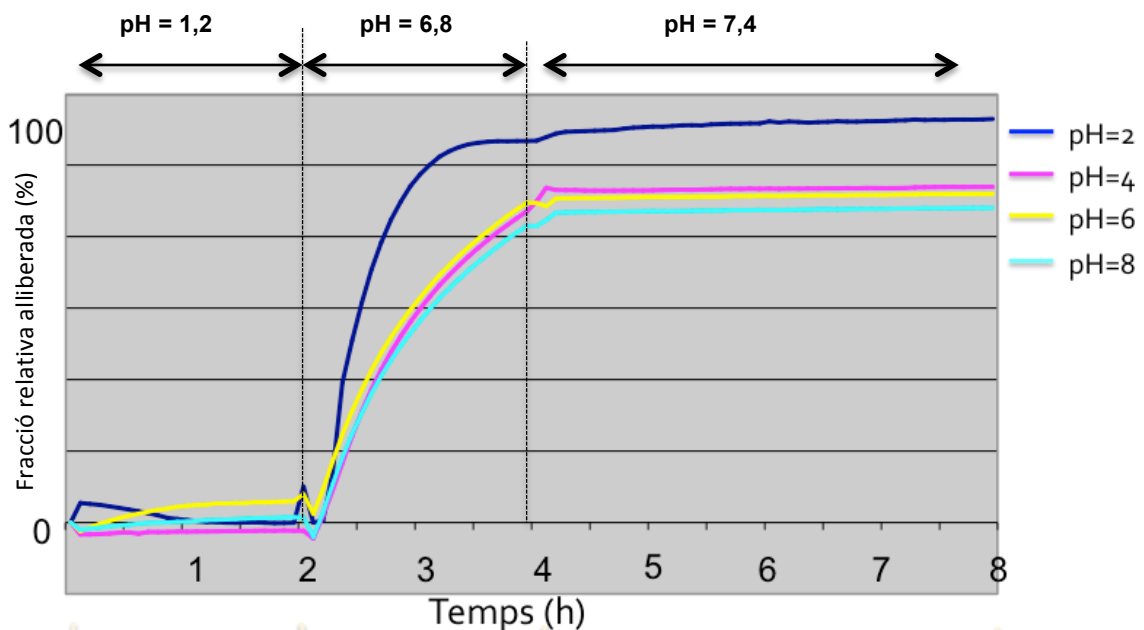
S'avalua l'alliberament amb canvis de fluid de dissolució a la mateixa cubeta i amb les mateixes granes. Aquesta determinació permet simular el que succeirà en condicions fisiològiques d'administració on les granes passaran primer un temps a pH gàstric (pH= 1,2) i posteriorment a pHs intestinals superiors (pH= 6,8 i pH= 7,4), el que permet valorar la influència que té en el polímer i en l'alliberament de principi actiu el fet d'haver estat primer a pH àcid per passar a pHs després més neutres. Hipotèticament, l'estructura polimèrica o inclús el principi actiu, es podrien veure afectats de manera irreversible pel fet d'haver estat en condicions àcides, per exemple l'ibuprofè precipita en medi àcid.

No obstant, el que s'observa és que el pas per medi àcid no afecta d'una manera evident l'estructura o propietats de les granes i que l'alliberament es produeix d'acord amb el que s'observa quan es fan les determinacions a pHs individuals sense haver sotmès les granes prèviament a pH àcid. Aquest comportament era l'esperable perquè es disposa de matrius formades només per alginat i per tant, amb un comportament homogeni. Aquest comportament podria no ser homogeni en el cas d'incloure polímers amb signe iònic o valors de pKa diferents el que podria suposar que a pH gàstric l'estructura es comencés a afectar.

El següent gràfic (figura 39), s'ha obtingut per mesurament en continu del contingut de les cubetes de dissolució, utilitzant granes obtingudes a diferents pH del medi de gelificació. S'observa com durant les 2 hores que les granes es troben en el medi a pH gàstric, l'alliberament d'ibuprofè és nul i aquest es comença a fer evident a partir que es fa el canvi a pH=6,8.

Es pot observar també a la figura 39 la fracció alliberada en funció del pH del medi. Les mesures s'han fet amb granes optimitzades pel que fa a concentració de polímer (2% p/v) i de clorur càlcic (4% p/v) i obtingudes a diferents pHs (2, 4, 6 i 8) del bany de gelificació. L'alliberament s'expressa com a percentatge de fàrmac alliberat relatiu a les granes amb més concentració de fàrmac, és a dir, que és considera el 100% les absorbàncies màximes, en aquest cas les procedents de les granes obtingudes a pH=2.

**Figura 39:** Perfil d'alliberament dinàmic d'ibuprofè amb canvi de pH a partir de granes d'alginat (2%) i CaCl<sub>2</sub> (4%) obtingudes a diferents pHs del medi de gelificació



Taula 32: Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps

Composició de les granes i pH d'obtenció	Temps d'alliberament de la fracció de fàrmac (min)			
	t <sub>25%</sub>	t <sub>50%</sub>	t <sub>75%</sub>	t <sub>90%</sub>
Alg 2% (pH = 2)	133	138	160	185
Alg 2% (pH = 4)	139	149	193	225
Alg 2% (pH = 6)	134	154	185	215
Alg 2% (pH = 8)	137	159	191	220

Les propietats mecàniques dels hidrogels d'alginat entrecreuat amb ions de calci depenen de la naturalesa de l'alginat, de la ratio manurònic / gulurònic, però especialment de la longitud dels blocs G (Smidsrød i col., 1972). No obstant, els ions calci poden ser intercanviats per altres molècules iòniques que formen part del medi aquós, produint un deteriorament de les propietats dels hidrogels (Le Roux i col., 1999, Darrabie i col., 2005).

Es pot observar com les granes obtingudes a pHs entre 4 i 8 no mostren pràcticament diferències, ni pel que fa al perfil d'alliberament ni pel que fa a les quantitats alliberades, no obstant, si que s'observa diferències respecte les granes obtingudes a pH = 2. En aquest cas, les diferències es manifesten en ambdós sentits. D'una banda es constata un alliberament molt més ràpid i d'altra banda en quantitats superiors.

Aquests resultats estan en consonància amb els resultats previs d'encapsulament on s'ha trobat major quantitat d'ibuprofè encapsulat quan les granes s'obtenen a pH àcid.

En el moment d'obtenir-se les granes a pH àcid, aquest afecta tant al polímer com al principi actiu.

Respecte el polímer, en el moment en què entra en contacte amb el bany de gelificació, es produeixen dos fenòmens simultanis, per una banda el calci s'unirà a alguns dels llocs electronegatius i per altra banda alguns residus aniònics d'alginat quedaran bloquejats per la unió d'hidrogenions originant àcid algínic. Aquests dos fenòmens condueixen a una ràpida gelificació de l'alginat però originant estructures diferents de les que s'originen a pHs superiors, on la gelificació es veu propiciada majoritàriament per les unions de calci i per tant l'entrecreament de cadenes polimèriques formant una vertadera xarxa tridimensional.

Per tant, en el cas del pH àcid, la gelificació es produeix a dos nivells, un d'ells basat en les unions de calci i l'altre en la formació d'estructures insolubles degudes al pH i a la protonació dels grups carboxílics. A la pràctica, el que s'acaba tenint és una gelificació molt ràpida per l'ocurrència dels dos fenòmens de manera simultània. Aquesta gelificació a dos nivells permet atrapar de manera molt ràpida i eficient el lisinat d'ibuprofè a l'interior de les estructures polimèriques de tal manera que la quantitat capaç de difondre al medi és mínima. Ja s'ha observat com la velocitat de gelificació influeix en l'encapsulament i com el fet de garantir una ràpida gelificació, incrementant la concentració d'ions calci disponibles millora la seva eficiència. En aquest cas i per la concurrència dels dos successos fisico-químics esmentats la velocitat de gelificació és màxima.

Un altre aspecte a destacar és que la gelificació compartida entre el mecanisme de precipitació de l'alginat per la neutralització àcida dels radicals aniònics i el de la gelificació ionotròpica per la unió dels ions calci a les cavitats electronegatives dóna estructures diferents i per tant, amb propietats també diferents. Possiblement el fet de tenir menys llocs actius per la unió amb el calci, que en definitiva és l'agent que permet l'entrecruament entre cadenes polimèriques, és a dir, és l'element que uneix entre si dues cadenes polimèriques diferents i a la vegada permet la formació de xarxes tridimensionals, propicia estructures més febles, si més no en determinades condicions del medi, i per tant amb menor capacitat de retenció.

Es constata en els perfils d'alliberament mostrats a la figura 39 com, si bé la retenció del principi actiu és absoluta a pH gàstric, en el moment de fer el canvi de pH l'alliberament del lisinat d'ibuprofè és molt més ràpid, pràcticament immediat per les granes obtingudes a pH=2, mentre que per les granes obtingudes a pHs superiors aquest alliberament es produeix d'una manera més progressiva. Aquesta observació s'explicaria precisament per un menor grau d'entrecruament entre les cadenes polimèriques, el que suposa estructures amb menor capacitat retentiva quan el polímer s'infla pels canvis de pH del medi i comença a absorbir aigua, produint un inflament sobtat i a l'hora, la desintegració de les estructures que atrapen el fàrmac donada la seva baixa resistència en aquestes condicions.

El canvi de pH també condueix a què una part de l'alginat en forma àcida insoluble passi a la forma aniònica soluble, es solubilitza una part de l'alginat no unit a la matriu pels ions calci, de tal manera que la desestabilització de l'estructura encara és molt més ràpida que quan els entrecruaments corresponen majoritàriament als produïts per ions calci.

Per altra banda cal considerar també la solubilitat de l'ibuprofè. L'ibuprofè té un  $pK_a = 4,9$  i tot i que el lisinat d'ibuprofè és més soluble en aigua que la forma àcida (ibuprofè àcid) i inclús que altres sals com la sòdica (Miles i col., 2018), en medi àcid, trobarem l'ibuprofè principalment en la seva forma no ionitzada i insoluble. Aquest fet també afavoreix una menor migració de l'ibuprofè cap a l'exterior propiciant el seu atrapament a l'interior de les granes, el que ajuda també a aquesta eficiència d'encapsulament augmentada respecte l'obtenció de les granes amb altres pHs del medi de gelificació.

Existeixen diversos estudis que avaluen la solubilitat de les diferents sals d'ibuprofè en medi gàstric i la correlacionen amb la farmacocinètica i l'inici de l'efecte (Legg i col, 2014 ; Miles i col. 2018). Aquests estudis, posen de manifest com la dissolució de l'ibuprofè és limitada a pH gàstric. La forma més soluble és justament el lisinat d'ibuprofè, però tot i així, la seva solubilitat a pH=1,2, es troba per sota de l'1% segons les determinacions de solubilitat realitzades al nostre laboratori. La coexistència d'una forma soluble i una insoluble a pH àcid és el que en el cas de l'obtenció de granes de lisinat d'ibuprofè afecta de la manera exposada, tant durant l'obtenció com durant l'alliberament. Els estudis de solubilitat d'ibuprofè a pH gàstric posen també de manifest la formació de cristalls en el moment que l'ibuprofè prèviament solubilitzat arriba a l'estomac, l'espècie polimòrfica que es formi d'aquests cristalls també pot afectar la posterior solubilització i biodisponibilitat de l'ibuprofè, segons es relaciona als treballs que ho han estudiat (Bjarnason i col., 2018).

El lisinat d'ibuprofè com les altres sals d'aquest fàrmac es dissolen i es dissocien per formar ibuprofè àcid que recristal·litza al baix pH gàstric. Quan aquests cristalls entren al duodè es dissolen al trobar-se un pH luminal més proper a la neutralitat i per sobre el  $pK_a$  de l'ibuprofè. Per aquest motiu és probable que també succeeixin processos de dissolució-precipitació sota condicions de pH baix o que es produeixi aquest fenomen a la superfície de les granes (Bjarnason i col., 2018).

A efectes pràctics, per la formació de granes, caldrà tenir en compte quan es treballa a pHs baixos, a on si bé, l'eficiència d'encapsulament millora significativament, també s'està passant d'una situació on el lisinat d'ibuprofè es troba totalment dissolt, en aquest cas en el polímer, a una situació de baixa solubilitat quan té contacte amb el medi àcid. Quan la solució de polímer que conté el fàrmac dissolt impacta en el medi de gelificació àcid i es produeix la precipitació d'una part de l'ibuprofè, la formació de cristalls i el tipus de cristall pot influir també després en la seva re-solubilització. Com més gran sigui la mida dels cristalls, més temps es trigarà a la seva dissolució i per tant els efectes d'alliberament que podem observar podrien tenir cert biaix, en tant no tota la retenció seria facilitada per l'estructura de la matriu sinó per les dificultats de dissolució de la forma recristal·litzada (Bjarnason i col. 2017).

No sembla ser aquest el cas a on s'observa com justament les granes obtingudes a pH = 2 són les que donen un perfil de dissolució més ràpid. La formació instantània de les granes, la contracció del polímer i la seva manca d'inflament ens porten a deduir que els fenòmens de dissolució-precipitació del lisinat d'ibuprofè només poden succeir a la superfície de les granes i no al seu interior.

El lisinat d'ibuprofè, no obstant, es solubilitza en major magnitud que altres sals a l'estomac (Miles i col., 2018) el que representa un inici de l'efecte més ràpid. Aquest és un dels arguments per la utilització de lisinat d'ibuprofè respecte altres sals com l'ibuprofè sòdic. En efecte, tant els estudis de solubilitat d'ibuprofè com els estudis farmacocinètics posen de manifest una més ràpida absorció del lisinat d'ibuprofè ( $t_{max}$  menor) respecte les altres sals, no obstant, aquests estudis puntualitzen també que la diferència en els valors de  $t_{max}$  és mínima entre les diferents sals i pot ser inclús clínicament irrellevant, en tant l'efecte analgèsic que és el cas on més interessa l'assoliment ràpid de valors terapèutics ja comença molt abans d'assolir-se la  $t_{max}$  (Miles i col., 2018).

Es posa de manifest en aquests estudis com la formació de cristalls i la dissolució coincideix amb resultats farmacocinètics, mostrant una reducció de  $t_{max}$  i increment de  $C_{max}$  respecte a la forma àcida d'ibuprofè, tot i que en valors similars a les altres sals, com la sòdica. Per tant, un dels principals determinants del perfil farmacocinètic és l'estat físic de l'ibuprofè i es plantegen dues opcions (Bjarnason i col., 2018):

La primera, si la mida dels cristalls s'associa a una toxicitat gàstrica per la via de l'agressió tòpica local. La segona, si el 30 % de l'increment de  $C_{max}$  observat amb les formulacions de lisinat d'ibuprofè s'associa amb una disminució de la tolerància gastrointestinal, tal com suggereix Brune i col., 1991. No obstant, els efectes adversos per diferents preparacions d'ibuprofè declarats de manera espontània per pacients o professionals, posen de manifest que les sals d'ibuprofè són tan ben tolerades com la forma àcida.

Mentre que per les granes obtingudes a pH=2 en 60 minuts s'allibera la pràctica totalitat del fàrmac, en el cas de granes obtingudes a pHs compresos entre 4 i 8 aquesta alliberació no s'assoleix de manera complerta fins a les dues hores d'haver canviat el pH del medi de dissolució. Al cap de dues hores es pot considerar que el principi actiu s'ha alliberat del tot en tant les granes es veuen ja transparents o han perdut la seva estructura i quan passem a pH=7,4 no es detecta la presència d'ibuprofè al medi de dissolució, indicatiu de què les quantitats són mínimes i en qualsevol cas per sota dels límits detectables.

Des d'un punt de vista biofarmacèutic i del model d'alliberament, s'ha estudiat quin tipus de model matemàtic pot explicar millor aquests resultats. D'una manera empírica ja s'observa la

coincidència entre les corbes d'inflament i les d'alliberament, per tant, podem suposar *a priori*, que el mecanisme que controlarà l'alliberament serà principalment l'inflament.

Per tal de determinar si el procés d'alliberament del fàrmac ve regit per processos d'inflament o de difusió, és a dir fickians o no fickians, s'ha avaluat el model descrit per Ritger-Peppas (1987) definit per la equació:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

a on:

$\frac{M_t}{M_\infty}$  : És la quantitat relativa de fàrmac alliberat a un temps determinat (t)

k : És la constant de proporcionalitat

n : És l'exponent difusional

t : La variable independent t

El model de Ritger-Peppas o Korsmeyer-Peppas, és un dels utilitzats per explicar alliberaments controlats per l'inflament i la difusió, ja que discrimina els processos Fickians dels no Fickians.

Per l'anàlisi amb aquest model és important agafar només els valors de la part de la corba corresponent a l'alliberament fins el 60%, tal com indiquen els propis autors del model (Peppas i col., 2000).

**Taula 33:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes d'alginat i aplicant el model Ritger-Peppas sobre el 60% d'alliberament en el tram a pH =6,8

Composició de les granes i pH d'obtenció	Equació	R <sup>2</sup>	k
Alg 2% (pH = 2)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 2,103t$	0,9503	2,103
Alg 2% (pH = 4)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,246t$	0,9894	1,246
Alg 2% (pH = 6)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,474t$	0,9682	1,474
Alg 2% (pH = 8)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,281t$	0,9876	1,281

Els càlculs s'han realitzat considerant només el tram intestinal (a partir de pH = 6,8) i agafant els valors només fins el 60% de fàrmac alliberat

Dels resultats mostrats a la taula 33, es pot deduir que el processos estan controlats majoritàriament per l'inflament, en tant els resultats s'ajusten al model quan aquest esdevé lineal, és a dir, quan la constant difusional *n* pren valors propers a 1 indicatiu de processos no Fickians, propers a ordre zero, independents de la concentració de fàrmac i per tant controlats principalment per l'inflament i/o l'erosió, però no per la difusió.

Aquest model matemàtic, no obstant, no explica la totalitat de la corba durant la fase d'alliberament intestinal, en tant només s'utilitzen els resultats corresponents a la primera part de la corba fins un màxim d'alliberament del 60%.

Es pot observar que el valor de la constant de proporcionalitat  $k$  per les granes obtingudes a pH=2 és més elevat que per la resta de granes, indicatiu d'una velocitat d'alliberament més alta, tal i com es constata també a partir de la representació gràfica dels resultats (figura 39).

#### 4.4.6. Estabilitat de les granes

Es van emmagatzemar diferents tipus de granes durant 36 mesos a temperatura ambient, obtenint diferents resultats:

- Les granes obtingudes a pH 2 es formaven millor i presentaven valors de fàrmac encapsulat superiors, però en termes d'estabilitat, al cap d'un any perdien la seva estructura i l'ibuprofè s'havia separat de les granes.
- Pel contrari, les granes obtingudes a valors de pH superiors (pH = 6) mostraven millor comportament al llarg del temps, mantenint la seva estructura i sense pèrdua aparent de principi actiu.

També s'ha observat que l'estabilitat depenia de la concentració d'agent gelificant. Les granes obtingudes a concentracions elevades de  $\text{CaCl}_2$  4% van ser consistents al llarg del temps, mantenint la seva estructura original i sense pèrdues de principi actiu, incloent les granes obtingudes amb concentracions del 1% de polímer.

Quan l'agent gelificant es troba en proporcions del 1-2%, les granes formades són menys estables, amb pèrdues d'estructura i de principi actiu, respectivament.

**Taula 34:** Resultats de quantitat de fàrmac a diferents temps d'emmagatzematge a temperatura ambient

Identificació	T0	Contingut d'ibuprofè (%) p/p		
		12 mesos	24 mesos	36 mesos
IBU ALG (pH 2)	94,0	66,3	(desintegrada)	(desintegrada)
IBU ALG (pH 4)	85,2	87,4	86,1	85,6
IBU ALG (pH 6)	77,8	74,7	76,0	76,4
IBU ALG (pH 8)	82,4	81,1	78,2	80,3
IBU ALG (pH 10)	85,3	(desintegrada)	(desintegrada)	(desintegrada)

**Taula 35:** Variació percentual del contingut de fàrmac respecte el contingut inicial

Identificació	T0	Percentatge respecte T0		
		12 mesos	24 mesos	36 mesos
IBU ALG (pH 2)	100	70,5	(desintegrada)	(desintegrada)
IBU ALG (pH 4)	100	102,5	101,05	100,4
IBU ALG (pH 6)	100	96,0	97,68	98,2
IBU ALG (pH 8)	100	98,4	94,9	97,45
IBU ALG (pH 10)	100	(desintegrada)	(desintegrada)	(desintegrada)

Totes les granes corresponen a concentracions d'alginat del 2%, concentracions de lisinat d'ibuprofè del 17% obtingudes en un bany de gelació de  $\text{CaCl}_2$  del 4%.

Les granes obtingudes a pHs dels extrems pH = 2 i pH = 10, són les que es mostren menys estables en el temps. A aquests pHs, el grau de ionització està més desplaçat, en un cas cap a la forma menys soluble (pH = 2) a on preval la forma no ionitzada, és a dir l'àcid algínic. En aquesta situació la coagulació i entrecreuament entre cadenes polimèriques es produeix en

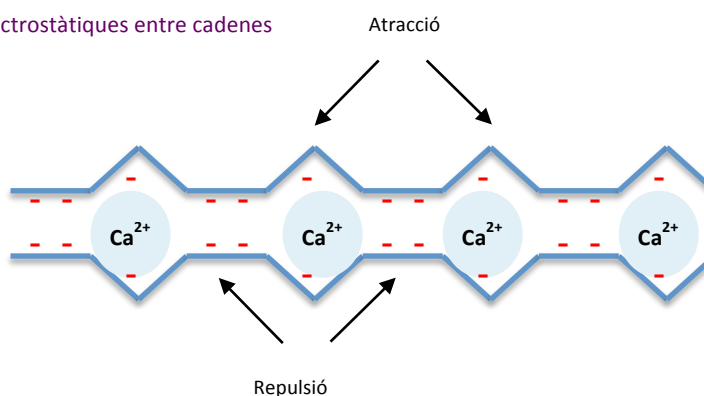


més alta proporció mitjançant punts d'hidrogen, el que deixa estructures febles sobretot quan les granes s'assequen si es comparen quan predominen els entrecreuaments iònics amb el calci.

A l'altre extrem, hi ha el que succeeix a pH alcalí, on es troben estructures totalment ionitzades i cadenes que es repel·liran entre elles. S'ha de considerar l'estructura tridimensional del polímer i els llocs d'aquesta estructura a on s'hi uneix el calci en forma de cavitats que recorden una caixa d'ous, no obstant, les xarxes d'alginat també es conformen d'estructures lineals a on els ions de calci o bé no hi intervenen o bé ho fan d'una manera més feble. En aquesta part de l'estructura i quan el grau d'ionització és elevat, es produeix una repulsió entre cadenes negatives que pot desfer els enllaços intercatenaris formats pel calci. És el que succeiria a pHs intestinals i el que acaba provocant la destrucció de la matriu al anar-se desprenent cadenes d'alginat i solubilitzant-se en el medi.

Això explicaria el comportament i l'estabilitat de les granes a aquests pHs.

Figura 40: Interaccions electrostàtiques entre cadenes



#### 4.4.7. Morfologia

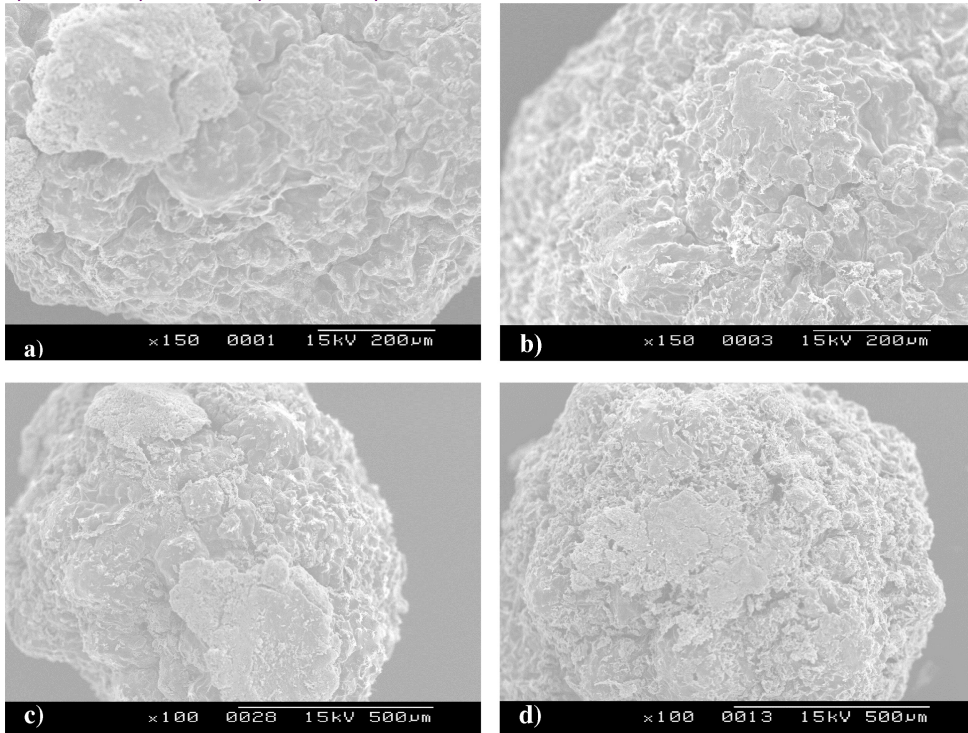
Per microscòpia electrònica es va posar de manifest que la topografia de les granes a la superfície es rugosa i amb replecs i porositats aparents.

No s'observen diferències en les granes obtingudes a diferents temps d'enduriment ni a diferents pHs, excepte les obtingudes a pH 2 que es mostren amb una superfície més llisa a diferència de la superfície més porosa mostrada en les granes obtingudes a altres pHs (figura 42). Aquesta diferent morfologia posaria de manifest la diferent naturalesa dels fenòmens de formació de les granes, en un cas per entrecreuament i en l'altre per coagulació o precipitació.

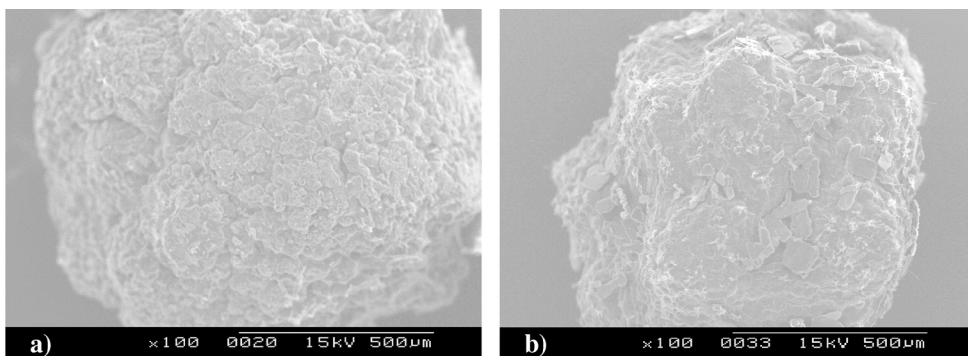
Si que s'observen petites diferències en la morfologia de la superfície en funció de la concentració de  $\text{CaCl}_2$ , concentració de polímer i valor de pH a les que s'ha obtingut (figura 41).

A pH baix, la superfície de la grana és menys rugosa, probablement degut a la formació d'estructures diferents a causa dels mecanismes de gelificació també diferents.

**Figura 41:** Micrografies (SEM) de granes d'alginat 2% obtingudes amb diferent concentració de  $\text{CaCl}_2$ . a) 1%  $\text{CaCl}_2$  b) 2%  $\text{CaCl}_2$  c) 2%  $\text{CaCl}_2$  d) 4%  $\text{CaCl}_2$



**Figura 42:** Micrografies (SEM) de granes d'alginat 2% i  $\text{CaCl}_2$  4% obtingudes a diferent pH a) pH = 6 b) pH = 2





#### 4.5. Granes mixtes d'alginat-chitosan

Si bé la utilització de l'alginat com a matriu única per les granes de lisinat d'ibuprofè té la propietat de retenir aquest principi actiu durant el seu pas gàstric i alliberar-lo un cop arriba a l'intestí de manera relativament ràpida, hi ha un interès en poder perllongar aquest alliberament per la consecució d'un efecte sostingut en el temps o per aconseguir un efecte local a zones intestinals distals com pot ser el còlon (Yao i col., 2005). Tot i no estar dintre dels objectius inicials d'aquest treball, l'obtenció específica de formes d'alliberació colònica, si que ho és l'exploració experimental del potencial que pot tenir l'ús del bipolarimers en la modulació de l'alliberament del lisinat d'ibuprofè en el tracte gastrointestinal. En aquest sentit, i a la vista dels resultats obtinguts amb alginat, es fa palès que les opcions que ofereix l'alginat són limitades en quant a l'alliberament intestinal pel fet de que com s'ha vist l'alginat s'infla i es solubilitza a pH i condicions intestinals, impeding per tant i de manera inevitable l'alliberament relativament ràpid del fàrmac quan aquest ja ha travessat l'estomac.

Aquesta fase experimental ha comportat l'estudi de diversos mètodes d'obtenció de granes, constatant dificultats a l'hora d'obtenir estructures mixtes de chitosan i alginat reals, és a dir, amb estructures formades per entrecreuaments mixtes entre chitosan i alginat i originant estructures amb propietats diferents a les obtingudes només amb l'alginat.

Les granes mixtes d'alginat i chitosan preparades han estat dividides en dos grups:

- 1.- Mètodes a on el chitosan es troba en el bany de gelificació. Dintre d'aquestes se situen també les que tenen diferents capes de recobriment.
- 2.- Mètodes a on els dos polímers alginat i chitosan es troben pre-barrejats a la solució a extrusionar i previ a la seva gelificació.

S'han estudiat els paràmetres que afecten la producció de granes mixtes d'alginat-chitosan que encapsulen lisinat d'ibuprofè.

##### 4.5.1. Obtenció i caracterització de granes placebo d'alginat-chitosan

S'ha iniciat la posta a punt i optimització del mètode de preparació amb l'obtenció de granes placebo. Els resultats i consideracions respecte el mètode d'aquesta part experimental s'exposen a continuació.

Les granes es produeixen de la manera descrita i amb un comportament similar a les granes només d'alginat, no obstant, s'observa a la preparació algunes singularitats que cal considerar a l'hora de posar a punt el mètode de preparació.

En primer lloc, si bé les concentracions de clorur de calci inicialment són les mateixes (4% p/v), en tant partim del mètode prèviament optimitzat per les granes d'alginat, el medi de gelificació adquireix una major viscositat per la presència del chitosan fins el punt que no s'ha pogut anar més enllà d'una concentració de l'1% p/v. Per aquest motiu i sota aquesta constatació s'han utilitzat dues concentracions de chitosan 0,5% (p/v) i 1% (p/v), respectivament. Aquestes dues concentracions es corresponen amb els nivells de concentració més descrits en els treballs publicats i que utilitzen aquest mètode de preparació (Takka i Gürel, 2010).

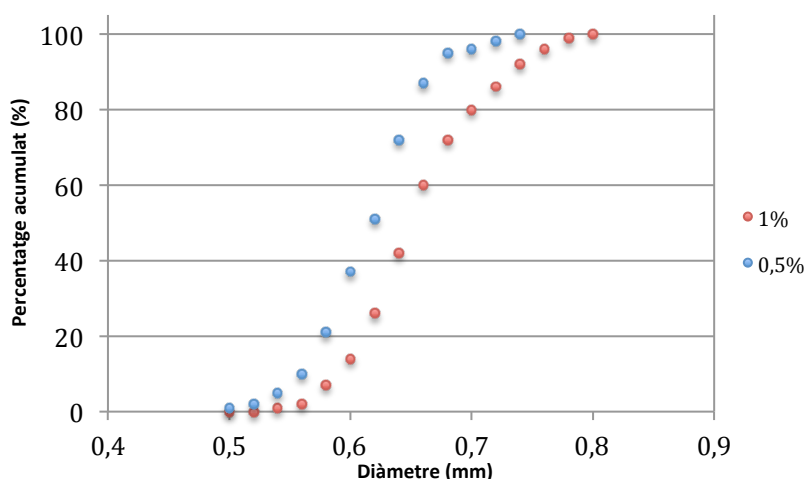
Degut a la viscositat del medi i l'adherència propiciada per la naturalesa bioadhesiva del chitosan, ha estat necessari mantenir el bany sota agitació durant la preparació, amb la finalitat de facilitar la penetració del polímer extruït a dintre el bany de gelificació, i d'altra banda evitar l'adherència entre les granes produïdes.

Un altre element a considerar, és la necessitat de dissoldre el chitosan en el bany, aquest només es pot dissoldre en medi àcid, no obstant, com s'ha pogut constatar prèviament en aquest treball, el medi àcid propicia la formació d'estructures d'alginat diferents de les obtingudes a pH neutre. Per aquest motiu, un cop dissolt el chitosan cal ajustar el pH al voltant de pH=5, amb la finalitat d'evitar d'una banda que l'alginat formi estructures per precipitació en comptes de per entrecreuament, com podria succeir a pHs més baixos, i d'altra banda, evitar que precipiti el chitosan, fet que succeiria a pHs superiors atenent al seu valor de pKa.

#### 4.5.1.1 Mida de les granes

Com a resultat del procediment de gelificació ionotròpica, s'obtenen a les condicions experimentals proposades, granes esfèriques de diàmetres inicials que oscil·len entre els 700 i 1000  $\mu\text{m}$  i que quan s'assequen es contreuen a valors entre 500 i 820  $\mu\text{m}$  (figura 43).

Figura 43: Distribució de la mida de granes placebo mixtes d'alginat i chitosan



#### 4.5.2 Obtenció i caracterització de granes mixtes alginat-chitosan amb lisinat d'ibuprofè encapsulat

Les granes mixtes que incorporen lisinat d'ibuprofè s'obtenen de la mateixa manera que les placebo però incorporant el lisinat d'ibuprofè a la solució a extruir d'alginat 2%.

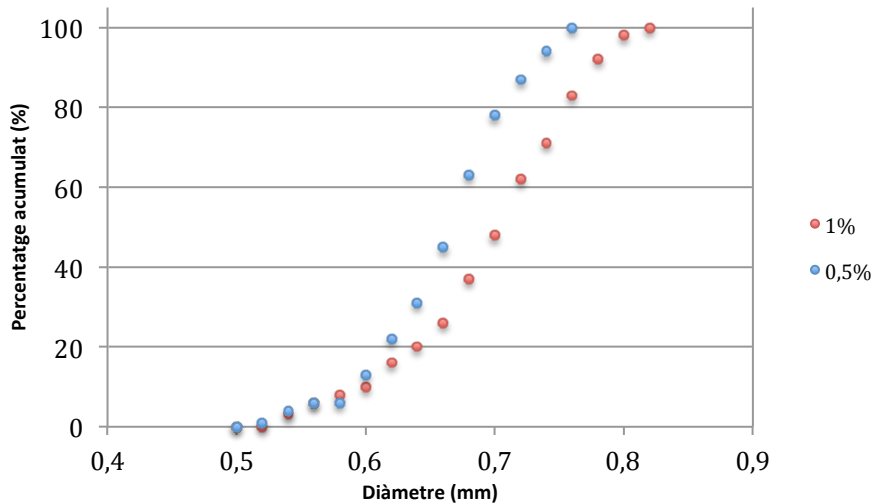
L'obtenció de les granes requereix d'agitació per permetre una millor penetració al medi i vèncer la tensió superficial inicial incrementada per la presència de chitosan.

Tot i així, les granes s'obtenen de manera eficient produint-se la coagulació immediata quan aquestes penetren en el bany.

Inicialment es mantenen els mateixos paràmetres de concentració de clorur càlcic (4% p/v) que a les granes només d'alginat.

#### 4.5.2.1. Mida de les granes obtingudes

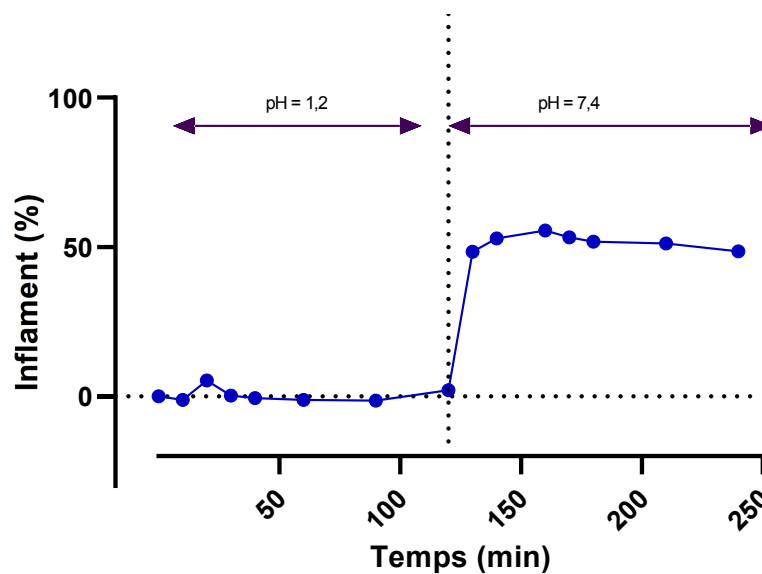
**Figura 44:** Distribució de la mida de granes amb lisinat d'ibuprofè mixtes d'alginat i chitosan



#### 4.5.2.2. Granes obtingudes amb Alginat 2% i chitosan 0,5%

Cinètica d'inflament amb canvi de pH

**Figura 45:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH . Alginat 2%- Chitosan 0,5%



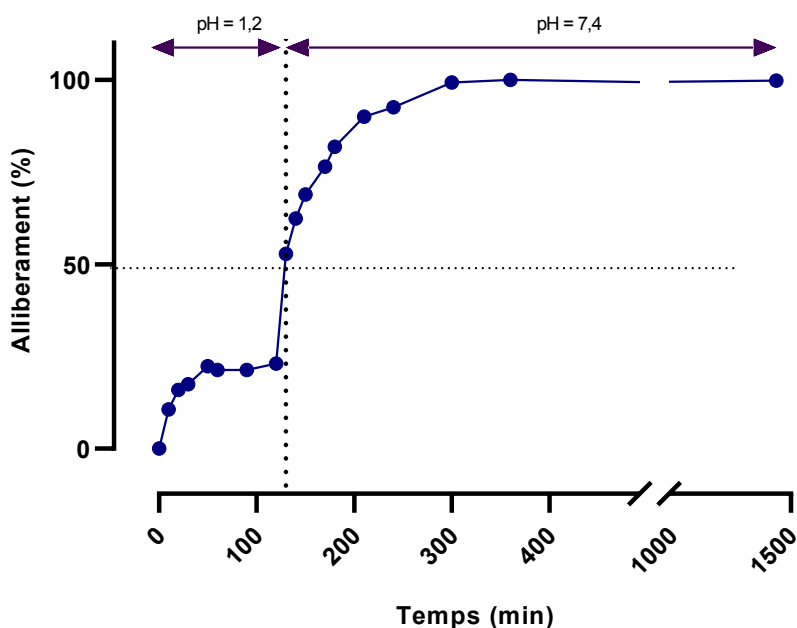
A la figura 45 a pH àcid hi ha una lleugera davallada de l'inflament, aquest fenomen pot ser explicat com una contracció de l'estructura tridimensional que conforma la grana, no obstant

tractant-se de granes seques a on la presència d'aigua és a la pràctica nul·la, la davallada de massa pot ser deguda a la dissolució del chitosan en el medi àcid fent que s'aprecii com una reducció de l'inflament.

Per altra banda, l'inflament total assolit, és a dir, la captació d'aigua, és molt inferior als valors trobats a les granes constituïdes només per alginat. Aquest fet es pot explicar per la pròpia manera en què es formen les granes i per la qual s'obtidrien estructures més febles al haver-hi entrecreuaments amb chitosan. El chitosan a pH àcid, es dissol deixant l'estructura més feble, només amb les unions intercatenàries propiciades pels ions calci. En desaparèixer una part del chitosan, aquestes estructures perden punts d'entrecreuament imperceptibles a pH àcid perquè l'alginat és insoluble en aquest medi, però que s'aprecien ràpidament al canviar de medi, on s'observa un ràpid alliberament del linsinat d'ibuprofè. El menor percentatge d'inflament observat és aparent, en el sentit de què el que succeeix és que les granes no resisteixen tanta adquisició d'aigua, pel que es van desintegrant en el medi i fent-se inviable la seva manipulació i mesura. L'alliberament del fàrmac, en aquest cas està governat majoritàriament per un mecanisme d'erosió / desintegració de la grana i no tant per inflament i adquisició d'aigua. Aquest comportament per granes mixtes alginat – chitosan ha estat descrit en els treballs de Pasparakis i Boropoulos (2006).

#### Cinètica d'alliberament amb canvi de pH

Figura 46: Cinètica d'alliberament amb canvi de pH. Alginat 2% - Chitosan 0,5%

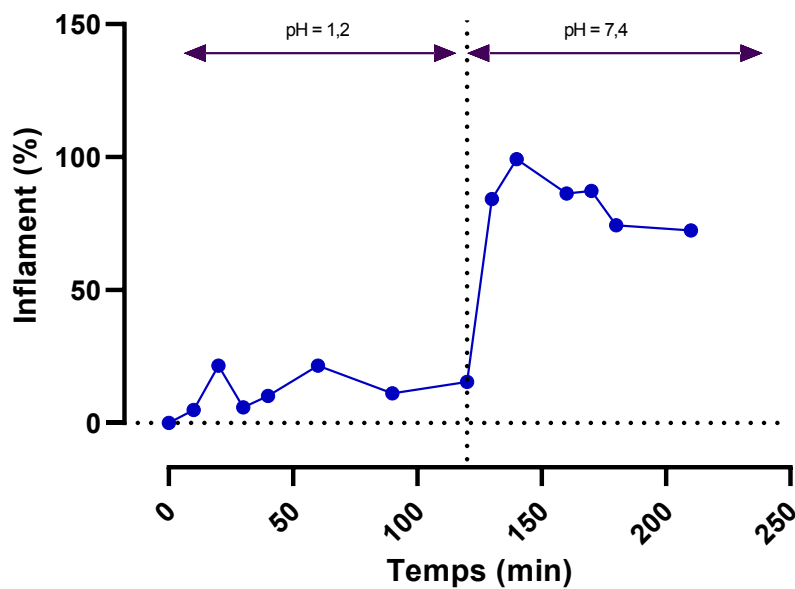


Es pot observar un lleuger alliberament de linsinat d'ibuprofè a pH = 1,2 potser degut a la dissolució del chitosan en medi àcid més que a l'inflament o a la presència de linsinat d'ibuprofè a la superfície de la grana. El fàrmac s'allibera de manera molt ràpida i en la seva totalitat a les dues hores d'haver iniciat el canvi a pH= 7,4.

## 4.5.2.3. Granes obtingudes amb Alginat 2% i chitosan 1%

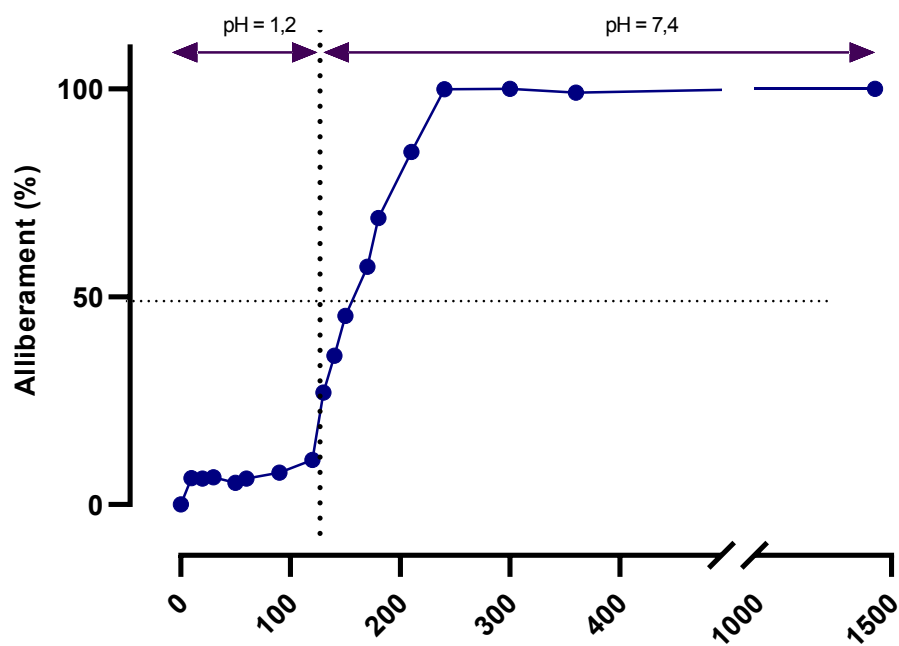
## Cinètica d'inflament amb canvi de pH

Figura 47: Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Alginat 2% - Chitosan 1,0%



## Cinètica d'alliberament amb canvi de pH

Figura 48: Cinètica d'alliberament amb canvi de pH. Alginat 2% - Chitosan 1,0%





**Taula 36:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes de nucli mixte

Composició de les granes	Temps d'alliberament de la fracció de fàrmac (min)			
	t <sub>25%</sub>	t <sub>50%</sub>	t <sub>75%</sub>	t <sub>90%</sub>
Alg 2% – Chitosan 0,5%	118	129	167	209
Alg 2% – Chitosan 1,0%	129	158	187	221

Comparativament, s'observen perfils d'inflament similars als obtinguts amb l'alginat, tanmateix a pH intestinal les granes es destrueixen completament de manera relativament ràpida, tal i com succeïa amb les granes d'alginat. Sota aquestes observacions podem deduir que no hi ha diferències de comportament de les granes que puguin ser rellevants en la seva utilització *in vivo*.

En efecte, els perfils d'inflament coincideixen amb els d'alliberament. S'observa com a pH gàstric l'alliberament de fàrmac és nul, mentre que quan es passa a pHs intestinals, l'alliberament del fàrmac es produeix de manera immediata, en dues hores pràcticament ja s'ha completat. Les diferències en el comportament d'inflament observat entre una concentració i altra de chitosan, probablement no siguin degudes només a la quantitat de chitosan capaç d'interaccionar amb l'alginat, sinó també a la influència del chitosan en la viscositat de les solucions de gelificació, el que es tradueix en alteracions de la formació de les granes, al penetrar aquestes de manera diferent en el medi i produir-se la coagulació del polímer també de manera diferent. Es pot observar com l'alliberament igual que l'inflament té moltes similituds als perfils obtinguts per les granes només d'alginat.

Les granes s'acaben inflant il·limitadament fins la seva dissolució tal com succeeix amb les granes d'alginat.

A efectes pràctics, s'observa un alliberament similar al que es produeix amb les granes que no contenen chitosan, és a dir, que el chitosan en les condicions experimentals d'obtenció de les granes no és capaç de modificar les propietats de la matriu. Probablement, les interaccions que es produeixen entre els electròlits implicats, no afavoreixen una unió real de l'alginat amb el chitosan i tant aquest com l'ibuprofè queden atrapats en la xarxa polimèrica formada per l'alginat i el calci. És a dir, el que es produeix és un encapsulament del chitosan en comptes de participar de la unió dels entrecruaments a les cadenes d'alginat.

En el moment de formar-se les granes, es disposa a la solució de polímer amb lisinat d'ibuprofè d'una quantitat d'electròlits de càrrega negativa important, propiciada pels grups carboxílics aportats per l'alginat i per l'ibuprofè. A la part del bany de gelificació, tenim la situació contrària, un elevat nombre d'electròlits de càrrega positiva, per una banda els ions calci i per l'altra, el chitosan amb els grups amino protonats. Cal considerar també, que per mantenir el chitosan soluble en aquestes condicions, el pH ha de ser baix (pH=2-3), el que significaria una quantitat d'hidrogenions lliures, no obstant, aquest pH s'ajusta al voltant de pH=5 un cop dissolt el chitosan per buscar un equilibri a on el chitosan es mantingui encara soluble i l'alginat no precipiti en la seva forma àcida.

Quan es submergeix l'alginat extruït al medi de gelificació, es produeix un equilibri electrolític, que determinarà la formació i estructura de la matriu i de la grana, i en funció de les concentracions d'electròlits propiciarà que aquesta tingui un o altre comportament.

El calci i el chitosan competiran pels grups negatius de l'alginat. La ràpida formació de les granes deguda a l'elevada concentració de calci pot evitar la interacció de l'alginat amb el chitosan, a la vegada que aquest queda atrapat a l'estructura reticular formada per l'alginat i el calci però sense una unió efectiva electrostàtica. La probabilitat de què el chitosan interaccioni de manera rellevant amb l'alginat en aquestes condicions és baixa, primer per l'equilibri competitiu, estequiòmicament la proporció d'ions calci és superior a la de chitosan, i en segon lloc, per la seva afinitat per unir-se a les cavitats electronegatives també degut a la forma i dimensions del ió, geomètricament més adaptada al calci que al chitosan que no deixa de ser una cadena de polímer. La formació de granes és instantània, originant estructures suficientment compactes com perquè el chitosan no pugui migrar al seu interior interaccionar-hi o bescanviar-se per ions de calci.

Aquests fets explicarien la gairebé inexistent diferència que observem entre les granes mixtes obtingudes amb chitosan i les obtingudes sense chitosan. No obstant, hi ha nombrosa bibliografia que utilitza aquest sistema per la preparació de granes mixtes amb resultats en alguns casos sorprenents en quant a l'observació d'alliberaments més perllongats amb el chitosan.

En previsió de la influència d'un excés de clorur càlcic en el medi, s'han realitzat experiments amb solucions de gelificació de clorur de calci al 2% (p/v) amb la finalitat de reduir la velocitat i la intensitat de formació de les granes. No obstant, aquests assajos han resultat també fallits i no s'observa variacions de les propietats de les matrius mixtes que continuen comportant-se com si no hi hagués modificacions a la seva estructura.

En els estudis publicats que utilitzen granes mixtes de chitosan i alginat preparats sota aquestes condicions s'hi observen diferències (González-Rodríguez i col., 2002), és a dir, un comportament diferent quan s'utilitza granes mixtes d'alginat-chitosan, i a més, aquests autors aconseguen modular l'alliberament variant les proporcions de chitosan en relació amb l'alginat. Després de la repetició d'experiments, quan es tracta del lisinat d'ibuprofè o de granes placebo, aquests resultats no han pogut ser reproduïts, ni tan sols s'han trobat resultats similars als descrits a la bibliografia.

Les diferències que s'han pogut observar respecte els estudis efectuats amb el lisinat d'ibuprofè, és que en els estudis publicats s'utilitzen fàrmacs menys solubles i a concentracions significativament més baixes, de l'ordre de gairebé 100 vegades inferiors. En alguns casos, les condicions d'obtenció de les granes són d'una durada més llarga, sobretot pel que fa als temps d'enduriment i en altres casos, no hi ha comparativa respecte granes d'alginat sense chitosan obtingudes en les mateixes condicions.

Altres estudis, obtenen resultats d'alliberament per les granes mixtes similars als obtinguts en el present treball, tot i utilitzar concentracions molt més baixes de principi actiu. González-Rodríguez i col., 2002, preparen granes mixtes d'alginat i chitosan per gelificació ionotròpica utilitzant la mateixa tècnica i encapsulant diclofenac. Tot i ser les concentracions de diclofenac de magnituds significativament inferiors (0,25% p/v) a les que s'han utilitzat de lisinat d'ibuprofè (17% p/p), els resultats mostren un comportament similar pel que fa a l'alliberament. En aquest treball s'aconsegueix modular l'alliberament del diclofenac sòdic variant les proporcions de chitosan respecte les d'alginat.

Per tant, es pot preveure la importància de l'equilibri iònic i de les proporcions de cadascun d'aquests ions, per tal que la competència entre ells sigui l'apropiada per una interacció

efectiva entre tots ells. Les proporcions d'aquests ions dependrà d'una banda de la concentració i d'altra banda del pH.

Pel que fa a la concentració de chitosan i clorur de calci, si bé *a priori* aquesta és independent i la podem decidir en el disseny experimental, ja presenta d'entrada certes limitacions que impediran la seva lliure selecció.

Per una banda, i pel que fa al chitosan, es té una limitació de màxims. Si bé la solubilitat a pH àcid no és un problema, si que ho és la viscositat de les solucions que produeix. Quan la viscositat supera un 1% (p/v), es fa pràcticament impossible l'obtenció de les granes en tant el polímer extruït no pot penetrar i submergir-se al medi de gelificació, impedit així la formació de la grana. Per tant, en aquest sentit només es podrà com a màxim tenir concentracions d'un 1% (p/v) de chitosan al medi de gelificació. A l'altre costat, hi ha el clorur de calci en un sentit invers, si bé la seva solubilitat és molt bona en aigua i no produeix solucions viscoses, en aquest cas el que interessaria és reduir-ne la seva concentració per donar oportunitat competitiva al chitosan, no obstant, els ions calci són elements estructurals essencials en els entrecruaments entre cadenes d'alginat per la formació de les granes. Com s'ha pogut observar, amb independència de quina sigui la concentració d'alginat a la solució d'extrusió, quan es disposen concentracions de clorur de calci per sota d'un 2% (p/v) en el medi de gelificació, comencen a sorgir dificultats per a l'obtenció de granes, sobretot quan aquestes han de contenir el lisinat d'ibuprofè.

Finalment, la darrera limitació a què ens enfrontem és el rang de pHs del medi. Respecte el clorur de calci no es té cap limitació, però respecte el chitosan si que es requereix que aquest es trobi a un pH àcid per solubilitzar-lo, habitualment s'afegeix un 1% (v/v) d'àcid acètic al medi, que amb posterioritat es pot pujar fins valors d'entre pH = 4,5 - 5,5. Però en aquestes condicions els grups positius disponibles també seran menors, mentre que els negatius disponibles de l'alginat superiors, el que ens deixa en un avantatge estequiomètricament clarament favorable als ions calci respecte el chitosan.

A la pràctica, aquesta metodologia d'obtenció resulta insuficient per l'obtenció d'estructures mixtes amb chitosan estables i que permetin una modulació de l'alliberament de lisinat d'ibuprofè a les concentracions elevades com les que es proposen, només gràcies a la presència d'aquest polímer i mitjançant el procediment d'obtenció de la gelificació ionotròpica.

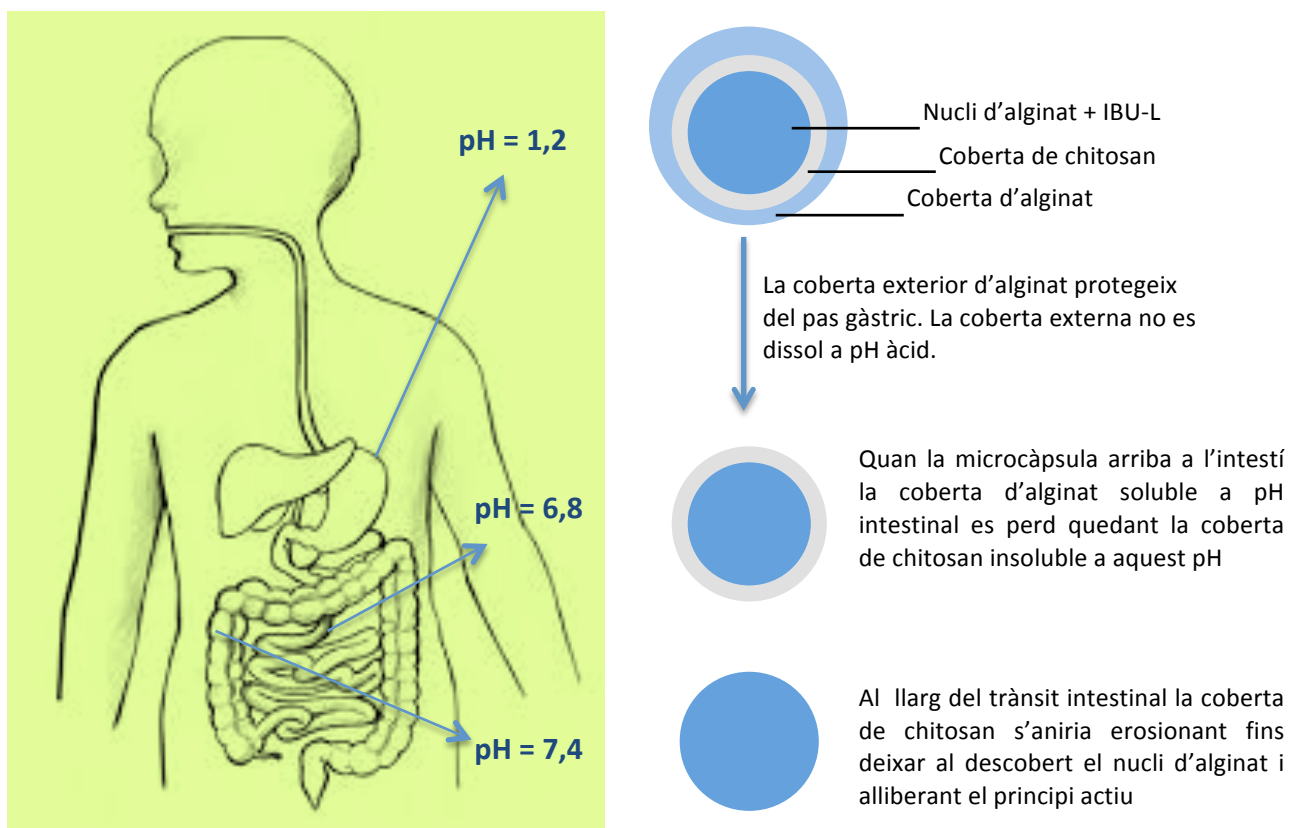
No s'entra a discutir el grau de desacetilació del chitosan, paràmetre no sempre inclòs en els treballs publicats i que òbviament també pot influir, però d'una manera potser no prou efectiva per tots els motius exposats.

#### 4.5.3 Granes d'alginat amb doble recobriment de quitosan i d'alginat

Per tal d'aconseguir un alliberament més perllongat a nivell intestinal, es van preparar granes d'alginat amb un doble recobriment, primer de quitosan i després d'alginat (Shi i col. 2007), seguint la idea i procediment realitzat per aquests autors que utilitzen nivells de concentració de fàrmac, de polímer i de clorur de calci similars als del present treball.

La justificació teòrica d'aquests recobriments s'esquematitzaria de la següent manera (figura 49):

**Figura 49:** Esquema d'hipòtesi de comportament de les granes amb doble recobriment quitosan –alginat



En base a la literatura científica disponible, on s'hi pot trobar diversos treballs que descriuen la producció de granes d'alginat amb recobriments dobles de chitosan i d'alginat, porta a pensar que aquesta estratègia pot ser adequada, no obstant, els resultats experimentals previs han posat de manifest que el comportament de les granes obtingudes és molt similar al que succeeix amb les granes simples d'alginat i per tant, el fet d'utilitzar el procediment de preparació de granes d'alginat i afegir-hi el chitosan, no aporta un valor afegit des d'un punt de vista ni qualitatiu, ni quantitatiu en les condicions experimentals treballades.

De manera estratègica, la idea de fer recobriments que permetin un alliberament dirigit al còlon mitjançant la superposició de polímers sensibles a diferents pHs sembla factible. Així, les granes preparades amb un nucli compost per granes d'alginat amb el lisinat d'ibuprofè encapsulat al seu interior, amb un primer recobriment de chitosan i amb un recobriment extern d'alginat, podrien ser candidates a evitar l'alliberament gàstric, per la protecció conferida per l'alginat de la capa exterior insoluble i totalment contraeta a pH gàstric, posteriorment i un cop ja al duodè aquesta capa es començaria a desfer per deixar a l'exterior la capa de chitosan insoluble a pHs d'entre 6,8 i 7,4, per permetre tot un trànsit fins arribar a nivell colònic, a on per erosió durant el trànsit, aquesta capa quedaria eliminada deixant el nucli actiu d'alginat per alliberar el principi actiu.

Aquesta estratègia que sobre el paper ja planteja alguns dubtes, no funciona en els assajos *in vitro*, i un cop més, els perfils d'alliberament que s'obtenen són similars als obtinguts per les granes només d'alginat.

Tot i que hi ha autors que han trobat resultats sorprenents amb aquesta estratègia i que apunten a una possibilitat de produir un alliberament dirigit a l'intestí distal (Anal i col., 2005; Rahsol i Fashmi, 2012), la realitat experimental que s'ha acabat trobant amb el lisinat d'ibuprofè en el present treball ha estat molt diferent.

L'explicació d'aquests resultats no satisfactoris per les finalitats perseguides i en qualsevol cas, diferents del que diuen alguns dels treballs publicats, l'hem de buscar en l'anàlisi del comportament dels materials utilitzats, les seves interaccions i les proporcions de principi actiu molt més elevades en comparació amb les utilitzades en aquests treballs, així com la seva solubilitat, tant en les solucions de polímer durant la preparació, com en els medis d'alliberament un cop es caracteritzen.

Per una banda, cal considerar que un cop es disposa de les granes d'alginat ja formades i assecades, la disponibilitat de grups negatius que puguin interaccionar amb el chitosan serà baixa en tant ja hi ha una saturació pels ions de calci. La superfície de la grana per tant, difícilment es trobarà activada com per interaccionar de manera intensa amb el chitosan. Tanmateix, es pot produir una activació d'aquesta superfície modificant el pH del medi i portant-lo al límit, on el chitosan es mantingui encara soluble, això vol dir també, encara amb suficients càrregues positives com per interaccionar amb un contraió.

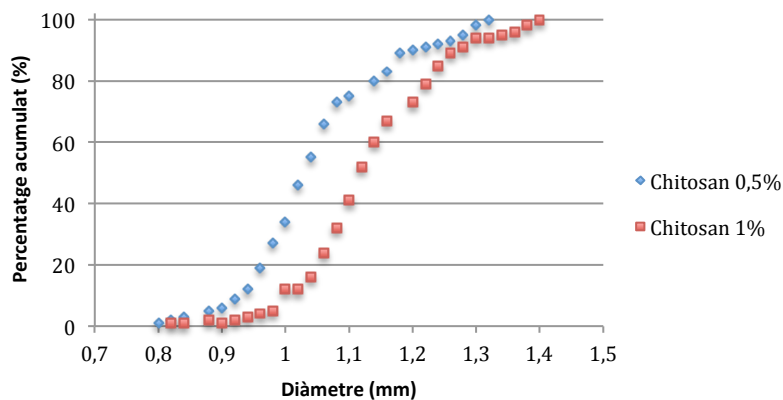
No obstant, i havent pogut constatar a simple vista que l'aspecte de les granes canvia pel recobriment amb chitosan, aquesta capa no deixa de ser prima, feble i permeable. Mentre que l'alginat dóna estructures compactes degut a les cavitats "egg-box" que en medi àcid es mantenen contraetes i eviten l'absorció d'aigua de manera gairebé absoluta, no és així amb les de chitosan. De fet, no es troba a la bibliografia granes exclusivament de chitosan que a un pH determinat puguin retenir el fàrmac d'una manera equivalent a com ho fa l'alginat en medi àcid. Aquesta diferència ja ens dona una idea de què malgrat la permeabilitat pugui ser modulable en funció del pH a les estructures de chitosan, no aconseguirem una impermeabilitat absoluta com de fet succeeix amb les estructures d'alginat càlcic, el que

impedirà que aquesta capa de chitosan actuï com un recobriment efectiu per tal d'evitar la penetració i acció del medi intestinal a l'interior de la grana.

Si ens fixem en l'última capa d'alginat, la situació pot ser similar al que succeïa amb la capa intermitja de chitosan. Cal fer la preparació a un pH adient per tal que el chitosan estigui lleugerament activat i pugui unir-se a l'alginat. Finalment i un cop feta la unió amb el chitosan de la capa intermitja, cal endurir amb clorur de calci la capa més externa d'alginat.

Les granes que s'obtenen mitjançant el doble recobriment són de mida força heterogènia que oscil·la entre els 900 i els 1400  $\mu\text{m}$  i amb influència de la concentració de chitosan (Figura 50).

**Figura 50:** Diàmetre de les granes amb doble recobriment



#### 4.5.3.1. Granes obtingudes amb Alginat 2%, recobriment de chitosan 0,5% i recobriment d'alginat 0,2%

**Figura 51:** Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 0,5 %

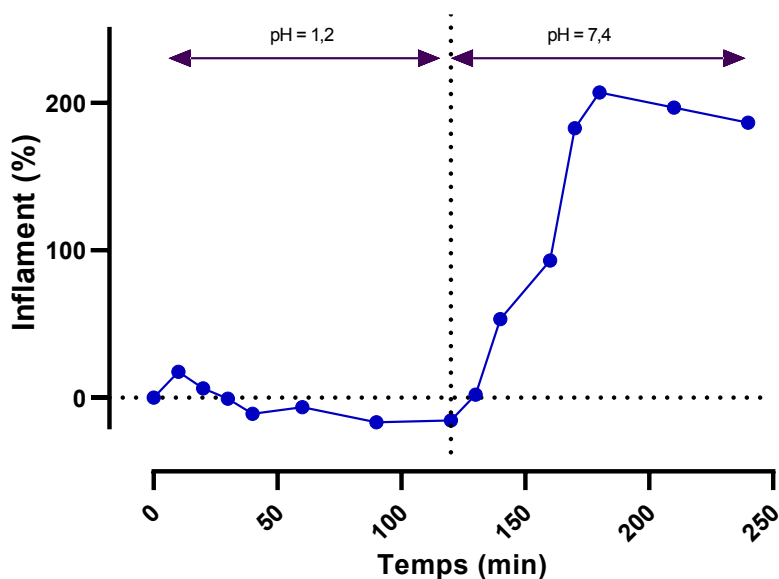
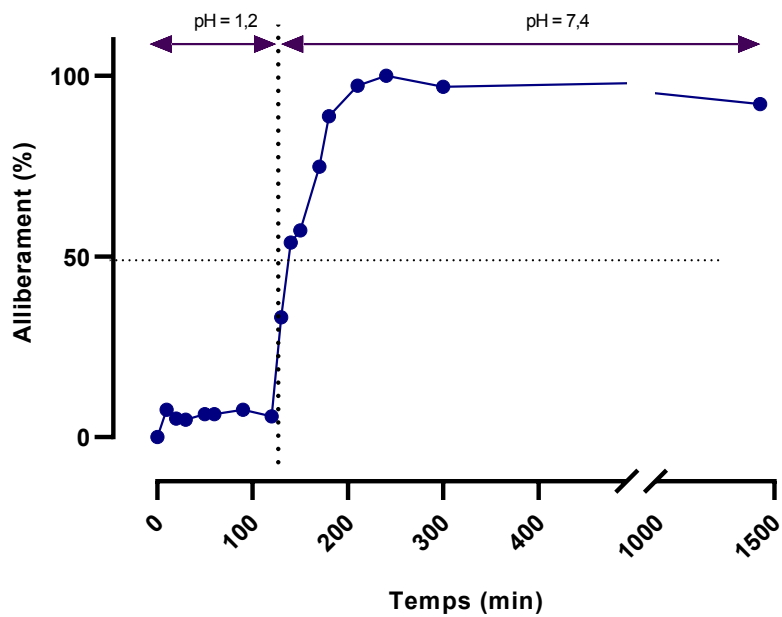


Figura 52: Cinètica d'alliberament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 0,5 %



4.5.3.2. Granes obtingudes amb Alginat 2%, recobriment de chitosan 1,0 % i recobriment d'alginat 0,2%

Figura 53: Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 1,0 %

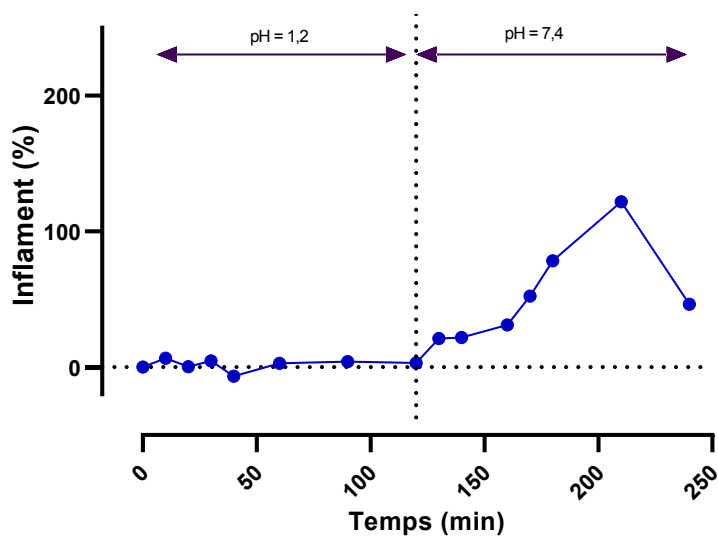
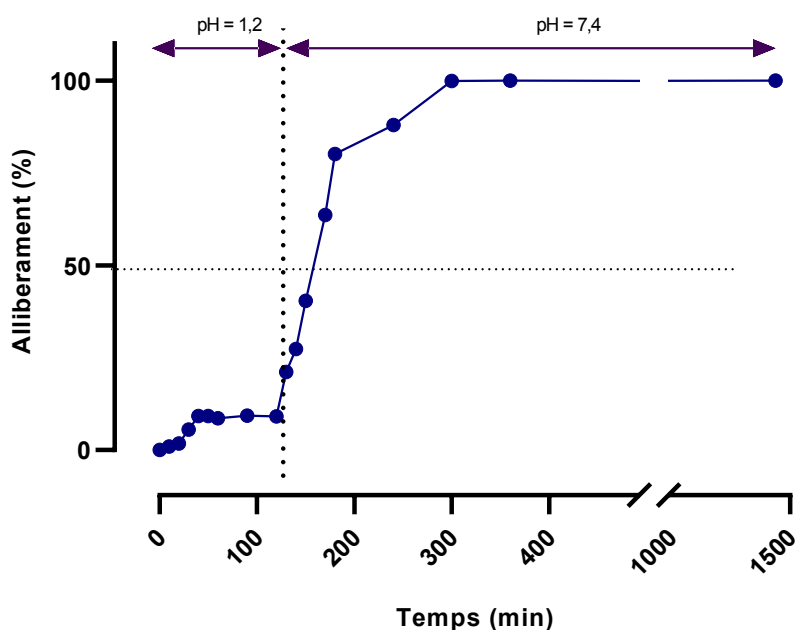


Figura 54: Cinètica d'inflament amb canvi de pH. Doble recobriment alginat 0,4% - chitosan 1,0 %



Taula 37: Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes amb doble recobriment

Composició de les granes	Temps d'alliberament de la fracció de fàrmac (min)			
	t <sub>25%</sub>	t <sub>50%</sub>	t <sub>75%</sub>	t <sub>90%</sub>
Alg 2% – Chitosan 0,5% doble	127	137	170	181
Alg 2% – Chitosan 1,0% doble	136	158	177	188

Es pot observar (figures 51 i 53) com el patró d'inflament obtingut per aquestes granes és similar al observat a les granes d'alginat, és a dir, les granes es mantenen en medi àcid, aquesta era una finalitat perseguida i esperable pel recobriment extern d'alginat, no obstant a pH intestinal és produeix un ràpid inflament fins la desintegració de les granes, fet no desitjable, en tant el que justament es perseguia era aportar consistència a l'estructura evitant l'inflament o si més no, evitant la desintegració de l'estructura.

En aquest sentit, els recobriments efectuats no han estat prou eficients per realitzar l'acció prevista. Les concentracions utilitzades per fer els recobriments i que parteixen de dades trobades a la bibliografia (Anal i Stevens, 2005) són baixes, 0,08% de chitosan pel primer recobriment i 0,08% d'alginat sòdic pel segon recobriment i potser insuficients per suportar l'encapsulament de quantitats elevades de lisinat d'ibuprofè, com les que estem treballant i que proporcionen microcàpsules amb un 90% de contingut de fàrmac. Shi i col., 2007, utilitzen pels recobriments, concentracions idèntiques de chitosan i d'alginat pels dos recobriments, concentracions molt inferiors a les utilitzades en el present treball. Aquests autors parteixen de nuclis mixtes d'alginat i chitosan que en el nostre cas s'han mostrat també ineficients amb



el lisinat d'ibuprofè com per conferir propietats significativament diferents i tecnològicament interessants respecte a les obtingudes amb nuclis simples d'alginat.

Tot i això, autors com Shi i col., 2007, troben a pH=7,4 resultats d'alliberament equiparables als trobats en el present treball i la modulació de l'alliberament que acaben trobant ve més condicionada per la temperatura d'alliberament que per la presència de recobriments, el que vindria a corroborar la insuficiència d'aquests sistemes de recobriment multicapa per aconseguir l'alliberament a l'intestí gruixut, si més no, quan les concentracions de fàrmac encapsulat són elevades.

Per altra banda, la permeabilitat dels polímers a les solucions reguladores utilitzades i en les condicions experimentals, pot convertir el recobriment en un element insuficient com per aconseguir una modulació de l'alliberament del fàrmac significativa respecte les formes no recobertes, és a dir, que caldria cobertes més gruixudes o amb una interacció més clara entre els polímers i els entrecreuaments formats entre ells.

Aquestes interaccions entre els components s'han mostrat complexes, en tant la influència del grau d'ionització, i en conseqüència la seva dependència del pH extern, implica un estudi molt més acurat d'aquestes variables durant la preparació, per tal d'aconseguir una interacció iònica robusta i quantitativament eficient. Tanmateix, el propi principi actiu amb grups ionitzables que poden interaccionar amb l'estructura de les matrius preparades modificant-ne el seu comportament, suposa una variable més que pot influir en les interaccions i formació d'unions estables i efectives a la xarxa polimèrica com per proporcionar característiques i comportaments diferents. Això explicaria perquè alguns autors veuen en aquests sistemes, tant per l'ús de granes de nucli mixtes, com de granes amb diferents capes de recobriment chitosan – alginat, la possibilitat de modular l'alliberament del fàrmac.

Tot i això, a la bibliografia consultada hi ha sovint contradiccions. Mentre en estudis com els de Shi i col., 2007 s'observa com el comportament d'inflament i d'alliberament del fàrmac amb nuclis mixtes de chitosan i alginat segueix un patró molt similar al que s'obté amb nuclis simples d'alginat, coincidint aquest patró de comportament amb els resultats experimentals que s'han obtingut en el present treball, altres autors obtenen resultats diferents, com Anal i Stevens (2005), a on el patró d'inflament i d'alliberament del principi actiu, en aquest cas ampicil·lina, és radicalment diferent, el producte comença a alliberar-se a pH gàstric i continua alliberant-se de manera progressiva i lenta a pHs intestinals fins a les 24 h en la majoria de casos. Rahsol i Fashmi, 2012 obtenen resultats similars pel cefaclor, però contrasta en aquest treball el ràpid alliberament del fàrmac, aconseguint-ne alliberar la pràctica totalitat entre 4 i 6 hores, però en cap cas 24 hores. No obstant, els mateixos autors en un treball previ (Anal i col., 2003), utilitzant la mateixa metodologia però encapsulant albúmina sèrica bovina (BSA) obtenen resultats diferents i la BSA queda retinguda en el medi gàstric durant 4 hores per ser alliberada a pHs intestinals amb alguns perfils d'alliberament en la línia dels obtinguts en el present treball, però de molta més llarga durada en funció de la composició de les diferents capes de recobriment.

Els motius que poden explicar els resultats d'aquests autors poden estar en la manera de preparació de les matrius i el control que han pogut tenir sobre les diferents variables involucrades, a banda de la naturalesa singular del principi actiu i la proporció de principi actiu que encapsulen  $\geq 20\%$ , molt elevada en comparació amb altres treballs. Tot i que els autors no ho posen de manifest a la seva discussió i conclusions, atribuint tot el comportament a l'efecte de les interaccions entre el chitosan i l'alginat, així com els recobriments efectuats, una quantitat de principi actiu elevada pot afectar a la pròpia estructura de la matriu, a la formació d'entrecreuaments i a la resistència dels mateixos modificant el comportament de les pròpies

estructures polimèriques, així com també pot afectar el fet de què el fàrmac sigui o no soluble en la solució de polímer, fet que no acaba de quedar del tot clar en algun dels esmentats treballs. Per tant, una part del comportament d'alliberament del fàrmac podria ser atribuïble en part, a les seves pròpies característiques fisicoquímiques (El-Sayed, i col., 2018). Aquesta observació, justificaria perquè en aquests mateixos treballs (Anal i Stevens, 2005), les granes preparades sense chitosan i sense cap recobriment, és a dir només a base alginat són incapaces de retenir l'ampicil·lina a pH gàstric el que reforçaria la idea de la influència del principi actiu en les propietats mecàniques de la matriu i també en el fet que l'alliberament sigui en una part important dependent de la naturalesa del fàrmac, a més de la possible influència que puguin exercir els diferents recobriments.

En aquest sentit, es fa evident que no es pot deslligar l'estructura de les microesferes i la seva composició en polímers de la presència d'un determinat principi actiu amb una naturalesa o altra. Així doncs, a banda de les interaccions conegudes entre els polímers utilitzats, cal considerar també les interaccions amb el principi actiu, més quan aquests s'hi troben en proporcions molt elevades respecte els polímers.

En el cas del lisinat d'ibuprofè, es disposa d'una banda de l'ibuprofè amb un grup carboxílic de naturalesa aniònica quan es troba en solució i que pot interaccionar mitjançant enllaços iònics amb els grups catiònics del chitosan. De fet, hi ha autors que ja han estudiat aquesta interacció per produir nanopartícules estables amb alliberació modificada partint d'aquesta estratègia (Abioye i col., 2016). Per altra banda, hi ha la contribució del lisinat. La lisina com a aminoàcid, té la possibilitat de formar unions catiòniques i aniòniques, en tant té dos grups amino ionitzables a pH àcid amb càrrega positiva i un grup àcid ionitzable amb càrrega negativa a pHs alcalins, en aquest sentit la lisina pot actuar com a element aglutinador i d'entrecreuament entre el chitosan al que s'uniria pel seu grup carboxílic i l'alginat al que s'uniria a través dels grups amino electropositius.

És obvi que aquest equilibri d'interaccions entre els diferents components resulta complex i a la pràctica, *a priori* difícil de predir quina proporció d'unions seran d'una manera o altra i quina serà la jerarquia de les unions en funció del pH de preparació i els equilibris estequiomètrics que es produeixin.

**Taula 38:** Possibles interaccions dels components quan tots es troben solubilitzats en el medi

	Ió Calci (+)	Alginat (-)	Chitosan (+)	Ibuprofè (-)	Lisina (+/-)
Ió Calci (+)	X	✓	X	✓	✓
Alginat (-)	✓	X	✓	X	✓
Chitosan (+)	X	✓	X	✓	✓
Ibuprofè (-)	✓	X	✓	X	✓
Lisina (+/-)	✓	✓	✓	✓	✓

Visualment, podem observar a la taula 38 que les interaccions possibles entre els diferents components són múltiples, no obstant, cal dir també que algunes de les interaccions són més fortes i sòlides que altres i per tant, seran les que tindran un paper predominant i definitori de l'estructura.

En efecte, les unions entre el calci i l'alginat seran més sòlides que la resta per dos motius principals: En primer lloc la estequiometria. La disponibilitat d'ions calci és absoluta en el medi. La concentració del 4% proporciona una estequiometria molt favorable a la unió entre l'alginat i el calci, de fet aquesta unió és la base de l'estructura esfèrica de les granes i de la seva formació tal i com s'ha definit en els estudis inicials. En aquest sentit la competència dels cations presents a la barreja pels llocs electronegatius serà molt favorable al calci.

Per altra banda i des d'un punt de vista espacial, tal i com s'ha anat repetint al llarg d'aquest treball, l'alginat adopta una estructura de caixa d'ous amb cavitats electronegatives amb una geometria que propicia que els ions calci hi encaixin d'una manera molt eficient respecte les altres molècules competidores per aquests llocs que no tenen geometria esfèrica com el calci. En aquest sentit, no tota la cadena d'alginat està composta per les cavitats electronegatives en forma de caixa d'ous i per tant des d'un punt de vista estèric hi haurà punts de la cadena a on el calci no tindrà tant avantatge a l'hora de formar unions, donant oportunitat als altres elements. Cal tenir present que de tots els ions divalents capaços de formar enllaços amb l'alginat com el Bari, el Magnesi o l'estronci, el Calci és de tots ells el que permet obtenir estructures més estables i resistents, el que ja pressuposa una major adaptabilitat i afinitat d'aquest catió pels llocs a on es formen les unions.

Els resultats experimentals obtinguts en aquesta fase i la idea de poder disposar de granes mixtes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè i estabilitzades amb un policatió que tingui propietats diferents a les d'alginat sol, porta a replantejar el mètode de preparació i a realitzar una nova sèrie d'experiments. Tanmateix, en qualsevol dels casos, els recobriments amb chitosan i alginat en els experiments efectuats en el present treball, no aconsegueixen mostrar possibilitats per l'objectiu d'alliberar el principi actiu de manera selectiva a zones distals del tracte gastrointestinal, el que també porta a l'exploració d'altres possibilitats que permetin una interacció més robusta i eficient entre l'alginat i el chitosan.

#### 4.6. Granes mixtes d'alginat-chitosan preparades amb pre-barreja de polímers

A la vista dels resultats obtinguts i la manca de possibilitat d'obtenir amb els procediments utilitzats fins el moment matrius biopolimèriques que permetin modular de manera substancialment diferent l'alliberament del lisinat d'ibuprofè, s'opta per un canvi en la estratègia del mètode de preparació.

Després d'una anàlisi teòrica de l'evidència experimental obtinguda fins el moment, és a dir que la incorporació de chitosan no aporta possibilitats reals i manifestes de modular l'alliberament del lisinat d'ibuprofè en condicions intestinals, s'arriba a la conclusió ja explicada, que el procediment d'obtenció de les granes mixtes per gelificació de l'alginat en presència de calci i chitosan és massa favorable a la formació d'alginat càlcic, impedit o deixant les unions i formació d'entrecreuaments intercatenaris amb el chitosan com irrellevants, o com a mínim insuficients davant la ràpida formació de les granes, impedit d'aquesta manera que el chitosan participi de manera efectiva de l'estructura de la grana com per modificar-ne les seves propietats i influir substancialment en l'alliberament del lisinat d'ibuprofè.

Es proposa doncs, partir d'una solució de polímer mixt (alginat – chitosan) prebarrejat en diferents proporcions, per després incorporar-hi el principi actiu i finalment produir les granes mitjançant el procediment de gelificació ionotrópica per l'entrecreuament amb els ions de calci. Aquesta estratègia, necessàriament ha de permetre incorporar proporcions de chitosan molt superiors als procediments anteriors, com a única manera d'obtenir matrius significativament diferents de composició i que per tant, també puguin ser significativament diferents respecte al seu comportament a les preparades amb anterioritat, que s'han mostrat a la pràctica ineficients.

Tot i que amb aquesta estratègia, la base del suport estructural continuarà sent l'alginat de calci i per tant, la formació de la grana, es produirà igualment per gelificació ionotrópica amb el calci, s'espera disposar d'unions prèvies formades entre el chitosan i l'alginat, de tal manera que el calci ocupi aquelles posicions que li són més pròpies per geometria, és a dir, les cavitats electronegatives en forma de caixa d'ous. Cal tenir en consideració la importància de les interaccions prèvies que es puguin establir entre l'alginat i el chitosan, quan el chitosan es troba en el medi de gelificació la seva mobilitat és lenta en comparació amb la dels ions calci, per raons de dimensió i geometria de les cadenes polimèriques i per tant, amb més dificultats per arribar a espais interiors de la matriu formada en el que interaccionar amb l'alginat.

En aquest punt, s'ha de destacar la importància d'establir les condicions necessàries per poder barrejar els dos polímers de càrrega oposada sense que es produeixi la coagulació del medi i de manera que ambdós polímers siguin solubles en el medi.

S'estableix una proporció de polímer global del 2% (p/v) a la solució. Es a dir, que s'utilitzarà la mateixa proporció de polímer ja establerta i utilitzada en els estudis anteriors i que en aquests corresponia al 100% d'alginat, no obstant, ara una part d'aquest polímer serà chitosan.

Un altre element a destacar, un cop més, és el pH del medi. L'alginat precipita a pH àcid, però el chitosan necessita un pH àcid per a solubilitzar-se, i pot precipitar si el pH puja excessivament, per exemple a valors per sobre del seu pKa. Per aquest motiu, s'addiciona àcid acètic (0,5% p/v) a la solució de polímer que conté l'alginat i a continuació s'hi dissol el chitosan. Si s'utilitzen concentracions més elevades d'àcid acètic com un 1% p/v, estàndard descrit a la literatura i utilitzat en la majoria de treballs com a concentració habitual per dissoldre el chitosan, la solució de polímer agafa una consistència excessiva que impedeix la

correcta agitació, possiblement deguda a la coagulació àcida de part de l'alginat. S'estableix doncs, com a concentració òptima i amb independència de la quantitat de chitosan a dissoldre un 0,5% p/v, concentració que atorga pH suficient per dissoldre el chitosan i una viscositat adequada per facilitar l'agitació.

Un cop dissolt el chitosan s'ajusta el pH al voltant de  $\text{pH} = 5$ , concretament entre 5 i 5,5. Aquest és un pH descrit en diversos treballs (Anal i Stevens, 2005; Takka i Gürel, 2010) com a idoni per afavorir les unions alginat – chitosan. A aquest pH tindrem un grau d'ionització d'ambdós polímers adequats per la seva interacció, l'alginat disposarà d'un nombre elevat i suficient de grups carboxílics ionitzats i el chitosan per la seva banda també tindrà grups amino ionitzats suficients com per encara romandre soluble i interaccionar amb els grups electronegatius de l'alginat.

La solució de polímer així preparada, es deixa durant 20 minuts en agitació per afavorir interaccions entre cadenes d'alginat i chitosan. Durant aquest període, no s'observen canvis aparents en el medi pel que fa a modificacions organolèptiques o de viscositat.

Durant la preparació i a mida que s'incrementa la quantitat de chitosan, la viscositat també incrementa. S'arriba al límit màxim amb la proporció alginat-chitosan 50:50 a on les condicions de preparació ja són complexes, en tant la dissolució del chitosan es veu dificultada i cal aplicar una agitació més severa, no obstant, la solució de polímer resultant permet encara la seva manipulació per a dissoldre-hi el lisinat d'ibuprofè i per a ser extrusionada.

Les proporcions d'alginat / chitosan previstes són: 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 i 50:50

El mètode de preparació s'ha optimitzat de manera progressiva començant per les granes que contenen menys proporció de chitosan. Aquestes són les que s'espera que tinguin un comportament més similar al de les granes d'alginat i per tant, les que d'entrada han d'oferir menys incertesa en quant a la seva preparació.

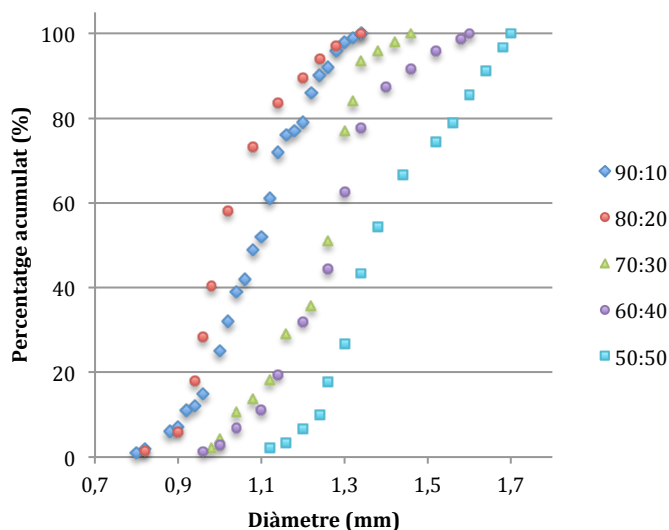
Les observacions inicials respecte el mètode anterior i en la fase de posta a punt no mostren excessives dificultats ni diferències de comportament, tret de les estrictament metodològiques de la diferent preparació.

Pel que fa a l'extrusió, si bé les granes es formen de manera correcta, ha estat necessari modificar el diàmetre de les agulles respecte els experiments anteriors. Agulles amb diàmetres inferiors a 0,8 mm es col·lapsen ràpidament impossibilitant l'extrusió.

Pel que fa a la formació de les granes, aquesta es mostra lleugerament més difícil, és necessària l'agitació del medi i el mètode és menys eficient que en experiments anteriors, en tant algunes granes no s'arriben a formar. Tot i això, el mètode d'obtenció és suficientment robust i amb un bon rendiment.

Com a conseqüència de la major viscositat, major tensió superficial i l'ús d'agulles de diàmetre superior, les granes obtingudes són també de diàmetre més gran. Aquest diàmetre s'incrementa a mida que augmenta la proporció de chitosan, probablement degut a fenòmens de tensió superficial produïts per la interacció d'aquest polímer que aporta viscositat al medi en el que es solubilitza.

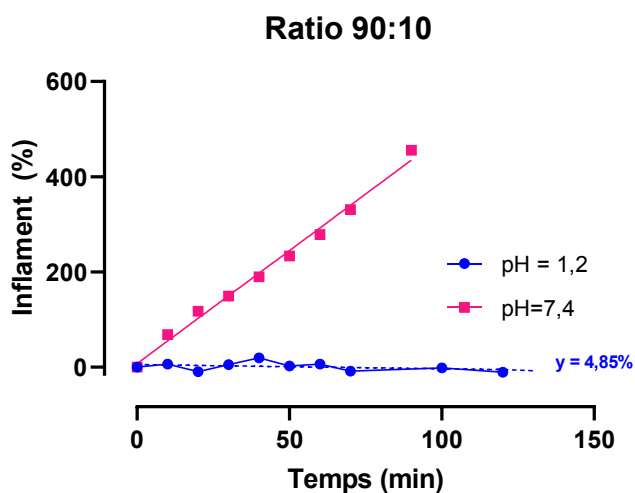
A continuació es mostren els resultats obtinguts d'aquestes sèries d'experiments.

**Figura 55:** Mida de les granes placebo amb diferents proporcions d'alginat : chitosan

Les mides d'aquestes granes son més grans que les preparades amb anterioritat. El motiu principal està en la utilització de solucions de polímer diferents i la inevitable necessitat d'utilitzar agulles de diàmetre 0,8 mm el que ja d'entrada pressuposa que les gotes extruïdes seran més grans. Les granes placebo es mostren flexibles de manera que es poden comprimir sense que es trenqui la seva estructura. A mida que es va incrementant la proporció de chitosan, la viscositat de la solució a extruir també s'incrementa. Per una banda, la mida de les gotes obtingudes és superior i d'altra banda la formació de les granes per gelificació ionotròpica amb clorur de calci esdevé cada cop més precària al haver-hi una menor proporció d'alginat relativa al total del polímer, essent el pitjor cas el de les granes 50:50. Aquests factors en conjunt són els que contribueixen a l'increment de la mida de les granes a mesura que s'incrementa la proporció de chitosan i disminueix la d'alginat.

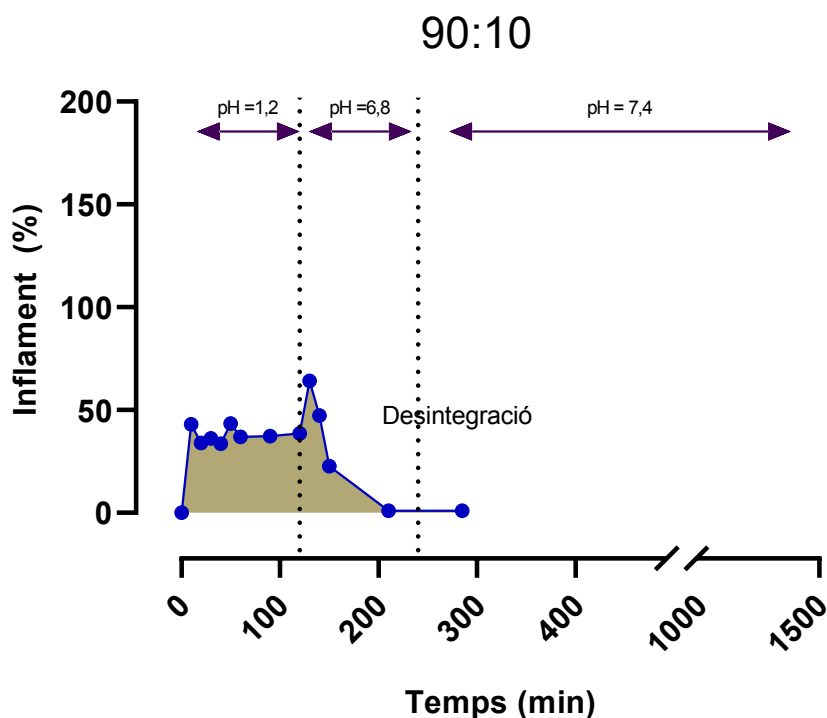
#### 4.6.1 Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 90:10

##### 4.6.1.1. Cinètica d'inflament

**Figura 56:** Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 90:10

El perfil d'inflament que s'observa a les granes placebo (Figura 56), és similar al obtingut amb les granes només d'alginat i sense chitosan. La diferència principal està en què a pH = 1,2 en aquestes granes es produeix un inflament basal del 4,85%, mentre les que no estan estabilitzades amb poliacrilat, l'inflament és pràcticament zero. Les granes són poc resistents al medi neutre i a pH=7,4, abans dels 120 minuts que dura la cinètica d'inflament, les granes perden la seva integritat quan arriben al màxim d'absorció d'aigua.

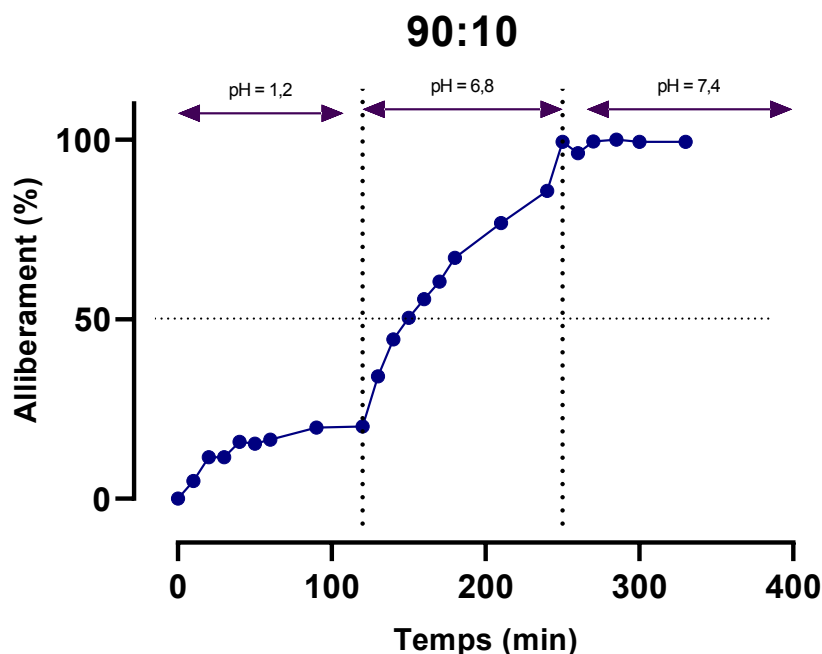
Figura 57: Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 90:10 amb lisinat d'ibuprofè



Respecte les granes que encapsulen ibuprofè, a pH = 1,2 s'observa un inflament de base substancialment més elevat que en el cas de les granes placebo (figura 57). Amb el canvi de pH, l'inflament s'incrementa lleugerament i les granes es van desintegrant de manera ràpida. Els punts comptabilitzats com a 0% són deguts a què les granes han perdut per erosió part de la seva estructura i han tornat al seu pes inicial, però no perquè hagin perdut aigua sinó perquè s'ha perdut part de l'estructura que la retenia. No es continua mesurant el grau d'inflament per no deteriorar més les granes degut a la necessària manipulació per fer les mesures i no influir així en els resultats d'alliberament.

## 4.6.1.2. Cinètica d'alliberament

Figura 58: Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 90:10 amb lisinat d'ibuprofè



A la figura 58 es pot observar com el perfil d'alliberament es correlaciona amb l'inflament. A pH = 1,2 es produeix un lleuger alliberament de fàrmac, en consonància amb el lleuger inflament que també mostren les granes placebo a aquest pH. Igualment, aquí es produeixen diferències respecte el que passa amb les granes de polímer pur d'alginat i no mixt. En aquest cas, no hi ha alliberament de fàrmac tal i com s'ha constatat en experiments anteriors (figures 38 i 39)

Quan es fa el canvi a pH = 6,8 es produeix un ràpid alliberament del fàrmac que es completa en les dues hores que dura aquesta fase. Quan es canvia a pH = 7,4 ja s'ha alliberat tot el lisinat d'ibuprofè, coincidint també amb l'inflament observat que mostra l'erosió i desintegració de les granes.

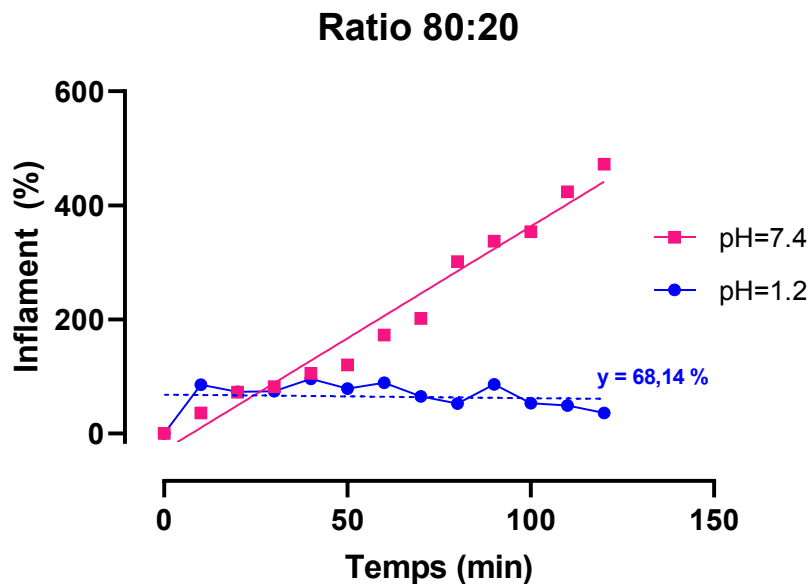
Es pot dir que no s'observen diferències rellevants respecte el que succeeix amb les granes que no són mixtes, tret de que en aquest cas es produeix un mínim alliberament inicial a pH gàstric.



## 4.6.2. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 80:20

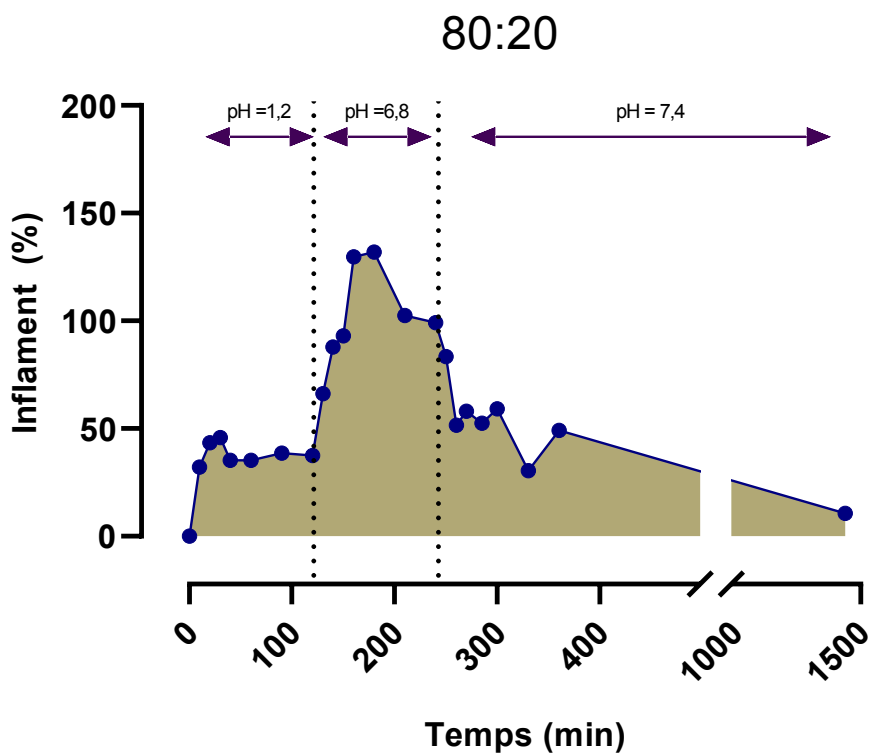
## 4.6.2.1. Cinètica d'inflament

Figura 59: Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 80:20



Es pot observar (figura 59) com a pH=1,2 es produeix un inflament basal del 68,14 % respecte l'inicial, mentre que a pH = 7,4 es produeix un inflament lineal que arriba al 500% mesurat en pes d'aigua absorbit. Les granes tot i ser més resistents que les de proporció 90:10 s'acaben desintegrant.

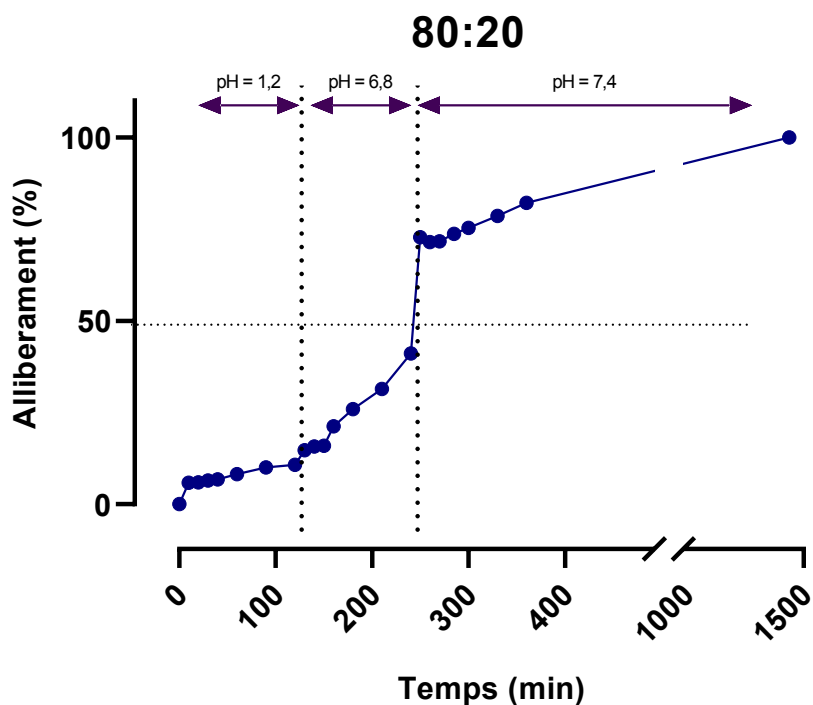
Figura 60: Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 80:20 amb lisinat d'ibuprofè



El perfil d'inflament de granes amb lisinat d'ibuprofè (figura 60), té similituds amb les granes de proporció alginat-chitosan 90:10, però en aquest cas les granes són molt més resistents malgrat perdre consistència i erosionar-se, fet que es posa de relleu per la pèrdua de pes constatable a partir del màxim assolit als 180 minuts de l'experiment. En aquest cas com en l'anterior, la pèrdua d'inflament no s'ha de considerar com una contracció de l'estructura sinó com una erosió i dissolució progressiva de la mateixa que li fa perdre la capacitat de retenir aigua al seu interior.

#### 4.6.2.2. Cinètica d'alliberament

Figura 61: Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 80:20 amb lisinat d'ibuprofè



Pel que fa a l'alliberament del fàrmac es constata un lleuger alliberament a pH = 1,2 que progressivament s'incrementa a pH = 6,8 fins a fer un salt important a partir del minut 240, just abans de fer al canvi a pH = 7,4. A partir d'aquest moment i fins les 24 h l'alliberament és progressiu.

## 4.6.3. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 70:30

## 4.6.3.1. Cinètica d'inflament

Figura 62: Perfil d'inflament granes placebo de proporció alginat : chitosan 70:30

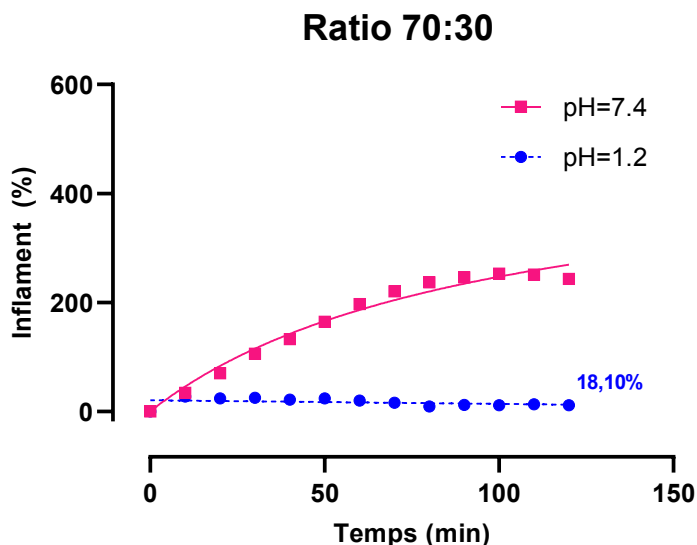
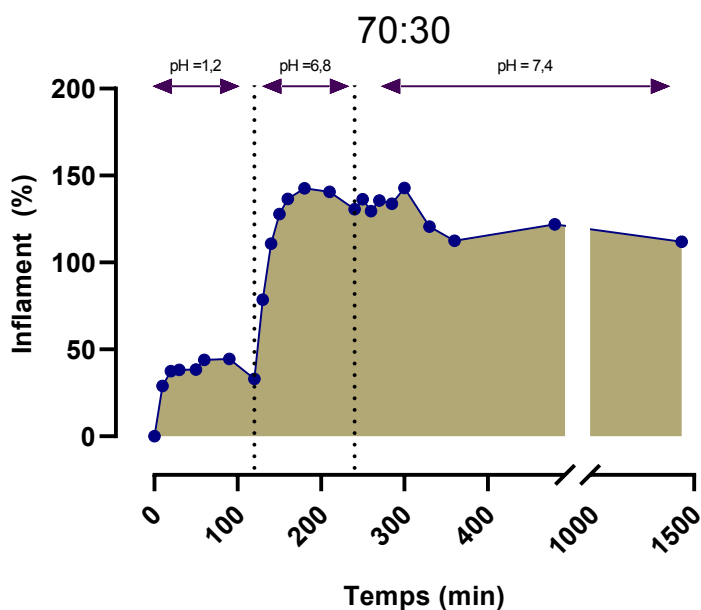


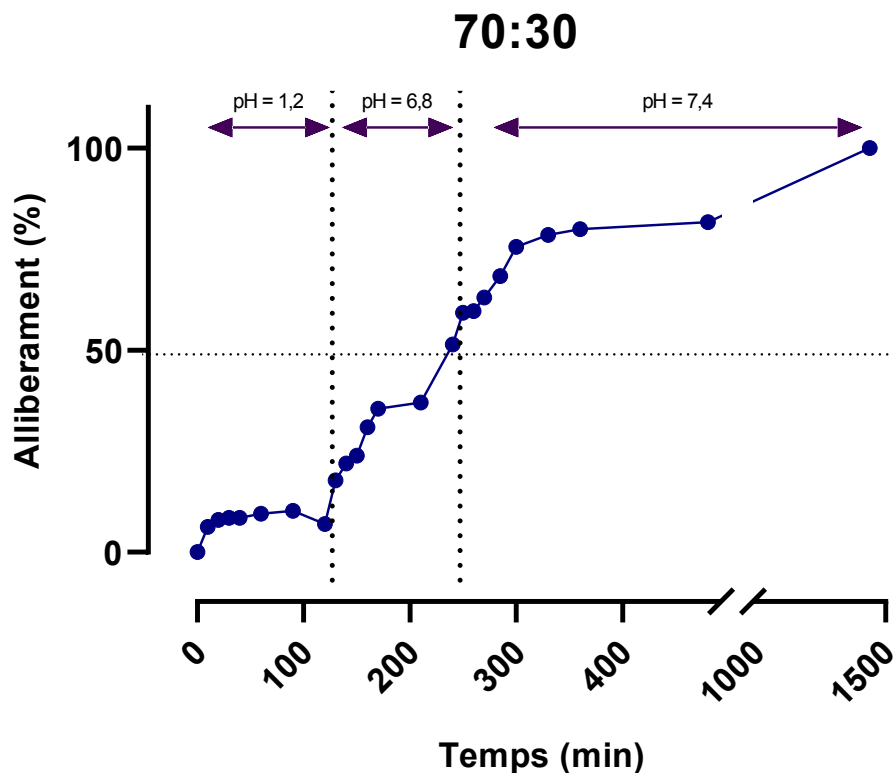
Figura 63: Perfil d'inflament de granes de proporció alginat : chitosan 70:30 amb lisinat d'ibuprofè



Els resultats obtinguts mostren un perfil d'inflament més diferenciat respecte les granes que contenen proporcions de chitosan inferiors. En el cas de les granes placebo hi ha un inflament basal notable a pH 1,2, mentre que el grau d'inflament que s'assoleix a pH 7,4 és menys acusat que en les granes que tenen menys chitosan. Les granes que contenen lisinat d'ibuprofè són molt més resistents a pH 7,4 i mantenen la seva integritat i inflament durant tot l'experiment tal com es dedueix dels valors d'àrea sota la corba (taula 38). Observem un inflament basal similar a les granes de proporcions 80:20 i amb un increment màxim a pH 6,8 també del mateix ordre, però amb la diferència que a les granes de proporcions 70:30 es manté en el temps al llarg de tot l'experiment.

## 4.6.3.2. Cinètica d'alliberament

Figura 64: Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 70:30 amb lisinat d'ibuprofè



Pel que fa a l'alliberament, el comportament també és similar a les granes de 80:20 però aquest es produeix de manera més lenta i s'observa que segueix un patró molt similar a la corba d'inflament a on al voltant dels 400 minuts s'inicia per una banda, un patró d'alliberament de velocitat més lenta que coincideix amb la disminució dels valors d'inflament observats a la figura 63. A partir d'aquests resultats es dedueix la influència del chitosan en el comportament d'alliberament del lisinat d'ibuprofè encapsulat en granes mixtes.

## 4.6.4. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 60:40

## 4.6.4.1. Cinètica d'inflament

Figura 65: Perfil d'inflament de granes placebo de proporció alginat- chitosan 60:40

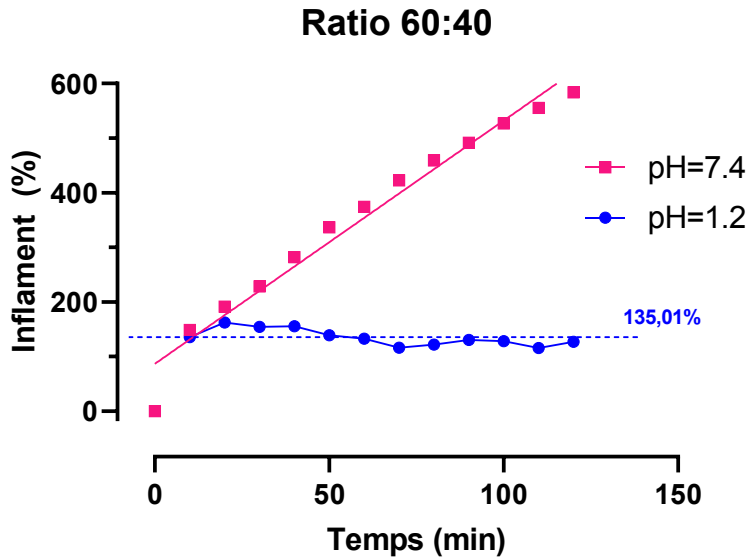
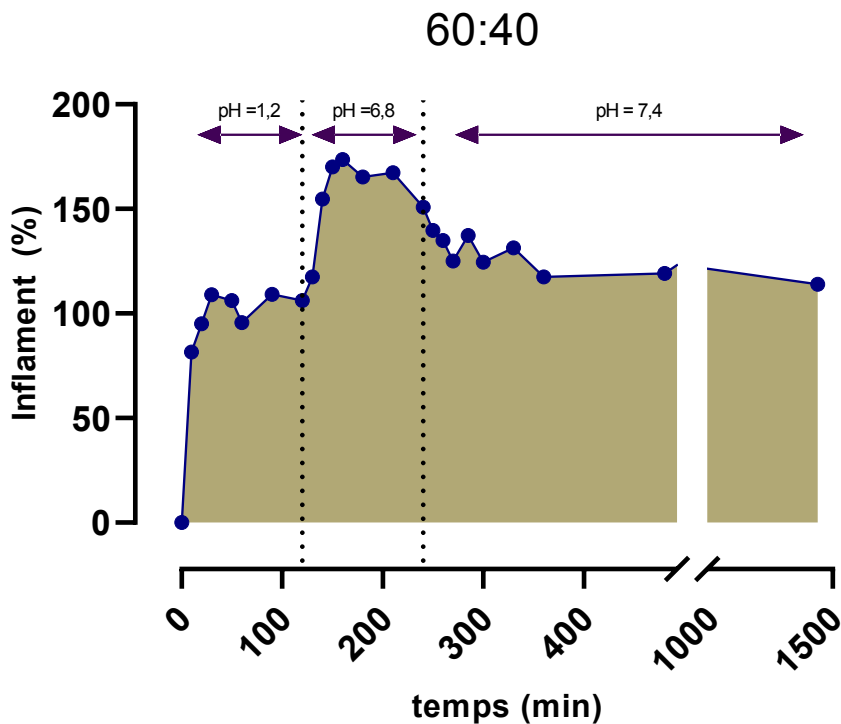


Figura 66: Perfil d'inflament de granes de proporció alginat- chitosan 60:40 amb lisinat d'ibuprofè



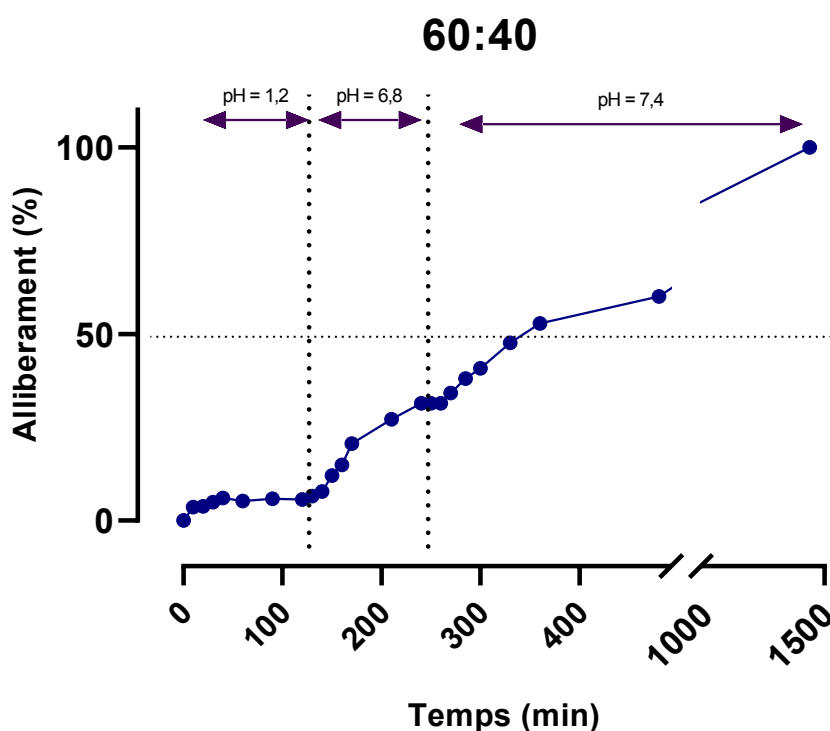
A pH = 1,2 s'observa un grau d'inflament de les granes similar tant a les placebo com a les granes que contenen lisinat d'ibuprofè encapsulat. En ambdós casos a pH gàstric hi ha un inflament basal superior al 100% respecte l'inicial. S'assoleix un màxim a partir de què es canvia el pH a 6,8 i per davallar de nou mantenint-se gairebé de manera constant fins al final

de l'experiment. Aquest comportament i el màxim assolit s'ha d'interpretar com el moment en què es dissolen les estructures d'alginat càlcic tal com succeïa amb les granes d'alginat sense chitosan, no obstant, les granes no s'acaben de desintegrar i mantenen un volum constant degut a l'estabilització del chitosan i probablement dels altres components que hi actuen, d'una manera podríem dir-ne complementària, i que aporta estabilitat i consistència a l'estructura, malgrat el pH s'incrementi fins 7,4.

Les granes es mantenen durant tot el temps que dura l'experiment i fins a 72 hores sense desintegrar-se.

#### 4.6.4.2. Cinètica d'alliberament

Figura 67: Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 60:40 amb lisinat d'ibuprofè



El perfil d'alliberament a pH 1,2 no es correlaciona amb el grau d'inflament observat. Com s'ha observat amb anterioritat quan es canvia el pH a pH = 6,8 la cinètica d'alliberament agafa aparentment perfils d'ordre zero. En tot el període d'estudi, l'inflament no sembla controlar l'alliberament i aquest només té una certa dependència del pH extern amb comportament homogeni a partir de pH= 6,8. Aquest comportament cinètic, com la perllongació en el temps, demostraria un cop més la interacció de l'ibuprofè amb la matriu de chitosan i com l'alliberament es va produint principalment en funció de la constant d'equilibri entre la forma unida al chitosan i la lliure. Aquests resultats juntament amb els obtinguts de l'experiment amb granes de proporcions 70:30 corroboren la influència del chitosan a les formulacions per modificar de manera substancial l'alliberament del lisinat d'ibuprofè en condicions de pH intestinal.

## 4.6.5. Granes mixtes d'alginat - chitosan de proporció 50:50

## 4.6.5.1. Cinètica d'inflament

Figura 68: Perfil d'inflament de granes placebo de proporció alginat- chitosan 50:50

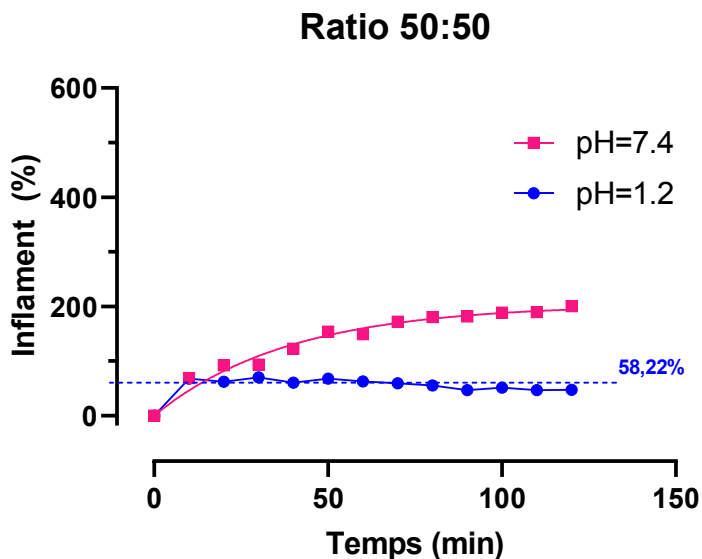
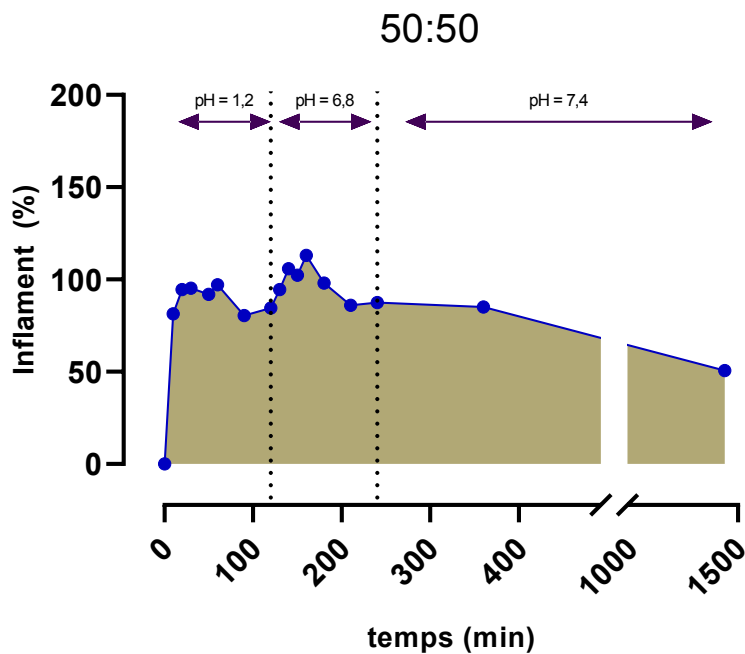


Figura 69: Perfil d'inflament de granes de proporció alginat- chitosan 50:50 amb lisinat d'ibuprofè

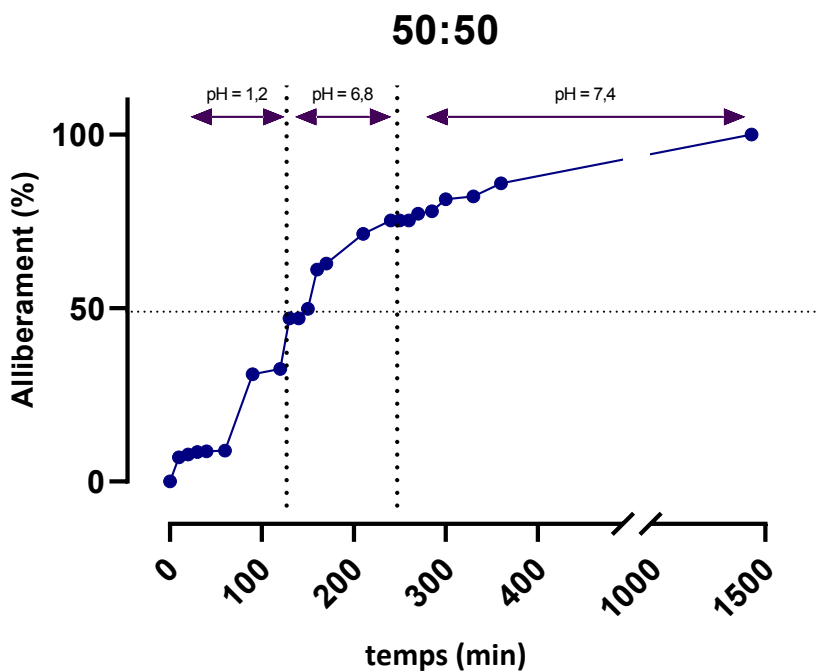


De la mateixa manera que en els casos anteriors es pot observar (figures 68 i 69) com ja des d'un inici hi ha un inflament de base a pH gàstric considerable. Cal dir que la dificultat per l'obtenció d'aquestes granes fa dubtar de si tots els resultats, i per tant, les conclusions que es poden treure són estrictament degudes a la composició de les granes i no tenen a veure també amb el procés d'obtenció, no obstant i en qualsevol cas, aquests resultats venen a corroborar

el que s'ha observat a les granes mixtes anteriors. D'una banda hi ha un inflament inicial a  $\text{pH}=1,2$  que depèn de la quantitat de chitosan contingut a les granes. Es constata també que a partir de  $\text{pH } 6,8$  hi ha un màxim que podria correspondre a la dissolució de l'alginat estructural per després retornar a valors basals o de lenta erosió. En aquest cas, els valors del màxim d'inflament són menys aparents (taula 38), probablement per la menor quantitat d'alginat i per la diferent relació entre els components de la formulació constituent de les granes.

#### 4.6.5.2. Cinètica d'alliberament

Figura 70: Perfil d'alliberament de granes de proporció alginat : chitosan 50:50 amb lisinat d'ibuprofè



De la mateixa manera que en el cas anterior (ratio 60:40) l'alliberament en aquest cas és independent del grau d'inflament. S'observa com a  $\text{pH } 1,2$  es comença a alliberar ibuprofè en una quantitat superior al 30% als 90 minuts, per continuar ja fins al final i a partir de  $\text{pH } 6,8$  amb una cinètica d'ordre zero. Dintre de la hipòtesi plantejada, el que succeiria és que la menor quantitat d'alginat i l'exposició del chitosan al medi àcid degut a l'inflament, contribuiria a una solubilització més ràpida d'aquest, alliberant-ne l'ibuprofè que s'hi troba unit. Tindríem aquí que el fenomen que governaria l'alliberament en medi àcid seria la solubilitat del chitosan, el que ens donaria una primera cinètica d'ordre zero per passar a partir de  $\text{pH } 6,8$  a una segona cinètica d'ordre zero, fins el final de l'experiment a on el fenomen que la governaria seria els canvis d'ionització de l'ibuprofè-chitosan i l'equilibri entre aquests dos components.



Taula 39: Anàlisi de les corbes d'inflament de les granes que contenen lisinat d'ibuprofè

Composició de les granes	Paràmetres d'anàlisi de la corba			
	$t_n$ (min)	$t_{max}$ (min)	$I_{max}$ (%)	AUC
90:10	284	130	64,16	6544
80:20	1440	180	131,9	55436
70:30	1440	300	142,8	161502
60:40	1440	160	173,5	174718
50:50	1440	160	113,0	105345

$t_n$  = Temps del darrer punt mesurable

$t_{max}$  = Temps de màxim inflament

$I_{max}$  = Màxim inflament

AUC = Àrea sota la corba

Figura 71: Valors d'inflament màxim i temps al que s'assoleix en funció de la diferent proporció de polímer

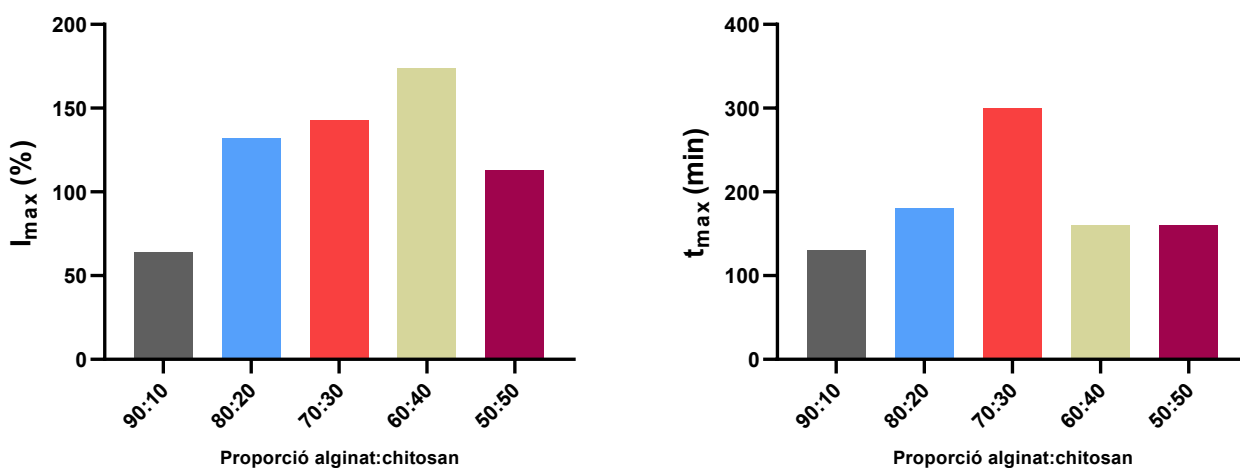
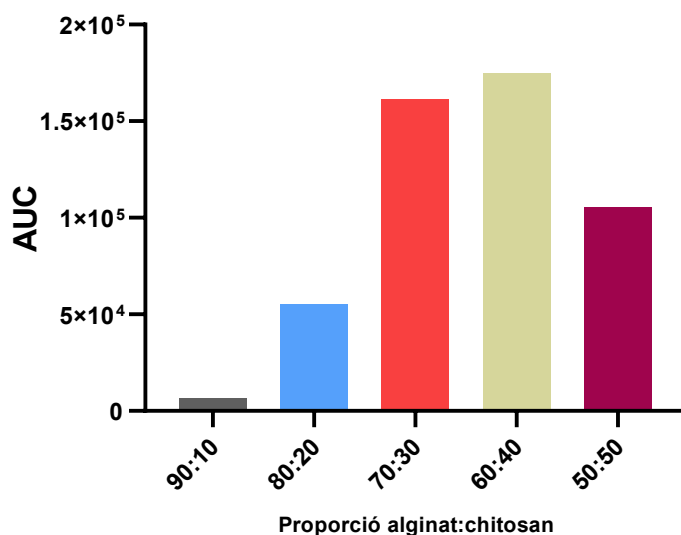


Figura 72: Valors d'àrea sota la corba temps-inflament en funció de la concentració de polímer



**Taula 40:** Resultats de les fraccions d'ibuprofè alliberades en funció del temps. Granes mixtes preparades amb pre-barreja de polímers a diferents proporcions.

Composició de les granes	Temps d'alliberament de la fracció de fàrmac (min)			
	t <sub>25%</sub>	t <sub>50%</sub>	t <sub>75%</sub>	t <sub>90%</sub>
90:10	124	150	205	243
80:20	176	243	297	835
70:30	152	239	299	918
60:40	197	344	673	1133
50:50	82	151	239	676

**Taula 41:** Resultats d'encapsulament

	EE (%)	Q (mg/g)
90:10	89,6	974
80:20	90,1	984
70:30	78,3	762
60:40	75,3	971
50:50	60,4	542

EE = Eficiència d'encapsulament; Q = Contingut de fàrmac

Els continguts de fàrmac a les granes són en general acceptables excepte a les de 50:50 a on també s'obté una eficiència d'encapsulament molt baixa. Aquests valors d'encapsulament són suficients com per permetre la utilització de les granes mixtes en preparats farmacèutics, assolint nivells de dosificació d'utilitat terapèutica.

El procés de producció de les granes mixtes amb el mètode de la prebarreja de polímers proposat, transcorre en termes generals de manera menys eficient que quan es treballa només amb l'alginat. La viscositat i adherència propiciada per la presència del chitosan a la formulació porten, sota les condicions experimentals de preparació assajades, a una precarietat creixent del procediment d'obtenció a mesura que s'incrementa la proporció de chitosan, sent per les granes de 50:50 el pitjor cas que es posa de manifest en la dificultat d'extruir el polímer i d'obtenir les granes d'una manera regular i homogènia. Moltes de les granes no s'arriben a formar el que reverteix en una pèrdua d'ibuprofè que queda al medi i que a la vegada incideix en una pèrdua de la eficiència d'encapsulament. En aquest sentit, la baixa eficiència d'encapsulament guarda relació amb les condicions del procediment de preparació, insuficientment controlat i optimitzat com per dotar-lo de robustesa suficient com per obtenir rendiments elevats a la producció de granes. Per altra banda, si bé amb un millor control dels paràmetres del procés durant l'extrusió potser seria possible una millora de la eficiència d'encapsulament, els valors de fàrmac encapsulat ja indiquen que el procediment i la formulació es troben en un dels límits de l'espai de disseny.

Per altre costat, en resulta un cas diferent amb les granes de proporció 60:40. L'eficiència d'encapsulament no és elevada, però si ho és la concentració de fàrmac que es troba a les granes obtingudes. En aquest sentit, les millores en el procediment de preparació poden conduir a una millora de l'eficiència del procediment en quant a rendiment de granes obtingudes i d'aprofitament del lisinat d'ibuprofè. Tanmateix, per aquestes granes s'obtenen perfils d'alliberament prou estesos en el temps i amb una cinètica apropiada, com per ser aquesta proporció una bona candidata per l'elaboració de formes d'administració d'alliberació modificada, amb possibilitats d'arribar al còlon amb càrrega de fàrmac suficient com per acabar produint un efecte local. Les granes obtingudes, són prou resistents a les variacions de pH com per resistir el trànsit intestinal sense destruir-se ni dissoldre's i per tant, sense alliberar la totalitat del fàrmac, permetent un efecte dual, sistèmic per l'absorció de l'ibuprofè a l'intestí prim i local per l'alliberament a l'intestí gruixut.

El procés de producció de granes amb una elevada proporció de quitosan (> 40% respecte el polímer total) és produït en termes generals d'una manera més precària.

La relació estequiomètrica d'entrecreuaments, és un dels factors que afecta de manera més important l'inflament dels hidrogels, i es defineix com la relació entre el nombre de mols de l'agent d'entrecreuament i els mols d'unitats que es repeteixen en el polímer. Com més alta és aquesta relació, més agent d'entrecreuament s'incorpora a l'estructura de l'hidrogel. Les propietats d'inflament venen modulades per aquesta relació, quant més alt és l'agent d'entrecreuament incorporat menys s'inflen els hidrogels, en tant queda més dificultat el moviment de les cadenes de polímer. No obstant, aquest no és l'únic element que modula la capacitat d'inflament dels hidrogels, l'estructura química hi juga també un paper rellevant. Els hidrogels amb molts grups hidrofílics s'inflen més, comparat amb els que contenen grups hidrofòbics. El pH i la força iònica també són elements que poden modular el grau d'inflament en els hidrogels sensibles a aquests paràmetres del medi, de fet els canvis de pH del medi acaben modulant la hidrofília de l'hidrogel al variar l'estat d'ionització dels polímers que els constitueixen (Peppas i col., 2000).

S'observa, a partir dels resultats obtinguts, com el patró d'inflament en aquest cas no es correspon amb el patró d'alliberament, a diferència del que passa amb les granes d'alginat. Aquest fet pot ser degut a dos factors, d'una banda la baixa solubilitat de l'ibuprofè en condicions àcides. En el cas de les granes només d'alginat, l'inflament és nul i per tant resulta irrellevant si el fàrmac és o no soluble en medi àcid, no obstant, a les granes mixtes s'observa com en medi àcid ja hi ha un cert inflament que varia en funció de la quantitat de quitosan present en la solució d'extrusió, no obstant, tot i aquest inflament, i per tant, absorció d'aigua molt aparent a les granes de proporció 60:40 (figura 65-66), l'alliberament de fàrmac és mínim i no correlacionable amb el grau d'inflament. Es pot afirmar doncs, que l'alliberament del fàrmac en condicions gàstriques és independent del grau d'inflament i és dependent de la pròpia solubilitat del fàrmac o altres factors que no depenen estrictament de l'inflament. Cal destacar també en aquest punt, la possibilitat de què l'ibuprofè i la lisina hagin format estructures i entrecreuaments amb el quitosan i l'alginat dependents del pH extern, és a dir, que les unions formades entre tots els elements ionitzats pugui desfer-se no per inflament, ni per solubilitat, sinó per una diferent distribució dels equilibris de càrregues en funció del pKa de cada component i originades per la variació de pH extern.

Aquesta hipòtesi ve suportada per diverses evidències experimentals:

Les granes que contenen lisinat d'ibuprofè són molt resistents a pHs neutres i alcalins, molt més que les granes placebo. S'evidencia com l'alliberament és més lent en medi pH=7,4, tot i així, s'han fet proves a pH=9 i pH=10 i les granes no es destrueixen com si passa amb les que

són només d'alginat a on aquesta desintegració és produeix de forma ràpida. Tanmateix, les granes mixtes placebo, tot i ser molt més resistents que les granes només d'alginat, en medi pH= 7,4 s'acaben inflant molt ràpidament i desintegrant de manera molt més ràpida que les que contenen lisinat d'ibuprofè.

En canvi, les granes mixtes que contenen el lisinat ibuprofè, resisteixen un nombre superior d'hores i dies (fins a 72h) en medi intestinal (pH=7,4) sense perdre la seva consistència i estructura. Es pot observar a la figura 57, com les granes que contenen menys proporció de chitosan (90:10), la seva resistència és molt baixa, fins el punt que a les 4 hores ja no es poden fer les mesures d'inflament en haver-se pràcticament desintegrat. En el decurs de l'experiment d'alliberament, aquestes granes es van erosionant i inflant de manera infinita fins a trencar-se. No succeeix així amb les granes que contenen més proporció de chitosan (figura 69), granes de proporció 50:50. Observem com en aquest cas, les granes s'inflen pràcticament al màxim en condicions gàstriques i aquesta estructura es va mantenint d'una manera més o menys constant al llarg de l'experiment. En aquest cas, l'alliberament estaria modulats més per fenòmens de dissolució que per fenòmens d'erosió o destrucció de la grana.

Les cinètiques d'inflament dels hidrogels es poden classificar com a Fickianes (controlades per difusió) i no Fickianes (controlades per relaxació). Quan la penetració d'aigua dintre de l'hidrogel succeeix més ràpid que la relaxació, la cinètica d'inflament ve controlada per la difusió (Peppas i col., 2000). D'acord amb aquest autor s'observa com amb les diferents proporcions de polímers estudiades, el patró d'inflament a pH gàstric aparentment varia en la mesura que incorporem més chitosan a la barreja de polímers i per tant tindria un comportament no Fickià. Tenint en consideració que la mesura que es fa de l'inflament és per l'absorció d'aigua al seu interior, amb els experiments realitzats no es discrimina si aquesta entrada d'aigua és correspon a processos Fickians (difusió) o no Fickians (inflament). No obstant, hi ha tota una sèrie d'elements de comportament fisicoquímic com la ionització dels polímers en funció del pH que porten a concloure que aquesta incorporació d'aigua a les matrius es correspon principalment a fenòmens de relaxació de les estructures i per tant, a un procés d'inflament majoritàriament de caràcter no Fickià. En medi aquós, els grups poden ionitzar-se, desenvolupant càrregues fixes en el gel. Com a resultat de les repulsions electrostàtiques s'incrementa la captació de solvent per la xarxa d'hidrogel (Katchalski i Michaeli, 1995; Rubinstein i col., 1996).

A mesura que s'incrementa la proporció de chitosan, l'inflament a pH gàstric és cada cop més ràpid i aparent, mentre que a baixes proporcions de chitosan, aquest és gairebé inexistent. Per pHs superiors (pH 6,8 i 7,4) quan tenim elevades proporcions de chitosan ja partim d'un polímer inflat i per tant, amb elevat contingut d'aigua al seu interior, l'inflament vindrà controlat pels fenòmens de relaxació fins arribar al màxim. Aquests fenòmens es produeixen com a resposta a la variació del pH i en conseqüència, dels equilibris d'espècies ionitzades i no ionitzades segons es pot inferir de l'aplicació de l'equació de Henderson-Hasselbach que relaciona la naturalesa d'ionització de l'entitat química mitjançant el valor de  $pK_a$ , genuí per a cadascuna de les espècies, i el seu grau d'ionització en funció del valor de pH del medi on es troba.

Tot i l'inflament inicial que es va mantenint al llarg de l'experiment, s'observa com l'alliberament no es comença a produir d'una manera aparent fins que es passa a pHs intestinals, però aquest alliberament es va produint d'una manera paulatina fins a les 24 h.

Cal entendre doncs, que l'alliberament és independent de la quantitat d'aigua que accedeix a l'interior de la grana i també del grau de contracció o relaxament de la xarxa polimèrica. Pren força la hipòtesi de què d'una banda, els grups aniònics de l'ibuprofè s'han unit als grups

catiònics del chitosan formant estructures més consistents i en les que l'atrapament no és purament físic, sinó que el fàrmac forma part de la pròpia estructura de la matriu, fet que justificaria l'alliberament més lent i la major resistència de les granes. Per altra banda, cal considerar que l'ibuprofè es troba en forma de sal de lisina. La lisina, en tant que aminoàcid, té propietats anfotèriques, però en aquest cas té dos grups amino, un a cada extrem que poden actuar com a catió i un grup carboxílic que pot actuar com a anió. En aquest sentit, la lisina pot actuar de manera mixta com a element d'entrecruament, tant amb el chitosan com amb l'alginat, donant més consistència a l'estructura i oferint un rang de pHs més ampli en el qual l'estructura es manté sense desintegrar-se.

A la figura 74 podem observar com la incorporació de lisina a les granes modifica el patró d'inflament que es posa de manifest a  $\text{pH} = 7,4$ . Les granes que contenen lisina, a banda de tenir un patró d'inflament diferent respecte les que no en contenen, també s'han mostrat molt més resistents. Durant l'experiment, les granes que no contenen lisina es desintegren amb molta més facilitat durant la seva manipulació per avaluar l'inflament. Les granes amb lisina han estat més consistents i resistents en el temps.

Sota aquesta hipòtesi, es pot considerar que l'ibuprofè està unit al chitosan i l'alliberament ja no ve propiciat només per l'inflament o la mera erosió o dissolució del polímer, sinó per la constant d'equilibri que s'estableixi entre les unions de chitosan-ibuprofè i les seves formes lliures, el que justifica l'alliberament més lent a mesura que les proporcions de chitosan són superiors, en tant hi hauria més ibuprofè unit al chitosan.

La proporció de fàrmac, és quantitativament molt important en relació a la proporció de polímer. Les solucions de polímer utilitzades, contenen una quantitat de polímer total (alginat + chitosan) del 2% p/v a les que hi afegim un 10% d'ibuprofè base i un 7 % de lisina, unes quantitats gens menyspreables en quant a la seva possible funcionalitat estructural i interacció amb els biopolímers de la matriu.

Per la seva banda, l'alginat càlcic format continua tenint un paper rellevant en la formació de les granes ja que aquestes no es formen fins que extruïm les solucions preparades dins el bany de clorur càlcic. Per tant, la geometria i solidesa estructural de les granes està també relacionada amb els encreuaments amb els ions calci.

La peculiar estructura geomètrica de l'alginat que crea cavitats electronegatives a les que els ions de calci hi encaixen de manera molt eficient, fa que els ions calci a la pràctica, no tinguin competència per aquestes cavitats que són les que conformen l'estructura esfèrica bàsica de la grana. Tanmateix, les cadenes polimèriques ja siguin d'alginat o chitosan exhibeixen càrregues fixes, és a dir carents de mobilitat, limitació que no tenen els ions que es poden moure i intercanviar-se de manera molt més ràpida i eficient (Flory 1953).

S'observa que a tots els efectes, les granes mixtes amb un millor comportament són les de 60:40. La seva progressivitat d'inflament i alliberament és la que es mostra més eficient. També cal dir que aquestes granes (60:40) suposen a la pràctica el límit d'eficiència del procés de preparació. En efecte, a mesura que afegim més chitosan, les solucions esdevenen cada cop més viscoses, fins el punt de resultar difícil i poc eficient la seva agitació. Tanmateix, la mateixa viscositat dificulta el procés d'extrusió i per altra banda, la menor quantitat d'alginat dificulta la formació de les granes al formar-se menys entrecruaments d'alginat amb el calci, base estructural de les granes, el que suposa pèrdues d'ibuprofè i rendiments en general més baixos.

Si ens fixem en les granes de 50:50 (figures 69 i 70), es pot observar com el perfil d'inflament és diferent i també el d'alliberament. Durant l'obtenció d'aquestes granes es mostren moltes dificultats, d'una banda d'agitació, d'altra banda d'extrusió i formació, el que fa tot plegat que l'obtenció de les granes no tingui la consistència dels processos anteriors.

#### 4.6.6. Influència de la lisina

Per estudiar les interaccions de la lisina amb els polímers i la seva influència en el comportament de les matrius mixtes d'alginat-chitosan, en els gràfics següents es mostra el patró d'inflament a pH gàstric i a pH intestinal de granes en les que només s'ha encapsulat lisina.

Figura 73: Cinètica d'inflament a pH =1,2 de granes d'alginat-chitosan de proporció 70:30 amb lisina encapsulada

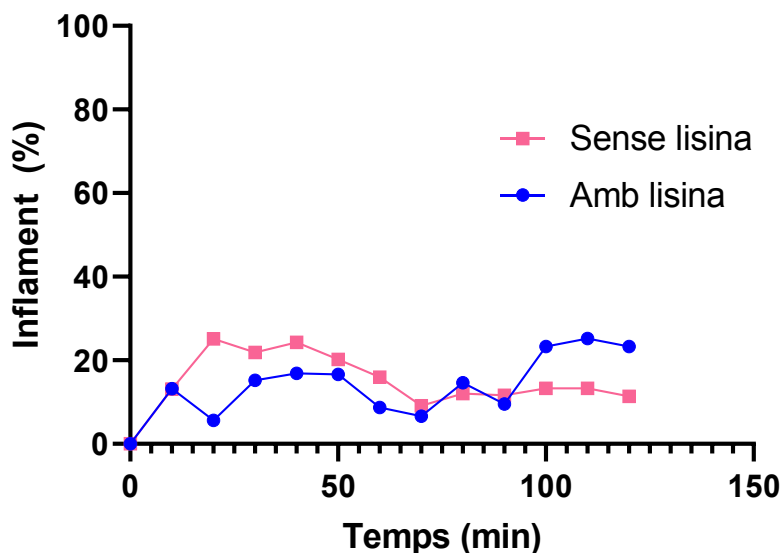
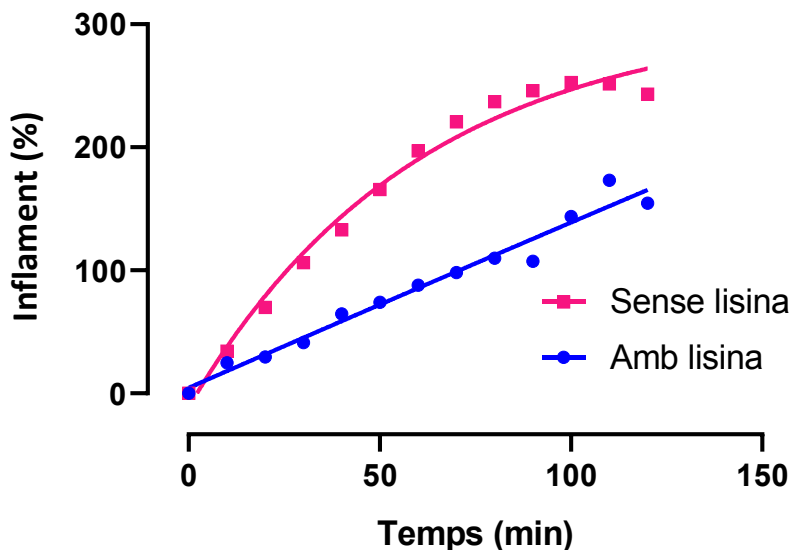


Figura 74: Cinètica d'inflament a pH =7,4 de granes d'alginat-chitosan de proporció 70:30 amb lisina encapsulada



#### 4.6.7. Físicoquímica del comportament de les matrius polimèriques

De tot el que s'ha exposat fins el moment en aquest treball, així com el resultat de les observacions experimentals, pren força la teoria d'una interacció polielectrolítica múltiple entre els diferents elements que constitueixen les granes, inclòs el propi principi actiu.

Quan es parla de microencapsulació, és comú la idea d'atrapament físic dintre d'una estructura o matriu com el que succeeix en una càpsula convencional on el fàrmac queda confinat dintre d'un contenidor (càpsula). A les microcàpsules o nanocàpsules també pot succeir el mateix, per exemple amb els liposomes on les micel·les contindrien al seu interior el fàrmac encapsulat, o bé en aquells fàrmacs no solubles que es troben dispersats en forma sòlida a les solucions a extrusionar, quedant literalment confinats entre els entramats polimèrics que configuren les malles d'un hidrogel.

No obstant, quan es tracta de fàrmacs encapsulats a elevades proporcions, com és el cas del present treball, quan aquests són totalment solubles a les solucions de polímer que s'extruiran per conformar les matrius i quan s'utilitzen excipients i principis actius amb capacitat d'ionitzar-se, s'han de contemplar les interaccions que hi poden haver entre tots aquests elements, més quan s'estudien formulacions d'alliberament modificat, el que vol dir que des de la seva administració fins el total alliberament del fàrmac s'han produït canvis en el medi derivats del trànsit pel tracte gastrointestinal, passant per pHs molt diferents, des de pH 1,2 gàstric fins a pH 7,4 intestinal. Els canvis de pH del medi extern signifiquen alteració de la distribució de càrregues en els elements susceptibles i ionitzables en funció del seu pKa.

En aquest treball, tal i com s'ha mostrat a la taula 38 d'interaccions iòniques, els elements a considerar són tots els que conformen les granes i el paràmetre a tenir present el seu pKa, en tant és l'element que ens permet conèixer l'estat d'ionització de cada element i en conseqüència com pot arribar a interaccionar amb la resta en funció el pH del medi extern.

##### 4.6.7.1 Valor de pKa de les diferents entitats químiques que conformen les granes

Ibuprofè:  $pK_a = 4,9$

Lisina:  $pK_{a1} = 2,18$ ;  $pK_{a2} = 8,95$ ;  $pK_{a3} = 10,33$

Chitosan:  $pK_a = 6,5$

Alginat:  $pK_a = 3,38$  residus d'àcid manurònic;  $pK_a = 3,65$  residus d'àcid gularònic

##### 4.6.7.2. Estat d'ionització en funció del pH

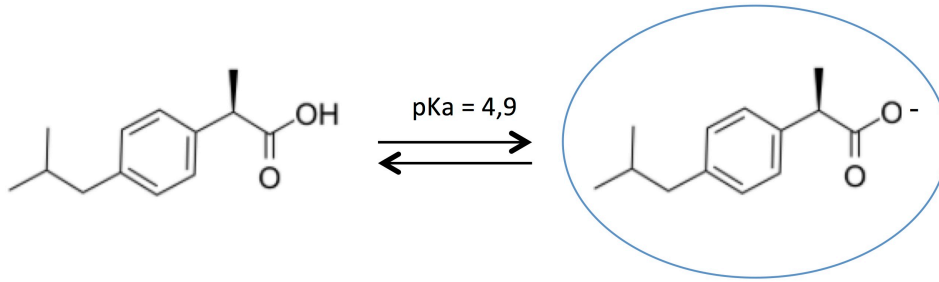
Considerant els valors de pKa i d'acord amb la equació de Henderson-Hasselbach:

$$pH = pKa + \log \frac{[base]}{[àcid]}$$

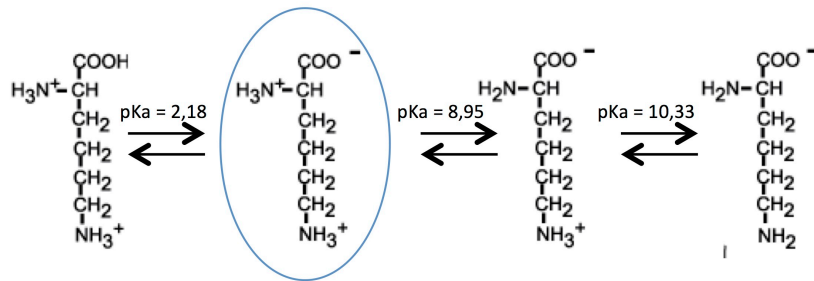
En solució a pH = 5 - 5,5 (pH de la solució a extrusionar) els diferents components és trobaran majoritàriament en la forma encerclada a la figura 75.

**Figura 75:** Estats d'ionització i pKas. Encerclades les formes majoritàries al pH de treball. pH > 5

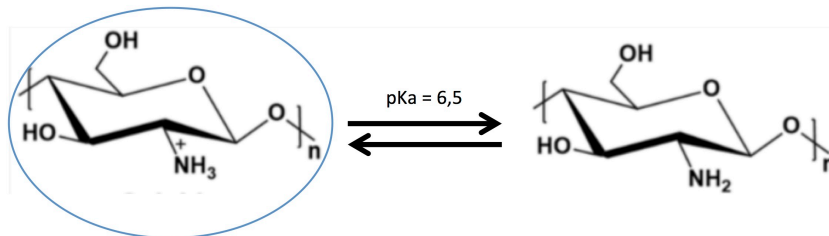
**Ibuprofè**



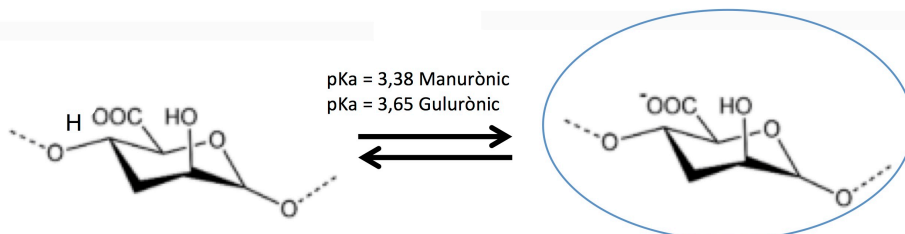
**Lisina**



**Chitosan**



**Alginat**





Així, en base al pH de la barreja d'extrusió que conté els polímers i el principi actiu (a pH = 5 - 5,5), tots els components es trobaran de forma majoritària en la seva forma ionitzada, per tant activada per interaccionar amb components de la fórmula de signe iònic contrari.

A continuació es mostren els valors relatius de les espècies ionitzades i no ionitzades que es poden obtenir a la solució a extrusionar dintre del rang de pH de treball:

Ibuprofè:

$$\log \frac{[\text{Forma ionitzada}]}{[\text{Forma no ionitzada}]} = [0,1 - 0,6]$$

Lisina:

$$\log \frac{[\text{Forma mixta catiònica aniònica}]}{[\text{Forma catiònica}]} = [2,8 - 3,32]$$

Chitosan:

$$\log \frac{[\text{Forma no ionitzada}]}{[\text{Forma ionitzada}]} = [-1,5 - -1,0]$$

Alginat:

$$\log \frac{[\text{Forma ionitzada}]}{[\text{Forma no ionitzada}]} = [1,0 - 1,5]$$

De l'anàlisi de valors obtinguts a partir de la equació de Henderson-Hasselbach, es pot observar com la relació de formes activades per entrecreuar-se de chitosan i d'alginat respecte les formes no activades seran similars al pH de la solució, el que justifica el rang de pH seleccionat de 5,5 com a adequat per afavorir les unions alginat – chitosan.

Un cop més, es subratlla que les unitats d'àcid gulurònic (Bloc G) de l'alginat formen cavitats geomètricament específiques i electronegatives amb una gran afinitat pels cations divalents i més específicament pels ions de calci. Per tant, tenint en compte aquesta afinitat i que estequiomètricament els ions de calci hi són en excés al medi, una part de l'alginat quedarà saturada pels ions calci que és el que conferirà la base estructural de les microesferes.

Quedaran doncs, lliures per interaccionar les subunitats negatives d'àcid manurònic (Bloc M) que hauran de competir amb els grups catiònics disponibles del chitosan però també els de la lisina que es veuran afavorits estequiomètricament al trobar-se en una major proporció al medi en relació al chitosan.

Per altra banda, per les càrregues positives del chitosan hauran de competir, l'alginat, l'ibuprofè i també la lisina. En aquest sentit l'ibuprofè i la lisina s'hi troben en superioritat estequiomètrica de manera respectiva i per aquest ordre respecte les subunitats d'àcid manurònic disponibles. Per tant, és d'esperar que es formin estructures amb el chitosan i l'ibuprofè i amb el chitosan i la lisina que a la vegada s'uniria a l'alginat proporcionant d'una banda, estructures més resistents a la variació de pH i d'altra banda, perfils d'alliberament d'ordre zero pel que respecta a l'ibuprofè que estaria en part unit al chitosan.

Pel que fa a l'ibuprofè, el fet de treballar a un pH molt proper al seu  $pK_a$  s'ha de considerar l'existència d'una igualtat de les espècies ionitzades respecte les no ionitzades i potser prengui rellevància l'ajust del pH a un valor més allunyat del valor de  $pK_a$  dintre del rang de pH de treball establert, és a dir, que tot i treballar dintre del rang de pH entre 5,0 i 5,5, potser hi hagi diferències pel fet de situar-nos a pH proper a pH=5,0 o bé a pH =5,5. Aquest aspecte no ha estat estudiat però podria explicar les diferències de comportament per les granes de proporcions 70:30 per exemple pel que fa a l'inflament basal a pH=1,2 molt similar a les granes de 80:20 i molt diferent de les granes de proporcions 60:40.

#### 4.6.7.3. Anàlisi de les corbes d'alliberament. Models matemàtics i mecànica dels hidrogels

Des d'un punt de vista de l'anàlisi de les corbes corresponents a les cinètiques d'alliberament, s'ha determinat a quin model matemàtic d'alliberament s'ajusten. S'ha considerat l'anàlisi per trams, d'una banda el corresponent al pH gàstric (pH = 1,2) i per altra banda el tram corresponent al pH intestinal, és a dir ajuntant els valors d'alliberament obtinguts a pH = 6,8 i els obtinguts a pH = 7,4.

Per tal de determinar si el procés d'alliberament del fàrmac ve regit per processos d'inflament o de difusió, és a dir fickians o no fickians, s'ha avaluat el model descrit per Ritger-Peppas (1987) definit per la equació:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

a on:

- $\frac{M_t}{M_\infty}$  : És la quantitat relativa de fàrmac alliberat a un temps determinat (t)  
 k : És la constant de proporcionalitat  
 n : És l'exponent difusional  
 t : La variable independent t

Com ja s'ha introduït a l'apartat 4.4.5.4., mitjançant aquest model és pot determinar si l'alliberament del fàrmac està controlat per processos de difusió o bé d'inflament. Quan l'alliberament depèn de processos d'inflament, els resultats s'ajusten a aquest model, considerant un coeficient difusional  $n = 1$  i l'alliberament és independent de la concentració, mentre que quan els resultats s'ajusten al model amb coeficient difusional  $n = 0,5$ , l'alliberament és dependent de la concentració i està controlat per processos de difusió o fickians. Quan els resultats s'ajusten a valors intermitjos de  $n$  entre 0,5 i 1 el procés d'alliberament estaria regit per ambdós processos o per altres tipus de processos diferents. L'ajust s'ha de fer, segons els propis autors, considerant només la fracció corresponent al 60% inicial de l'alliberament, tot i que en alguns estudis que utilitzen comprimits basats en hidroxipropil metil cel·lulosa el model descriu la totalitat del procés d'alliberament (Rinaki i col., 2003).

L'anàlisi dels resultat d'alliberament mostra que a nivell intestinal aquest segueix un model no fickià o controlat per l'inflament per les matrius que tenen més quantitat d'alginat (90:10), ( $R^2 = 0,978$ ) mentre que a mesura que es va incrementant la quantitat de chitosan, els resultats s'aparten més d'aquest model i per tant, l'alliberament del lisinat d'ibuprofè es produiria per fenòmens no regits per l'inflament. No obstant, quan s'aplica el model amb un coeficient difusional de 0,5 s'observa com els resultats d'una manera general s'acosten més a aquest model amb valors de  $R^2 > 0,800$  per tots els grups inclòs el de 90:10 i exceptuant el de 50:50.

Aquests resultats indiquen que excepte per la composició 90:10, l'alliberament és independent del grau d'inflament. De fet, aquesta afirmació queda constatada quan es relaciona l'inflament amb l'alliberament. En efecte, per exemple per les granes de 60:40 s'observa com es produeix un alliberament més lent que a les altres granes, tot i assolir-se nivells d'inflament més elevats i durant més temps (taules 39 i 40).

Si s'aplica regressió lineal a la part de la corba que transcorre a pH=6,4 en general trobem valors que s'ajusten més a aquest model en gairebé tots els casos, el que ens indicaria que les cinètiques d'alliberament segueixen un model cinètic proper a l'ordre zero en aquest tram. Les cinètiques d'alliberament d'ordre zero són típiques dels sistemes controlats químicament (Peppas i col., 2000). No obstant, en el tram de pH = 7,4 els resultats s'allunyen en general del model d'ordre zero, en especial per les granes de proporcions 80:20 i 70:30. Aquest allunyament es fa més evident encara si s'avaluen conjuntament els resultats de pH=6,8 i els de 7,4, pel que es probable que l'alliberament s'hagi d'explicar amb més d'un model, és a dir que en funció del pH i del moment de l'alliberament predomini un tipus de fenomen o altre.

**Taula 42:** Equacions obtingudes del tractament per regressió lineal dels resultats de pH 6,8.

Composició de les granes	Equació de la recta	Pendent	Intercepció	R <sup>2</sup>
90:10	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0231t + 1,407$	0,0231	1,407	0,9932
80:20	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0121t + 0,727$	0,0121	0,727	0,9856
70:30	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0434t + 2,567$	0,0434	2,567	0,8969
60:40	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0182t + 1,077$	0,0182	1,077	0,9647
50:50	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,0515t + 3,046$	0,0515	3,046	0,8692

Els càlculs s'han realitzat considerant només els trams de pH=6,8 de cada cinètica i com a temps zero de la recta el corresponent als 120 minuts de la cinètica, moment del canvi a pH 6,8

Pel tram de la cinètica corresponent a l'alliberament intestinal complet, és a dir, la unió dels resultats d'alliberament de pH=6,8 i els obtinguts a pH=7,4 s'han provat diferents models matemàtics i s'obtenen bons resultats d'ajustament per totes les corbes excepte la de 90:10 amb el model definit per la següent equació:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{B_{max} \cdot t}{K_d + t} + NS \cdot t + b$$

Aquesta equació és una adaptació de la utilitzada per modelitzar les corbes d'unió de radiofàrmacs a receptors específics (Swillens, 1995).

$\frac{M_t}{M_\infty}$  : És la quantitat relativa de fàrmac alliberat a un temps determinat (t)

$B_{max}$  : És la quantitat màxima relativa alliberada

$K_d$  : És la constant de dissociació a l'equilibri (expressada en minuts)

t : La variable independent t

NS : És la pendent de l'alliberament no específica

b : La proporció de fàrmac ja alliberat a t=0, és a dir durant la fase a pH gàstric.

**Taula 43:** Equacions obtingues per regressió no lineal del tractament de la corba d'alliberament a pHs intestinals pH = 6,8 i 7,4.

Composició de les granes	Equació	R <sup>2</sup>	b
90:10	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{B_{max} \cdot t}{Kd + t} + NS \cdot t + b$	Paràmetres de l'equació no calculats per la impossibilitat d'ajustar el model als resultats obtinguts	
80:20	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{941t}{1213 + t} - 0,300t + 5,852$	0,9355	5,852
70:30	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{144,2t}{226,0 + t} - 0,0246t + 8,913$	0,9739	8,913
60:40	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{212,5t}{737,4 + t} - 0,0313t + 4,972$	0,9934	4,972
50:50	$\frac{M_t}{M_\infty} = \frac{60,7t}{61,26 + t} + 0,006t + 33,93$	0,9854	33,93

Els càlculs s'han realitzat considerant només els trams intestinals (pH=6,8 + pH=7,4) de cada cinètica i com a temps zero de la recta el corresponent als 120 minuts de la cinètica, moment del canvi a pH 6,8

Els ajustos per regressió no lineal mitjançant el software Prism Graphpad® no han estat possibles per la cinètica de les granes de proporcions 90:10 i s'ha mostrat ambigu per les de 80:20. Es pot observar com a mesura que incrementa la proporció de quitosan, el model s'ajusta més als resultats, no obstant, s'ha de considerar el valor d'aquest model com a merament descriptiu del comportament de la cinètica d'alliberament i no amb un valor predictiu fins poder ser contrastat amb un major nombre d'experiments. Tot i així, permet suportar el fet que la cinètica d'alliberament del lisinat d'ibuprofè a les granes que contenen quitosan no està controlat per un sol fenomen i suggereix la unió del fàrmac a la matriu i la possible influència d'una constant de dissociació iònica entre el fàrmac i la matriu, el que podria significar l'existència d'una interacció química que en definitiva controlaria una part important de l'alliberament.

Aquest comportament vindria modulats per la presència del quitosan a la formulació, ja que les granes amb menor proporció d'aquest biopolímer tenen un comportament modulats majoritàriament pels fenòmens d'inflament i difusió. El model també té en compte el grau d'alliberament assolit en la fase gàstrica amb el valor b.

En aquest sentit, el model no parteix de zero ja que el temps zero en el model correspon a t = 120 min de l'alliberament corresponent al període de trànsit gàstric (pH = 1,2), i per tant, ja hi ha hagut un cert alliberament, important a la formulació que conté més proporció de quitosan (50:50).

Es pot constatar a partir dels elements discutits fins el moment la multiplicitat de possibilitats d'interaccions iòniques que es poden produir i per tant, la complexitat i dificultat de poder teoritzar sobre les mateixes des d'un punt de vista fisicoquímic i establir-ne models matemàtics apropiats per explicar quins són els fenòmens que succeeixen.

Paul Flory (1953), va ser dels primers en explicar el comportament d'inflament dels polímers iònics. En la seva teoria prenen importància els equilibris de càrregues en el si del polímer i de les matrius que aquest forma, així com les forces electrostàtiques que se'n deriven i els fenòmens d'atracció repulsió, tal com també s'ha anat considerant al llarg de la discussió del present treball. De fet, Flory elabora un model per quantificar les interaccions en funció de les diferències de potencial entre l'interior i l'exterior de les matrius, o el que ve a ser el mateix, entre la matriu i el medi on es troba. En els seus postulats, fa referència també a la generació d'una pressió osmòtica interna, en tant la matriu de polímer es comporta com una membrana i per tant, ha de satisfer l'equilibri de Donnan generant forces de tipus osmòtic. Segons Flory, la mobilitat d'ions és més gran a l'interior de la matriu que a l'exterior degut a què hi ha tota una sèrie de càrregues que estan fixades pel polímer i per tant, sense mobilitat, essent els ions els que poden circular lliurement per la matriu al no estar fixats. Sota aquesta teoria, en el cas dels gels d'alginat les càrregues fixes són els grups carboxílics mentre que la mobilitat iònica es produeix a mesura que s'incrementa la densitat de càrrega negativa per variacions de pH del medi. La mobilitat iònica es produeix quan ions del medi poden circular i canviar-se per ions calci, quan les repulsions intercatenàries són més grans i es generen espais de geometria modificada que deixen de ser específics pel calci i en els quals hi poden competir altres ions del medi. En aquestes condicions i seguint amb els postulats de Flory, la pressió osmòtica esdevé molt més gran a l'interior que a l'exterior. En aquest context, es pot parlar de diferències de potencial de membrana originades per les diferències de càrrega entre l'interior del polímer i l'exterior.

Si es parteix d'aquesta teoria, quan tenim el polímer estabilitzat de manera no exclusiva per ions, com seria el cas de les matrius d'alginat amb ions calci, sinó que la estabilització es produeix amb un altre polímer formant xarxes polimèriques interpenetrants, en aquest cas amb el chitosan, és evident que la mobilitat de càrregues ja no pot ser la mateixa per una qüestió purament estèrica, en tant no es pot moure de la mateixa manera una macromolècula com el chitosan que un ió com el calci del medi de gelificació o el sodi o potassi presents en el medi de dissolució. En aquest sentit, les càrregues fixes de les que parla Flory en el seu tractat sobre la química dels polímers (1953), no només tenen el signe negatiu dels grups carboxilat que aporta l'alginat, sinó també el signe positiu dels grups protonats del chitosan. Si bé els canvis de pH externs poden produir variacions de l'estructura, aquesta s'ha d'entendre més com a canvis en la distribució de nòduls d'unió entre una cadena de polímer i una altra, més que com a mobilitat d'aquestes macromolècules.

Si més no, des d'un punt de vista teòric, sembla raonable pensar que una limitació en la mobilitat de càrregues en el si del polímer contribueix a disposar d'estructures més estables i resistents a l'inflament i a les variacions iòniques del medi motivades en aquest cas per les variacions de pH del medi. Les posicions fixes que interaccionen no són susceptibles de bescanviar-se amb els ions presents en el medi de dissolució, com si que succeeix amb les posicions ocupades per ions de calci. Aquesta seria una de les diferències entre les matrius d'alginat entrecruades només amb ions calci i les estabilitzades amb un polímer com el chitosan. No obstant, quan es parla d'estructures mixtes d'alginat-chitosan s'ha de considerar que aquestes estructures polimèriques no són pures, en tant també estan formades per unions amb el calci i per tant una certa mobilitat iònica sí que hi és explicant l'inflament per intercanvi d'ions calci amb ions sodi i potassi del medi. Tanmateix, l'equilibri resulta més complex encara quan s'hi incorpora una gran quantitat de càrregues procedents de l'ibuprofè i de la lisina.

Aquestes molècules, tot i de dimensions menors que les cadenes de polímer, no són ions i per tant, el seu moviment dintre l'entramat polimèric es veurà també limitat, actuant a la vegada per aquest motiu com a estabilitzants de l'estructura de la matriu, el que explicaria els alliberaments molt més lents que en les matrius només a base d'alginat i la major resistència de les granes a la erosió.

Altres autors (Katchanski, 1949; Katchanski i col., 1955, Peppas i col., 2000), coincideixen en la importància de formular les matrius d'hidrogel que responen a canvis de pH amb polímers que tinguin grups ionitzables fixes. Aquesta és la manera de variar la hidrofília de les matrius i per tant, els seu comportament en el medi aquós en funció del pH extern. En la mesura que es varia el pH es produeix un increment en el grau d'ionització i per tant, un increment en el nombre de càrregues fixes, el que reverteix no només en una major hidrofília, sinó també en un increment de les repulsions electrostàtiques. En el cas de l'alginat, aquest fenomen anirà en augment a mesura que s'incrementa el pH i per tant a mesura que es disposi d'un nombre major de grups carboxilat, mentre que pel chitosan serà a la inversa, a mesura que disminueix el pH del medi els grup amino s'ionitzaran. Ja s'ha discutit la importància d'establir un equilibri d'ionització des d'un punt de vista quantitatiu, és a dir estequiomètric, durant la preparació de les granes, amb un control sobre el pH de preparació, no obstant, aquest equilibri i les proporcions finals de polímer d'un signe i de l'altre, és a dir d'alginat i chitosan no només juguen un paper important des d'un punt de vista farmacotècnic per la preparació i estabilització de les estructures, sinó també en el posterior comportament i resposta al pH extern d'aquestes estructures.

Des d'un punt de vista termodinàmic, Maurice Huggins de manera contemporània a Flory també va estudiar models per explicar el comportament de transició de fase dels polímers, de fet, per la seva coincidència en el temps es parla de la teoria de Flory-Huggins. D'acord amb la teoria de Flory-Huggins, el canvi total d'energia lliure en els gels polimèrics que mostren un comportament de transició de fase són la suma de tres termes d'energia lliure que es poden calcular individualment: L'energia lliure del procés de barreja, l'energia lliure de l'efecte d'ionització i l'elasticitat. En referència a l'elasticitat, es calcula tenint en compte la constant de Boltzman, el volum de la xarxa polimèrica a l'equilibri, el volum molar del solvent, la interacció solvent-polímer i la densitat d'encreuaments.

Tanaka i col., 1977 van desenvolupar models específics per explicar el comportament dels gels basats en el punt crític de transició, és a dir, el punt en el que es produeix la transició de continua a discontinua. Aquests models també suggereixen que el comportament de transició dels gels és fortament dependent del grau de ionització.

No obstant, aquests models són difícils d'avaluar quantitativament (Hirotsu i col., 1987) i estudis previs ja suggereixen que durant l'inflament les cadenes adjacents pateixen canvis menors o resten completament inalterades i per tant, les deformacions de la xarxa polimèrica poden ser absorbides per les cadenes de polímer que tenen una certa capacitat elàstica i de fet serien els que absorbirien la majoria dels canvis estructurals. En base a aquestes consideracions els models introdueixen un factor previ que contempla el fet que durant el procés d'inflament només una fracció de les cadenes polimèriques està afectada per la deformació (Navarro-Verdugo i col., 2011). En funció de les interaccions que es formin de manera quantitativa i qualitativa entre l'alginat i el chitosan i els altres elements estructurals que conformen les matrius mixtes obtingudes, les deformacions que es produeixen són diferents en magnitud i en el temps com es desprèn de les variables analitzades a partir de les corbes d'inflament (taula 39).

Altres autors han aprofundit en l'efecte de les interaccions electrostàtiques i la rigidesa dels fenòmens de condensació del polielectròlit i el contraió. S'han desenvolupat molts models multifísics amb aproximacions acceptables a les transicions de volum de fase. Els models multifísics es basen en l'ajustament d'equacions complexes com la de convecció – difusió de concentracions iòniques, l'equació de Poisson del potencial elèctric, equacions termodinàmiques de l'equilibri d'inflament i la formulació Poisson–Nerst-Plank pels hidrogels sensibles al pH que poden ajustar-se a equacions d'equilibri mecànic no lineals quan s'observen grans deformacions. Així, les equacions que descriuen els fenòmens de contracció i inflament per canvis de pH del medi en els hidrogels sensibles al pH poden ajustar-se a equacions diferencials parcials que consideren els efectes dels camps químics, elèctrics i mecànics caracteritzats per la no linealitat. Aquests models són complexes i per tant difícils de resoldre mitjançant mètodes numèrics convencionals, per tant a la pràctica la seva aplicació és limitada (Navarro-Verdugo i col., 2011).

Peppas i col., (2000) prenen en consideració els fenòmens de transició de fase que succeeixen en els polímers quan les matrius entren en contacte amb els fluids biològics, i comencen a inflar-se, moment en el que es comencen a diferenciar dues fases en el polímer. Una fase interna o cristal·lina, i la fase gomosa inflada. Clarament, l'alliberament del fàrmac es controlat per la velocitat i la posició de la interfase cristall-goma en tant el fàrmac no difon de la regió cristal·lina del polímer. A la interfase cristall-goma succeeix un fenomen de cabdal importància que afecta l'alliberament del fàrmac. Tot i les propostes de models per diferents autors (Korsmeyer i col., 1986 ; Lusting i col., 1990; Peppas 2000) ells mateixos posen de manifest les dificultats d'establir models i la rigurositat matemàtica necessària per modelitzar el comportament d'aquest tipus de reaccions degut als problemes de la mobilitat dels límits de deformació. Nombrosos problemes en mecànica impliquen un domini deformable, entre aquests s'hi troben el fluxes a través de medis porosos deformables, els fluxes que impliquen l'erosió. La presència d'un límit mòbil presenta desafiaments considerables a l'hora de modelar i comprendre la dinàmica del sistema implícit. El límit mòbil sovint introdueix no linealitats que requereixen d'un tractament matemàtic especial.

#### 4.6.7.4. La funció sigmoïdal de Boltzman

Es pot preveure la dificultat que representa establir un model matemàtic que expliqui el comportament de fenòmens complexes i multifactorials com els que poden regir les matrius mixtes d'alginat i chitosan obtingudes en el present treball i més quan s'introdueixen altres elements iònics d'interacció a proporcions elevades com els ions calci de càrrega positiva, la lisina amb càrrega positiva i negativa i l'ibuprofè amb càrrega negativa. Els equilibris que poden establir-se, són difícils de preveure per la possible interacció de tots els components entre ells i per tant, també difícils de modelitzar des d'un punt de vista paramètric, sistematitzat i amb les variables que hi intervenen sota control. No obstant, encara és possible modelitzar el comportament dels gels pel que fa a l'alliberament des d'un punt de vista empíric. Els canvis observables a nivell macroscòpic obeeixen a canvis a nivell microscòpic segons els postulats de la mecànica estadística.

Una anàlisi de dades experimentals i models matemàtics descrits a la literatura demostren que els fenòmens de transició de fase segueixen patrons similars respecte al seu comportament físic i geomètric. Per exemple, a les transicions de fase sovint s'observen patrons sigmoïdals i punts d'inflexió. Tanmateix, si els canvis de transició es produeixen en un punt d'inflexió, el punt d'inflexió esdevé un punt crític i en aquest sentit la funció sigmoïdal de Boltzman descrita l'any 1879 pot ser un bon punt de partida per la predicció dels fenòmens de transició de fase (Navarro-Verdugo i col., 2011; Reséndiz- Muñoz i col., 2017). Tanmateix, la funció de Boltzman

descriu l'activació dels canals iònics voltatge dependents, tot i que els fenòmens de despolarització no funcionen de la mateixa manera que el que succeeix a les matrius polimèriques, si que impliquen un intercanvi i mobilitat de càrregues i l'establiment d'uns equilibris entre l'interior i l'exterior de les membranes segons Flory (1953).

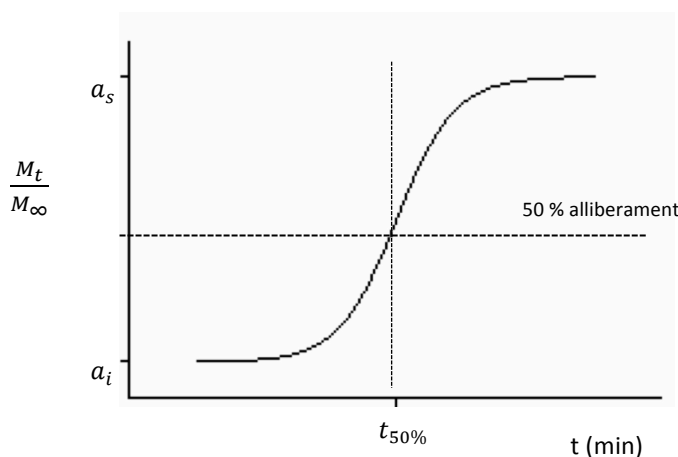
La funció sigmoïdal de Boltzmann s'ha utilitzat per descriure els comportaments mostrats quan un factor determinat promou una transició de fases d'un estat d'equilibri a un altre i així explicar fenòmens de tipus biològic (Sevcik, 2017), com corbes de creixement bacterià o l'efecte d'un fàrmac sobre els receptors, així com també fenòmens fisicoquímics diversos, en el camp dels polímers, l'estudi dels canvis de viscositat en funció del temps durant els processos d'entrecreuament, l'estudi de la concentració micel·lar crítica de surfactant o per l'estimació de la temperatura de màxima interacció (estat de transició) durant la divisió de la unió carboni-iodo a partir del iodur d'etil sobre la superfície de pal·ladi (III) (Rahaman i col., 2017).

L'alliberament del lisinat d'ibuprofè a partir de matrius que responen al pH constituïdes per biopolímers com l'alginat i el chitosan també obeeixen a fenòmens d'aquestes característiques. Es passa d'un estat d'equilibri quan es troben a un determinat pH fins que una variació d'aquest pH promou la transició cap a un altre estat. Es passa d'un estat de contracció del polímer a un estat de relaxació màxima amb un punt d'inflexió central. La funció de Boltzmann pot explicar aquests tipus de comportament.

A la taula 44 es mostren els resultats obtinguts de l'anàlisi dels resultats en relació a la funció sigmoïdal de Boltzmann representada per la següent equació:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = a_i + \frac{a_s - a_i}{1 + e^{\frac{t_{50\%} - t}{k}}}$$

**Figura 76:** Representació gràfica de la funció sigmoïdal de Boltzmann



El valor  $k$  és un coeficient que descriu el comportament de la corba del procés durant la transició i identifica la continuïtat o discontinuïtat del procés (Reséndiz – Muñoz i col. 2017)



**Taula 44:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes mixtes d'alginat- chitosan a diferents proporcions i aplicant el model de funció sigmoïdal de Boltzmann

Composició de les granes	Equació	R <sup>2</sup>
90:10	$\frac{M_t}{M_\infty} = 6,71 + \frac{95,89}{1 + e^{\frac{162,1-t}{38,6}}}$	0,9872
80:20	$\frac{M_t}{M_\infty} = 4,88 + \frac{87,76}{1 + e^{\frac{229,6-t}{43,28}}}$	0,9711
70:30	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,19 + \frac{90,56}{1 + e^{\frac{221,8-t}{63,01}}}$	0,9812
60:40	$\frac{M_t}{M_\infty} = -17,32 + \frac{115,8}{1 + e^{\frac{312,7-t}{176,5}}}$	0,9804
50:50	$\frac{M_t}{M_\infty} = -31,78 + \frac{125,33}{1 + e^{\frac{94,46-t}{85,98}}}$	0,9820

De l'anàlisi de dades experimentals sota aquest model, es pot observar com aquestes s'ajusten força al model, si més no amb coeficients R<sup>2</sup> inclús superiors als altres models assajats. La gran diferència entre aquest model i els altres aplicats és que s'han pogut utilitzar les dades de la corba d'alliberament completa i no per trams com en els models anteriors, el que suposa un avantatge, en tant permet modelitzar el que succeeix a tot l'experiment d'alliberament i en els diferents pHs des de temps zero fins les 24 hores.

A diferència dels altres models, es pot observar també com el model de funció sigmoïdal de Boltzmann permet explicar els resultats de les diferents proporcions d'alginat-chitosan. S'obtenen valors equivalents de R<sup>2</sup> en totes les proporcions, el que li dona un valor predictiu d'alliberament en funció del temps més fiable i independent de la composició de la formulació i dels mecanismes implicats a l'alliberament que poden afectar altres models assajats com el de Ritger-Peppas, depenent de si l'alliberament està controlat per un procés Fickià o no Fickià.

La funció obtinguda dona informació sobre com es produeix l'alliberament, d'una banda al numerador de l'exponent (*e*) hi ha el valor de *t*<sub>50%</sub>, és a dir, el moment en què s'ha produït el 50% de l'alliberament. Per altra banda, al denominador hi ha la representació del comportament del pendent (*k*). Com més gran és aquest valor, més aplanada és la corba i per tant, més lent és l'alliberament. Podem observar també, com a mesura que incrementa la quantitat de chitosan disminueix el valor que el model ens dona pel paràmetre *a<sub>i</sub>*. Els valors de *a<sub>i</sub>* i *a<sub>f</sub>* correspondrien respectivament als estats d'equilibri previ a la transició i un cop finalitzada aquesta.

Si es comparen els valors de  $t_{50\%}$  amb els de la taula 39, s'observa com en gairebé tots els casos s'obtenen valors equivalents quan s'aplica la funció de Boltzmann, tret de la proporció 50:50 a on els valors de  $t_{50\%}$  estan més allunyats. Els valors de la taula 39 han estat calculats a través d'una simulació de corba punt a punt en tot el rang de la variable independent (de 0 a 1440 minuts). En efecte, els valors de la taula 39 no parteix d'un model matemàtic concret, sinó del càlcul de la funció que defineix una recta entre dos punts contigus i per a tots els punts, forçant així el pas per tots els punts experimentals reals i no fent-ne una regressió. El valor de  $t_{50\%}$  correspon al punt d'inflexió de la corba i aquest té a veure amb la velocitat del procés, quan més baix és aquest valor més ràpid és l'alliberament.

Respecte el valor del pendent  $k$ , aquest guarda relació inversa amb la velocitat d'alliberament del fàrmac i la durada de la transició. És a dir, a mida que incrementa el valor de  $k$  l'alliberament es produeix de manera més lenta i a la inversa. És possible que un estudi més acurat d'aquesta constant pugui aportar informació sobre els mecanismes fisicoquímics implicats a l'alliberament i la seva relació amb els canvis termodinàmics subjacents. Per exemple, en el model de funció sigmoïdal de Boltzmann que s'aplica al flux iònic a través dels canals voltatge dependents, a partir dels valors de la constant  $k$  es pot inferir la valència dels ions implicats en el procés ja que la constant  $k$  porta implícita la constant de Boltzmann pels gasos  $R$ , la temperatura del procés i la constant universal de Faraday, no obstant, l'aprofundiment en els paràmetres i variables que poden fer modular la constant  $k$  s'escapen de l'àmbit i propòsits del present treball, al mateix temps que requereixen d'expertesa matemàtica especialitzada.

Si s'aplica el model sigmoïdal de Boltzmann als resultats de les granes que només tenen alginat mostrats a la figura 39 s'obtenen les funcions mostrades a la taula 45.

**Taula 45:** Equacions obtingudes per regressió no lineal del tractament de les corbes d'alliberament obtingudes a partir de granes d'alginat i aplicant el model de funció sigmoïdal de Boltzmann

Composició de les granes i pH d'obtenció	Equació	R <sup>2</sup>
Alg 2% (pH = 2)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 0,46 + \frac{97,15}{1 + e^{\frac{145,5-t}{10,78}}}$	0,9945
Alg 2% (pH = 4)	$\frac{M_t}{M_\infty} = -5,14 + \frac{104,32}{1 + e^{\frac{162,0-t}{21,10}}}$	0,9953
Alg 2% (pH = 6)	$\frac{M_t}{M_\infty} = 1,09 + \frac{98,22}{1 + e^{\frac{158,3-t}{21,03}}}$	0,9965
Alg 2% (pH = 8)	$\frac{M_t}{M_\infty} = -2,36 + \frac{101,81}{1 + e^{\frac{162,1-t}{21,29}}}$	0,9957

Es pot observar en aquest cas com el model sigmoïdal de Boltzmann un cop més explica els resultats de tota la corba experimental, és a dir, els alliberaments que es produeixen als diferents pHs del medi que simulen el trànsit gastrointestinal (pH=1,2; pH=6,8 i pH=7,4 respectivament). Tanmateix, els resultats s'ajusten a aquest model amb molta fiabilitat si es té

en compte els valors del coeficient  $R^2 > 0,99$  en tots els casos. També es pot observar com el valor de pendent  $k$  que ens dona el model és similar i gairebé idèntic  $k_{ca}$ . 21, excepte en el cas de les granes obtingudes a  $pH=2$  on aquest valor és exactament la meitat. Certament, la velocitat d'alliberament observada per les granes obtingudes a  $pH=2$  és superior a la resta de granes, no obstant, si s'assumeix la velocitat d'alliberament com a resposta mesurable d'un procés fisicoquímic de transició de fase que succeeix en el polímer, es pot assumir que aquest valor  $k$  està relacionat amb els mecanismes que regeixen l'alliberament. En el cas de les granes composades només a base d'alginat, el diferent valor de  $k$  estaria indicant que tot i tenir una mateixa composició quantitativa de polímer, les interaccions d'aquest a la matriu i per tant, la configuració estructural de la mateixa és diferent tal i com ja s'ha discutit a l'apartat 4.4.5.4.

#### 4.6.8. Alliberament colònic del lisinat d'ibuprofè

Si bé es requereixen estudis posteriors més específics per poder determinar si el problema de l'alliberament colònic pot quedar resolt amb les diferents composicions dels biopolímers assajats, el plantejament d'integrar el fàrmac com a part de l'arquitectura de la microesfera pot proporcionar alternatives amb alliberaments de més llarg recorregut.

Els resultats del present treball demostren com la presència del chitosan aporta una resistència a l'estructura de les granes i com l'alliberament és independent de l'inflament quan hi ha chitosan a les granes, el que suggereix una possible interacció i formació d'enllaços iònics entre els elements del lisinat d'ibuprofè, és a dir, la lisina o el propi ibuprofè amb els altres elements de la composició. Tanmateix, l'elevada resistència de les granes a les variacions de  $pH$  i la permanència de les granes a  $pH 7,4$  durant dies sense desintegrar-se ni perdre la seva estructura, fan pensar en aquesta possibilitat, sobretot, en la unió de la lisina com a element estabilitzador que uniria d'una banda l'alginat i a l'altra el chitosan per la seva propietat de comportar-se a l'hora com a catió i com a anió en els  $pH$ s de treball.

El chitosan és un dels polímers més utilitzats per aplicacions farmacèutiques degut a la seva baixa toxicitat, biocompatibilitat, llarg temps de residència i propietats mecàniques favorables (Islam i col., 2016; Abioye i col., 2016). Aquest biopolímer té molts grups amino i la ionització d'aquests grups és el que li confereix les característiques de dependència del  $pH$  i també l'encreuament amb substàncies aniòniques com l'alginat. Per encapsular l'ibuprofè en chitosan per conjugació, el medi s'ha de trobar a un determinat  $pH$  que afavoreixi la reacció entre el chitosan carregat positivament amb l'ibuprofè carregat negativament. Per tant, per un encapsulament adequat, els autors (Abioye i col., 2016) van dissoldre l'ibuprofè en una solució de  $NaOH 0,1M$  (per sobre del seu  $pKa$ ) per tal de produir molts grups carboxilat que afavoreixin la reacció amb el chitosan carregat positivament dissolt en una solució del 1% v/v d'àcid acètic glacial (per sota del seu  $pKa$ ). La solubilitat de l'ibuprofè i el perfil d'alliberament dels nanocomplexes chitosan-ibuprofè es va trobar depenent de la concentració de chitosan i la velocitat d'alliberament disminuïa a mida que el chitosan augmentava (Abioye i col., 2016). Aquests resultats coincidirien amb els obtinguts en el present treball amb el lisinat d'ibuprofè.

En un altre estudi (Ofokansi i Kenechukwu, 2013), van demostrar que l'ibuprofè s'alliberava al còlon sense alliberar-se a l'estomac degut a les interaccions electrostàtiques. En aquest cas es tracta d'ibuprofè encapsulat amb chitosan i Eudragit RL 100 en un complex polielectrolític amb inflament depenent del  $pH$  i per tant, les unions electrostàtiques es produïrien entre els grups carbonil de l'Eudragit i els grups amino del chitosan a  $pH$  colònic ( $pH=7,4$ ). Aquest seria un cas similar al que succeeix amb l'alginat a on es produeix la reacció primera entre els grups carbonil de l'alginat i els grups amino del chitosan. En funció del  $pH$ , les molècules de chitosan es disposen en un estat d'agregació ordenada que obstrueix l'alliberament d'ibuprofè, o bé es

disposen de manera més enredada en un estat tipus gel permetent el pas del fàrmac cap al medi sense obstacle. Les característiques bioadhesives del chitosan el fan interessant també per perllongar el temps de residència a les localitzacions d'alliberament, en tant pot interaccionar amb la mucosa, essent aquest un aspecte rellevant pels hidrogels destinats a l'alliberament al tracte gastrointestinal i al còlon (Huang i col., 2000 ).

Aquesta estratègia és prometedora de cara a la consecució de formulacions d'ibuprofè d'alliberament colònic per la seva utilització contra afeccions inflamatòries de l'intestí o per la prevenció de determinats tipus de càncer colorectal amb una reducció del risc de toxicitat sistèmica i reducció de la tendència a la irritació local.



## CONCLUSIONS



## CONCLUSIONS

Els resultats d'aquest treball evidencien la utilitat dels biopolímers alginat i quitosan per a l'obtenció de sistemes d'alliberament modulats a base de lisinat d'ibuprofè i permeten arribar a les següents conclusions:

- L'alginat permet de manera totalment efectiva encapsular el lisinat d'ibuprofè en quantitats suficients sota un procés de gelificació ionotròpica amb clorur de calci que es mostra eficient, tant qualitativament com quantitativament, i amb una estabilitat mínima de les granes obtingudes de fins a 36 mesos.

- Les matrius d'alginat que contenen lisinat d'ibuprofè són sensibles al pH extern i modulen el seu grau d'inflament en funció d'aquest. Les granes que s'obtenen són capaces de retenir de manera efectiva el lisinat d'ibuprofè evitant que aquest s'alliberi en condicions gàstriques per passar a un alliberament intestinal que es produeix de manera progressiva i completa en unes 2 hores després d'assolir pHs propers a la neutralitat o alcalins.

- El mètode ionotròpic és suficientment robust, eficient i reproduïble, veient-se afectat per la concentració de polímer present en el medi a extrusionar i per la concentració de calci del medi de gelificació.

- Les condicions òptimes d'obtenció de granes d'alginat amb lisinat d'ibuprofè encapsulat són les que corresponen a una concentració d'alginat del 2% p/v i a una concentració del 4% p/v de clorur de calci en el bany de gelificació a pH neutre, essent el temps d'enduriment de 60 minuts i la concentració de lisinat d'ibuprofè del 17 % p/p.

- El mètode espectrofotomètric és fiable per l'avaluació quantitativa del lisinat d'ibuprofè contingut a les matrius biopolimèriques obtingudes.

- Esdevenen paràmetres claus a controlar en el procés de preparació, la concentració de polímer i de clorur de calci, influint directament en l'eficiència d'encapsulament i en la quantitat de fàrmac encapsulat. El temps d'enduriment no afecta de manera significativa al procés ni al producte resultant.

- En el procés de preparació, el pH del bany de gelificació, és a dir, el pH d'obtenció de les granes, influeix en l'eficiència i capacitat d'encapsulament del lisinat d'ibuprofè, així com en l'estabilitat de les granes obtingudes. Els pHs entre 4 i 8 es mostren com idonis pel procés, sense observar diferències morfològiques o d'alliberament. Els perfils d'alliberament són similars en tots els casos degut a les propietats d'inflament i de solubilitat de l'alginat en medis neutres o alcalins.

- L'estabilització de les granes d'alginat amb un policatió com el quitosan dona resultats diferents en funció del mètode de preparació aplicat.

- Quan el mètode utilitzat incorpora el quitosan al bany de gelificació, el comportament de les granes obtingudes és molt similar a les granes no estabilitzades amb policatió. Aquest fet pot tenir diversos orígens. En el present treball s'atribueix a l'elevat contingut de fàrmac en relació a la quantitat de polímer i també a la relativament elevada concentració de calci del medi que propicia gelificacions molt ràpides.

- El recobriment de les granes obtingudes amb capes superposades de quitosan i d'alginat no ofereix variacions pel que fa als perfils d'alliberament del lisinat d'ibuprofè i en qualsevol cas,



no són variacions ni aparents ni significatives, pel que aquests mètodes només acaben tenint un paper merament testimonial en el present treball al no poder aportar millores o característiques diferencials respecte les granes que només estan basades en alginat i per tant sense interès pràctic, en tant suposa una complicació del procés de preparació per no fer una aportació útil a la formulació final des d'un punt de vista galènic, tecnològic o biofarmacèutic.

- La modificació de les característiques de les granes obtingudes s'assoleix quan es produeix la interacció entre polímers prèvia a la seva extrusió i gelificació ionotròpica. En aquest cas i sota aquesta metodologia, les interaccions són més eficients, fet que es constata per un diferent comportament d'inflament de les granes, ja sigui sense fàrmac o quan incorporen el fàrmac.

- La incorporació del lisinat d'ibuprofè, suposa la modificació del comportament de les microesferes pel que fa a característiques d'inflament i de solubilitat i per tant, també d'estabilitat en el medi d'alliberament el que porta a concloure un paper estructural del lisinat d'ibuprofè a les matrius i en la formació d'entrecreuaments amb els biopolímers.

- L'encapsulament només de lisina ja produeix modificacions del comportament d'inflament de les granes que es modifica encara més quan s'incorpora l'ibuprofè. Les granes esdevenen molt més resistents i duradores en el medi de dissolució que quan aquests elements no hi són, el que suggereix la formació d'entrecreuaments entre tots els elements iònics presents a la formulació, conferint consistència a la mateixa i propiciant que els mecanismes que governen l'alliberament del fàrmac siguin també diferents i no només dependents de paràmetres relacionats amb l'inflament i conseqüent absorció d'aigua.

- La proporció de quitosan present a la formulació influeix en la capacitat d'inflament de les granes a pH àcid. En general, a major proporció major és l'inflament.

- L'inflament de polímers mixtes a pH àcid no s'associa sempre a alliberaments de lisinat d'ibuprofè. Les característiques de solubilitat del fàrmac i interaccions iòniques també hi influeixen.

- Es constata la influència del principi actiu en l'estructura de les matrius polimèriques i en la seva estabilitat. El caràcter iònic de cadascun dels elements de la formulació i el seu grau d'ionització als pHs de treball cal tenir-los en consideració en tant són capaços d'interactuar amb l'estructura de les matrius formant-ne part de la mateixa i modulant-ne les seves propietats.

- Els resultats d'alliberament del lisinat d'ibuprofè obtinguts a partir de les matrius de biopolímers assajades, úniques d'alginat o mixtes amb quitosan, s'ajusten per regressió no lineal a un model de funció sigmoïdal de Boltzman. Aquest model permet descriure tot el procés d'alliberament des de l'inici fins el final, és a dir des de pH gàstric fins els pHs intestinals.

- Les microesferes de matriu mixta obtingudes pel mètode de prebarreja de polímers, per les seves propietats, capacitat de retenció del fàrmac a pH gàstric i alliberament lent és presenten com a candidates potencials per un alliberament colònic d'ibuprofè en forma de sal de lisina en tant es mostren resistents als diferents pHs del tracte gastrointestinal. Són necessaris estudis posteriors per optimitzar aquest alliberament.

## PUBLICACIONS I COMUNICACIONS





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Pharmaceutics

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm)

## Characterization of alginate beads loaded with ibuprofen lysine salt and optimization of the preparation method



F. Caballero\*, M. Foradada, M. Miñarro, P. Pérez-Lozano, E. García-Montoya, J.R. Ticó, J.M. Suñé-Negre

Unit of Pharmaceutical Technology, Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, School of Pharmacy, University of Barcelona, Avda. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 June 2013  
Received in revised form  
14 September 2013  
Accepted 13 October 2013  
Available online 28 October 2013

#### Keywords:

Alginate beads  
Ibuprofen lysine  
Microcapsules  
Slow release  
pH sensitiveness

### ABSTRACT

The parameters influencing alginate ionotropic gelation and the production of alginate beads loaded with hydrosoluble ibuprofen lysine salt (IBU-L) were studied, as well as the optimization of the method for its attainment. A three-factor and three-level factorial design ( $3^3$ ) was carried out to determine the influence of three experimental variables: polymer concentration,  $\text{CaCl}_2$  concentration, and curing time on the dependent variables drug load and encapsulation efficiency. The effect of the pH used in the preparation bath was also evaluated. Concentrations of  $\text{CaCl}_2$  and pH of gelling bath were seen to affect bead formation and stability as well as their ability to properly entrap the drug. In this work, IBU-L was used as a model of a non-steroidal anti-inflammatory drug with good solubility in alginate solutions. IBU-L was successfully encapsulated in alginate beads obtained by the ionotropic gelation method. The obtained alginate matrixes are able to modify the release of the entrapped IBU-L and this occurs in a pH-sensitive way that can be correlated with the swelling behaviour of the alginate-produced beads. Morphological characteristics were evaluated by means of scanning electron microscopy.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Biopolymers are a class of natural chemicals characterized by having repetitive structural units and a wide distribution in nature. A growing interest in these compounds has given rise to a large number of published works, not only because of their low cost, biocompatibility, biodegradability and ready availability but also because of their potential use for the attainment of drug controlled delivery systems (Coviello et al., 2007).

Sodium alginate is a particularly attractive biopolymer that has a wide range of applications in the field of biomedicine. Alginate is a linear, unbranched polysaccharide co-polymer composed of 1,4-linked  $\beta$ -D-mannuronic acid (M-block) and  $\alpha$ -L-guluronic acid (G-block), which are found in varying composition and sequence (Gacesa, 1988). Although alginic acid can be produced by bacteria (Sabra et al., 2001), it is commonly extracted in large amounts from algae belonging to the family of the Phaeophyceae (brown algae), its sodium salt (sodium alginate) is obtained and is a water soluble

polymer (Coviello et al., 2007). Depending on the species and parts of the marine algae used the alginate composition will be determined, however, other parameters such molecular weight and salt form may be profiled in the processing (Sabra et al., 2001). The composition sequence of polymer blocks and molecular weight of alginates are important as these factors determine the physical properties of the formed gel (Haug et al., 1967).

One of the properties that makes alginate useful in biomedical applications is their ability to form strong thermostable gels achieved through the exchange of sodium ions from G-blocks with divalent cations, such as  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , that are located in electronegative cavities, and the staking of G-blocks to form an egg-box structure (Heng et al., 2003), resulting in a thick membrane however permeable to small molecules and liquids. This property is the basis of different potential applications, such as drug delivery systems (Coviello et al., 2007), bioartificial organs (Zimmermann et al., 2005), cell immobilization (Redenbaugh et al., 1986; Visted et al., 2001), enzyme immobilization (Burns et al., 1985) and protein immobilization (Velings and Mestdagh, 1994). The ionic gelation of alginate molecules offers a flexible and easily controllable process for manipulating the characteristics of the beads which are important in controlling the drug release rate (Bodmeier and Wang, 1993; Arica et al., 2005). The formed alginate gels have pH-sensitive swelling properties which are interesting for acid sensitive drugs in order to avoid attack by gastric acids or to control the site of

\* Corresponding author at: Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department, School of Pharmacy, Avda. Joan XXIII s/n, 08028, Spain. Tel.: +34 973353806; fax: +34 973353806.

E-mail addresses: [fcaballero@ars-vitae.com](mailto:fcaballero@ars-vitae.com), [fcaballero@coffleida.cat](mailto:fcaballero@coffleida.cat) (F. Caballero).

drug release. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been profiled as candidates where alginate gels may be potential utility (Puttipatkhachorn et al., 2005; Hwang et al., 1995).

Ibuprofen lysine (IBU-L) is the water soluble lysine salt of ibuprofen, a propionic acid derivative with well known anti-inflammatory analgesic and antipyretic properties as well as a good benefit-risk ratio when compared with other NSAIDs (Busson, 1986; Moore, 2003). Ibuprofen lysine was developed in order to enhance the speed of absorption of ibuprofen and to minimize the time of onset of therapeutic effect (Mehlisch et al., 1995). Due to its short plasma half-life of 1–3 h following oral dosing and gastric irritation, ibuprofen is an ideal candidate for preparing prolonged or controlled release drug products. The lysine salt of ibuprofen also has a bad taste whose masking can be useful for oral formulations.

Although several works have been published using alginate to produce beads entrapping the non-soluble form of ibuprofen (Arica et al., 2005; Hwang et al., 1995; Ray et al., 2010), few works are available with soluble forms. The aim of the present study is to develop ibuprofen lysine loaded alginate beads with potential modified release properties, to investigate the influence of experimental conditions on the complex formation, as well as the optimization of the method for their preparation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

IBU-L (Laboratorios FARDI, Barcelona); Sodium alginate (MANUGEL® DMB) was kindly donated by ISP, Spain; Calcium Chloride (FAGRON, Spain), all other reagents were of analytical grade (PANREAC, Spain).

### 2.2. Alginate-IBU-L solutions

Alginate solutions of 1, 2 and 3% (w/v) were prepared by dissolving sodium alginate powder in deionized water and stirring until complete dissolution. To determine the optimal drug concentration, ibuprofen lysine (IBU-L) was dissolved in the respective alginate solutions to obtain final concentrations of drug ranging from 5 to 50% (w/w). Further experiments were carried out at a fixed IBU-L concentration of 17% (w/w), equivalent to ca. 10% (w/w) of ibuprofen as base.

### 2.3. Alginate-IBU-L bead preparation

Beads were obtained by extruding through a 0.25 mm needle the different alginate - IBU-L solutions into a gelling bath containing CaCl<sub>2</sub> at 1, 2 and 4% (w/v). Curing times of 30, 60, 90 and 120 min were studied. Bead formation and behaviour in the bath were observed visually. Height from the dropping device to bath surface was controlled. Beads were left in the bath during curing time and filtered through a sieve (Ø = 0.200 mm). The obtained beads were washed with deionized water and vacuum dried at room temperature until constant weight.

### 2.4. Bead formation

The ability of the polymeric solution to form adequate beads was visually assessed, proper formation being considered when the generated drops gelled instantly in the bath, rendering spherical and regular beads at the bottom of the container. When drops were disintegrated as they made contact with the gelling bath and irregular shapes or floating beads were obtained on the bath surface, bead formation was considered inappropriate. Bead size

**Table 1**  
Coded variable description and values.

	Independent variables	Units	Level values		
			Low -1	Medium 0	High 1
X <sub>1</sub>	Polymer concentration	%	1	2	3
X <sub>2</sub>	CaCl <sub>2</sub> concentration	%	1	2	4
X <sub>3</sub>	Curing time	min	30	60	120
	Dependent variables				Units
Y <sub>1</sub>	Drug load				mg/g
Y <sub>2</sub>	Encapsulation efficiency				%

was determined as the average diameter of 10 beads measured by means of a Vernier calliper with to accuracy of ±0.01 mm.

### 2.5. Statistical design and analysis

A full factorial experimental design was used in order to evaluate the main effects and the influence of the studied independent variables (polymer concentration, CaCl<sub>2</sub> concentration and curing time) on the observed responses (drug load and encapsulation efficiency) with the aim of further selecting the optimal values of the formulation parameters. A full factorial 3<sup>3</sup> design was used, consisting of 27 runs. The design was generated and analyzed using STATGRAPHICS® software (StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA). Table 1 depicts the independent and the dependent variables respectively. Table 2 depicts the experimental design indicating the different runs with the respective coded levels.

### 2.6. IBU-L load and encapsulation efficiency

To determine the IBU-L loads, 20 mg of dried beads attained in each condition were accurately weighed and quantitatively placed in a phosphate buffer (pH = 8) solution under shaking until bead disintegration. Supernatants were filtered in a 0.45 µm syringe filter (Millipore Milliflex®-HV) and spectrophotometrically analyzed

**Table 2**  
Experimental matrix and observed responses.

Run	Coded variable level			Observed response	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>
1	-1	-1	-1	0	0
2	-1	-1	0	0	0
3	-1	-1	1	0	0
4	-1	0	-1	0	0
5	-1	0	0	0	0
6	-1	0	1	0	0
7	-1	1	-1	949	81.12
8	-1	1	0	966	83.29
9	-1	1	1	927	84.38
10	0	-1	-1	644	73.12
11	0	-1	0	663	75.94
12	0	-1	1	652	72.52
13	0	0	-1	883	79.48
14	0	0	0	878	78.10
15	0	0	1	863	78.83
16	0	1	-1	848	80.35
17	0	1	0	840	83.62
18	0	1	1	853	81.17
19	1	-1	-1	635	67.12
20	1	-1	0	624	68.33
21	1	-1	1	648	68.01
22	1	0	-1	837	74.21
23	1	0	0	887	77.52
24	1	0	1	868	73.30
25	1	1	-1	809	73.25
26	1	1	0	847	78.30
27	1	1	1	826	71.40

at a wavelength of 258 nm using an IBU-L calibration curve. Placebo beads were used as blank correction, and a 0.4 mg/ml solution of IBU-L in phosphate buffer (pH = 8) was used as a control of IBU-L degradation during sample preparation. Encapsulation efficiencies were indirectly determined by means of measurement on IBU-L concentrations in the different gelling baths once beads were removed. The total amount of IBU-L/alginate solution employed in each condition was recorded.

Encapsulation efficiencies were determined using the following equation:

$$EE\% = \frac{[IBU-L_{\text{total used}}(\text{mg}) - IBU-L_{\text{in the bath}}(\text{mg})] \times 100}{IBU-L_{\text{total used}}(\text{mg})} \quad (1)$$

### 2.7. Effect of pH

The effect of pH in the gelling bath for bead preparation was studied in different CaCl<sub>2</sub> solutions at pH 2, pH 4, pH 6, pH 8 and pH 10, respectively. pH was monitored during bead preparation. Measurements were carried out using a Crison-pH-meter GLP 21.

### 2.8. Swelling behaviour of beads

Swelling behaviour of beads prepared under different pHs was studied by measuring the percentage of water uptake when suspended and incubated until constant weight in solutions at pH = 1.2 and pH = 7.2. Different sampling times from 5 min to 200 min were assayed. The mass of dry beads was determined at time zero and the mass of wet beads was measured at each sampling point on a precision scale (PCE ABZ200C) accurate to ±0.001 g. The percentage of water uptake was calculated using the following equation:

$$\% \text{Water uptake} = \frac{(\text{weight}_{\text{wet beads}} - \text{weight}_{\text{dry beads}}) \times 100}{\text{weight}_{\text{dry beads}}} \quad (2)$$

### 2.9. Drug release

Static drug release was studied on IBU-L alginate beads obtained with concentrations of polymer of 2%, CaCl<sub>2</sub> 4% and different (30, 60, 90 and 120 min) curing times. The beads were left without agitating in a dissolution bath containing distilled water at 37 °C. Aliquots of 1 ml were collected in each vessel at sampling times of 1, 2, 3, and 4.5 h. The dynamic release profile was studied on IBU-L alginate beads obtained with concentrations of polymer of 2%, CaCl<sub>2</sub> 4% and a curing time of 60 min. Drug release was studied at two dissolution pHs (pH = 1.2 and pH = 7.2) in an ERWEKA DT80 dissolution test apparatus with agitation at 100 rpm at 37 °C. Samples were collected at different sampling times (10, 30, 60, 120, 180, 300, 420 and 510 min). IBU-L concentrations were spectrophotometrically determined (λ = 258 nm) in each aliquot.

### 2.10. Bead stability

The IBU-L alginate beads were stored at room temperature in a desiccator. After 12 months of storage the beads' aspect was evaluated visually and the content of IBU-L was determined spectrophotometrically.

### 2.11. Bead morphology (SEM)

Bead morphology and surface topographical characteristics of IBU-L alginate-loaded beads was examined by means of scanning electron microscopy (SEM), using a ZEISS DSM 940 microscope.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Bead formation

The formation of alginate beads loaded with IBU-L was assessed starting from different ibuprofen concentrations in the alginate solutions. However, beads could not be formed appropriately under experimental conditions when the IBU-L concentration exceeded 25% (w/w) in the alginate solutions. The relative concentrations of polymer versus the drug must be necessary to cover the IBU-L particles completely and form a sufficiently solid and stable hydrogel structure to form beads. In order to not work at the top limit of bead formation, a constant content of 17% (w/w) of IBU-L (ca. 10% ibuprofen as base) in polymer solutions was selected as being the optimal working concentration for further experiments. Concentrations of about 10% of ibuprofen have also been used to obtain alginate beads in other works (Arica et al., 2005).

Although alginate blank bead formation can be easily obtained with all polymer and gelling agent concentrations, IBU-L-loaded beads could be only properly attained at any of the studied polymer concentrations when the gelling agent CaCl<sub>2</sub> is at a minimum concentration of 2% (w/v).

Measurements of the diameter of the loaded beads obtained showed a distribution ranging from 700 μm to 1600 μm. Bead size and homogeneity were affected by polymer and gelling agent concentration as well as the pH of the gelling bath. The viscosity of the polymer solution affected bead size distribution. The smallest beads were produced when alginate was used at a low concentration (1%), and larger beads obtained when polymer solution was (3%) due to differences in surface tension, as described in other works (Badwan et al., 1985). Additionally, some bead deformation was observed when high polymer concentrations (3%, w/v) were employed, as reported in other works (Fundueanu et al., 1999). Although higher polymer concentrations (4%, w/v) have been used by other authors (Kulkarni et al., 2001) to obtain alginate beads, the experimental conditions resulted in difficulties for the extrusion of the polymer through the needle due to excessive viscosity, and polymer concentrations above 3% (w/v) were discarded. Low pH (pH = 2) contributed to forming smaller beads and high CaCl<sub>2</sub> concentrations were seen to influence bead diameter and shape homogeneity, probably due to higher CaCl<sub>2</sub> concentrations.

### 3.2. Drug load and encapsulation efficiency

For statistical study, a three-factor and a three-level factorial experimental design (3<sup>3</sup>) were applied in order to find out the influences of three studied variables: polymer concentration (X<sub>1</sub>), CaCl<sub>2</sub> bath concentrations (X<sub>2</sub>) and curing times (X<sub>3</sub>), on the attainment of IBU-L-loaded alginate beads, measuring drug load (Y<sub>1</sub>) and encapsulation efficiency (Y<sub>2</sub>) as two representative parameters for process optimization.

A statistical model that includes interactive polynomial terms represented by the following equation was used to evaluate the responses.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{22}X_2^2 + b_{23}X_2X_3 + b_{33}X_3$$

Variable description, codes and level values are depicted in Table 1

The experimental matrix, as well as, the observed responses on drug loads and encapsulation efficiencies obtained from the different variable levels is depicted in Table 2. For results analysis, when beads did not form, response was considered zero.

**Table 3**

ANOVA on estimated effects and interactions of independent variables on drug load and encapsulation efficiency.

Source	Drug load		Encapsulation efficiency	
	F-ratio	p-Value	F-ratio	p-Value
X <sub>1</sub>	25.80	0.0001	38.51	0.0000
X <sub>2</sub>	24.09	0.0001	20.23	0.0003
X <sub>3</sub>	0.00	0.9691	0.00	0.9884
X <sub>1</sub> X <sub>1</sub>	9.83	0.0060	20.28	0.0003
X <sub>1</sub> X <sub>2</sub>	11.61	0.0005	18.74	0.0005
X <sub>1</sub> X <sub>3</sub>	0.01	0.0034	0.01	0.9240
X <sub>2</sub> X <sub>2</sub>	0.02	0.9022	3.80	0.0680
X <sub>2</sub> X <sub>3</sub>	0.00	0.9752	0.00	0.9712
X <sub>3</sub> X <sub>3</sub>	0.01	0.9066	0.08	0.7797

As a result of factorial design analysis, equations under the following parameters were attained:

Drug load

$$Y_1 = 749.7 + 229.9X_1 + 222.2X_2 + 1.780X_3 - 245.8X_1^2 - 188.9X_1X_2 + 6.917X_1X_3 + 72.17X_2^2 - 1.750X_2X_3 - 9.333X_3^2 \quad (3)$$

Encapsulation efficiency

$$Y_2 = 71.20 + 22.37X_1 + 16.21X_2 + 0.053X_3 - 28.11X_1^2 - 19.11X_1X_2 - 0.428X_1X_3 + 12.1689 \times X_2^2 + 0.162X_2X_3 - 1.774X_3^2 \quad (4)$$

The results on statistical significance of the equation coefficients and variable interactions are depicted in Table 3.

Drug loads show the real concentration remaining in the final dried beads, whereas encapsulation efficiency shows the relative amount of drug lost during bead formation. Encapsulation efficiency has been calculated by the indirect method considering the difficulties in the accurate determination of water and polymer variations during the gelation process that may result in non-reliable values if a direct method was used.

Polymer concentration and concentrations of CaCl<sub>2</sub> in the gelling bath significantly affect ( $p < 0.05$ ) both encapsulation efficiency and the amounts of IBU-L loaded into the beads. The influence of polymer concentration in encapsulation efficiency has also been reported by other authors (Arica et al., 2005). Polymer concentrations of 2% and concentrations of CaCl<sub>2</sub> of 4% were selected for further experiments such as the study on the effect of pH.

### 3.3. Effect of pH

Beads were properly obtained at any of the assayed pHs when concentrations of CaCl<sub>2</sub> were at 4%. However, optimal beads were obtained using a polymer concentration of 2% containing 17% of IBU-L (w/w) and dropping into a gelling bath containing CaCl<sub>2</sub> 4% concentration at pH=2. Under these conditions, beads were formed instantly, homogeneously and perfectly spherical in shape with higher drug loads and higher encapsulation efficiency. The fact that best behaviour was shown at acidic pH=2 gelation conditions may be explained by the physico-chemical properties of IBU-L and alginate and their low solubility at low pHs (Segui et al., 1989). When alginate is dropped into acid solutions its precipitation occurs and hydrogels are also formed as a consequence of

**Table 4**

Effect of pH on drug load and encapsulation efficiency.

Polymer (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)	pH	Curing time (min)	DL (mg/g)	EE (%)
2	4	2	60	940	95.35
2	4	4	60	852	79.35
2	4	6	60	778	80.83
2	4	8	60	824	81.14
2	4	10	60	853	81.09

conversion to the insoluble alginic acid (Hodson et al., 1995). It can be concluded that two gelation mechanisms occur when low CaCl<sub>2</sub> solutions are used at low pH: the ionotropic gelation produced by Ca<sup>2+</sup> ions, and the gelling effect of low pH. Poor IBU-L solubility and low diffusion through the alginate matrixes due to poor swelling of alginate matrixes at low pH should also be considered a positive contribution to bead formation and higher drug loads. Fundueanu et al. (1999), suggested that after treatment at low pH, the calcium ions remaining inside the electronegative cavities of G-blocks originate more stable complexes. Also the formation of hydrogen bonds under acid conditions would contribute to maintaining the macroscopic structure and mechanical properties. Average concentrations of ca. 0.25 mg/ml IBU-L were found in the acid (pH=2) gelling bath after beading, whereas average concentrations of ca. 1.00 mg/ml were found at other higher pHs. This demonstrates that higher encapsulation efficiencies have to be expected at low pH due to low losses of drug to the gelling media. Significantly better loads have been found at low pH (pH=2) in comparison with higher pH (pH=4, pH=6, pH=8 and pH=10). None of the tested beads was seen to be affected by the curing times, and similar encapsulation efficiencies were obtained in beads cured at different times. Results of IBU-L load and encapsulation efficiencies of beads attained at the different pHs are depicted in Table 4. The high drug load values obtained result in the ability of the IBU-L alginate beads prepared at any of the studied pHs to be used in oral pharmaceutical preparations where the usual therapeutic dosages could be achieved in a feasible way.

It was thought that the presence of IBU-L in the gelling media could affect the gradient differential and therefore the rate of release or even the encapsulation efficiencies. However, some previous experiments (data not shown) carried out using IBU-L dissolved in the gelling media prior to attaining beads, resulted in similar encapsulation efficiencies and drug loads, suggesting that encapsulation efficiencies are independent of the amount of IBU-L present in the gelling media.

### 3.4. Swelling characteristics of beads

The swelling behaviour of alginate polymer has been reported as one of the relevant factors for controlling release in drug delivery systems (Gaudio et al., 2005). Fig. 1 shows the swelling behaviour of beads attained at different pHs. As expected, water uptake is significantly higher at pH 7.2 whereas at acid pH, water uptake is near zero. Ostberg and Graffner (1994), suggested that swelling may be enhanced by the presence of phosphate ions that could act to complex calcium. The ability of alginate matrixes for swelling, depending on the pH of the media, is a genuine characteristic of this biopolymer that can be applied to the controlled release of drugs and to avoid the gastric release of the drugs.

IBU-L beads showed a quick water uptake when at pH 7.2. In all cases, at 40 min the beads were at the maximum swelling rate, with swelling values beginning a slight decrease due to the erosion of the beads at this pH until their disintegration. Therefore, it is expected that the release of the drug will be determined by the alginate swelling properties and the concurrent erosion of the alginate beads. Similar swelling behaviour with alginate



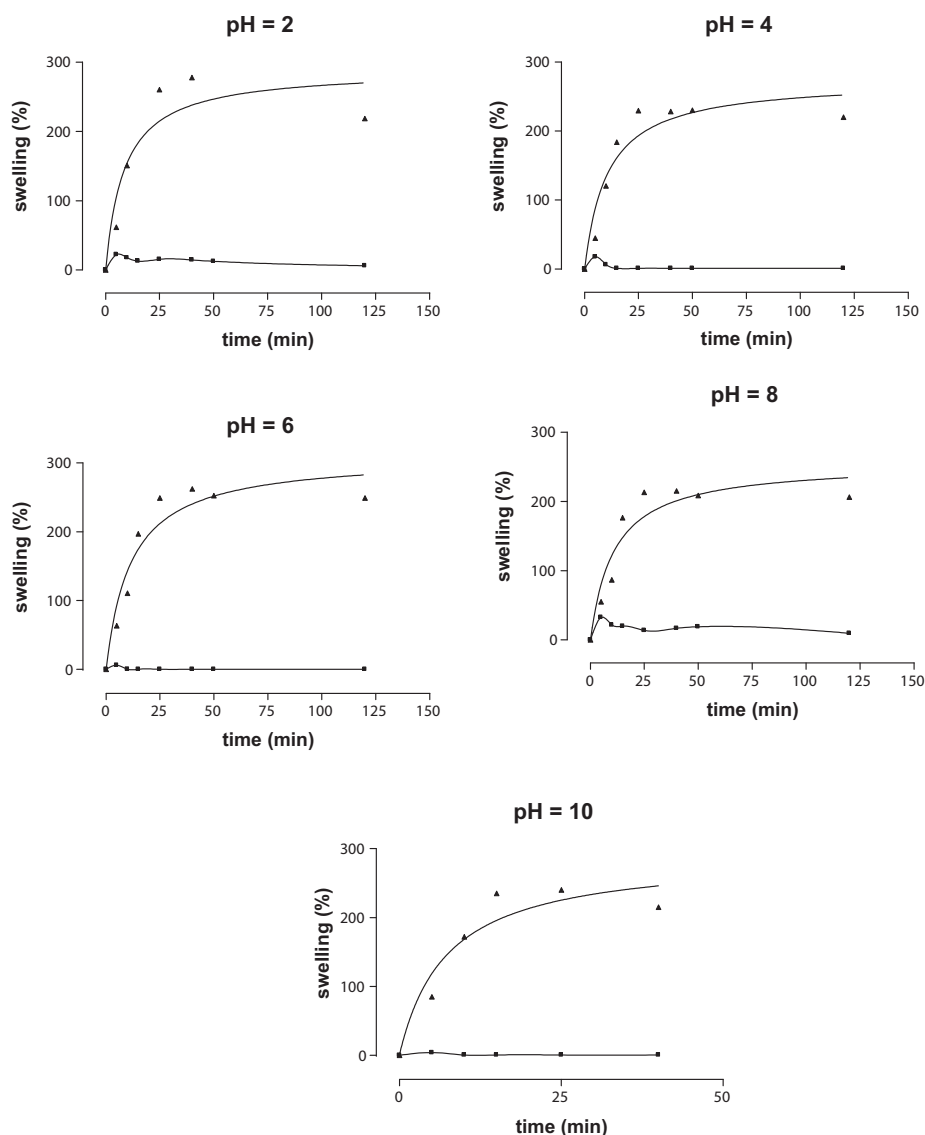


Fig. 1. Swelling kinetics at pH = 7.2 ( $\blacktriangle$ ) and pH = 1.2 ( $\blacksquare$ ) determined on IBU-L alginate beads obtained at different pHs.

matrixes has been described by other authors (Gaudio et al., 2005; Dolatabadi-Farahani et al., 2006). Since the property of alginate beads to re-swelling is susceptible to environmental pH, the incorporation of acid-sensitive drugs into the beads protects them from acid juice (Segui et al., 1989) and can also avoid gastric damage when the encapsulated drugs are gastric irritants (Lee et al., 1998).

No significant statistical differences have been found in the swelling profiles determined in beads attained at different pHs (ANOVA,  $p > 0.05$ ), thus alterations in the release profile originated by the preparation of beads at different pHs cannot be expected. Although at pH 2 the formation of hydrogel also occurs by precipitation of non-soluble alginic acid, swelling properties are still maintained (Hodson et al., 1995).

### 3.5. Drug release

Release as static passive diffusion test was conducted in order to find out the ability of alginate matrixes to retain the loaded

drug and also to verify the potential IBU-L losses as passive diffusion due to different curing times. A near zero order release profile was obtained when beads were introduced to distilled water under static conditions, without agitation and with a lasting time of 5 h and an average maximum release in the studied period around 12% (w/w) of IBU-L with no influence (ANOVA  $p > 0.05$ ) of curing time in the release, showing that alginate matrixes are able to retain IBU-L, that is slowly released into the media by passive diffusion (Fig. 2). Concentrations of ibuprofen measured in the gelling bath after beading showed no differences between short curing time (30 min) to long curing time (120 min).

In the same way as swelling behaviour, the dynamic dissolution profile of the tested beads confirms the ability of the alginate matrixes to properly retain IBU-L and avoid their release in acid conditions pH 1.2 (Fig. 3). These results correlated well with the swelling behaviour of beads and their influence in the release of the drug as well their sensitiveness to pH, as previously described by other authors. Although the release of ibuprofen from



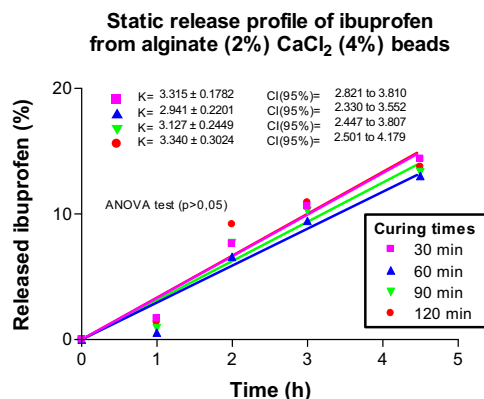


Fig. 2. Static release profile of beads attained at different curing times.

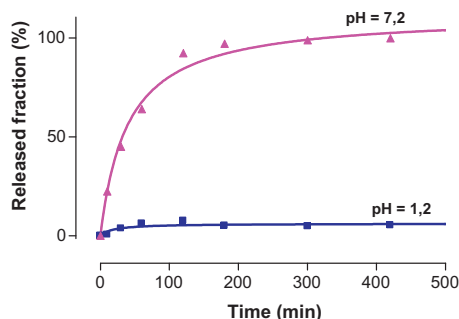


Fig. 3. Drug release profile of IBU-L alginate beads at gastric (■) and intestinal (▲) pH.

alginate beads is considered to occur by a diffusion mechanism, it could be accelerated by bead erosion and structure disintegration already detected in swelling studies at pH 7.2 (Gallardo et al., 1998).

### 3.6. Bead stability

Samples kept for 12 months at room temperature showed different behaviour. Although beads obtained at pH=2 showed better behaviour in terms of bead formation and drug load, these beads showed worse stability after one year. Samples appeared as small spherical particles surrounded by crystallized free ibuprofen powder outside the particles suggesting the inability to retain ibuprofen molecules inside the bead alginate-Ca structures.

In contrast, beads obtained at higher pH (pH = 6) showed better behaviour with passing time, maintaining both their original spherical structure and without any apparent losses of drug. Similar drug loads were obtained with aged beads and with recently prepared beads.

Additionally it has been observed that stability also depends on the concentration of gelling agent. Thus, beads obtained in a highly concentrated gelling bath (CaCl<sub>2</sub> = 4%) showed consistency over time, maintaining their original structure and with no apparent losses of IBU-L, including beads obtained with low concentration polymer (1%). IBU-L alginate-loaded beads obtained with low concentrations of gelling agent (1–2%) appeared less stable, with apparent losses in their spherical shape and structure.

These stability results can be explained by the precipitation of insoluble protonated ibuprofen into the alginate hydrogel for beads obtained at acidic pH. This non-ionized ibuprofen is retained in the structure without interacting with alginate, as an independent substance. However, when beads are obtained at higher pH, ibuprofen is in ionized soluble form, which means the ability to ionically interact and to be integrated as a constituent part of the bead structure.

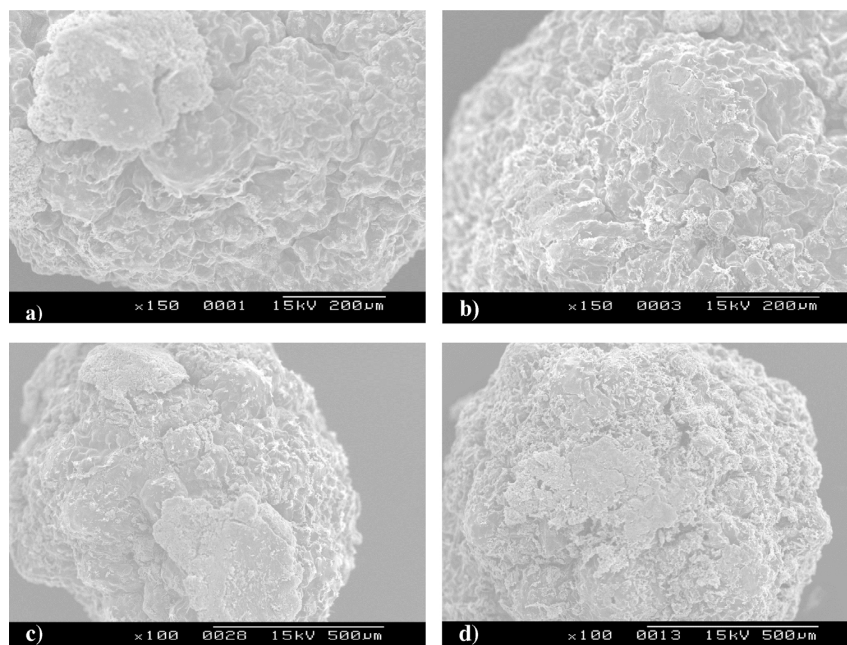


Fig. 4. Influence of calcium chloride concentration. SEM micrographs obtained at different calcium chloride concentrations: (a) alginate 2% CaCl<sub>2</sub> 1%, (b) alginate 2% - CaCl<sub>2</sub> 2%, (c) alginate 2% CaCl<sub>2</sub> 2%, (d) alginate 2% CaCl<sub>2</sub> 4%.

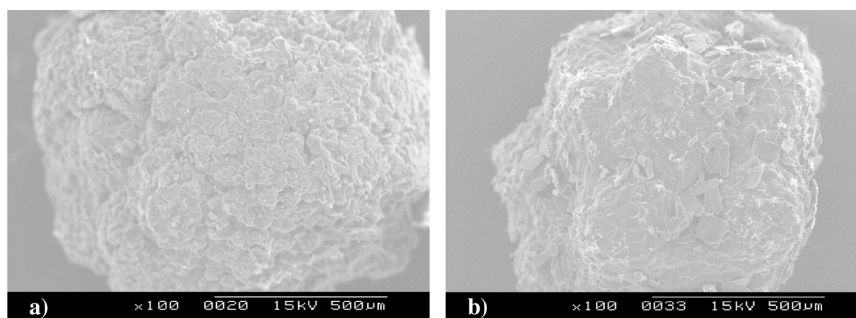


Fig. 5. Influence of pH. SEM micrographs obtained at different pH: (a) pH=6, (b) pH=2.

### 3.7. Morphology

Scanning electron micrographs of IBU-L-loaded alginate beads and their surface morphology show beads with rough surface morphology and visible wrinkles. Morphological studies showed spherical shape and surface porosity for IBU-L-loaded alginate beads. No appreciable differences between samples obtained at different curing times have been shown, however, although not significantly appreciable, some differences in surface morphology can be observed between beads attained at different  $\text{CaCl}_2$  concentrations, as well as differences at the different polymer concentrations and pH.

Micrographs of IBU-L loaded alginate beads attained under different conditions are shown in Figs. 4 and 5.

## 4. Conclusions

Other authors have investigated the characteristics of beads loaded with ibuprofen (Hwang et al., 1995; Arica et al., 2005), however these authors used insoluble forms of ibuprofen, which means that ibuprofen was dispersed and not solubilized into the polymer solution at the time of forming beads. The use of ibuprofen as its soluble lysine salt is appropriate to obtain loaded beads with ability to retain ibuprofen into the alginate polymeric matrix. The relative amounts of IBU-L retained in the alginate matrixes are adequate to achieve the usual dosage values for therapeutic purposes when these matrixes are intended to be used for oral formulations.

Polymer concentration and  $\text{CaCl}_2$  concentration in the gelling bath affect the amounts of drug loaded and the encapsulation efficiencies concluding that the optimal conditions for obtaining alginate beads loaded with IBU-L were produced when using alginate at concentrations of 2% (w/v), and a gelling bath containing 4% (w/v) of calcium chloride. Although curing times are not demonstrated to significantly influence bead formation and encapsulation efficiencies, a curing time of 60 min was selected for method standardization. The use of acid bath (pH=2) results in an improvement in bead formation as well as high encapsulation rate. However under these conditions the obtained beads resulted less stable one year after production than beads obtained at a higher pH.

The matrixes of alginate natural polymer are able to retain and modify the release of IBU-L. The release of IBU-L from alginate beads is pH sensitive due to the swelling behaviour of alginate and its dependence on pH. Whereas at gastric pH the drug is not released, at intestinal pH a slow release can be observed that achieves maximum released amount at 2 h.

## References

- Arica, B., Çalis, S., Atilla, P., Durlu, N.T., Çakar, N., Kas, H.S., Hincal, A.A., 2005. *In vitro* and *in vivo* studies of ibuprofen-loaded biodegradable alginate beads. *J. Microencapsul.* 22, 153–165.
- Badwan, A.A., Abumaloo, A., Sallam, E., Abukalaf, A., Jawan, O., 1985. A sustained release drug delivery system using calcium alginate beads. *Drug. Devel. Ind. Pharm.* 11, 239–256.
- Bodmeier, R., Wang, J., 1993. Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. *J. Pharm. Sci.* 82, 191–194.
- Burns, M.A., Kvesitadze, G.L., Graves, D.J., 1985. Dried calcium alginate/magnetite spheres: a new support for chromatographic separation and enzyme immobilization. *Biotechnol. Bioeng.* 27, 137–145.
- Busson, M., 1986. Update on ibuprofen: review. *J. Int. Med. Res.* 14, 53–62.
- Coviello, T., Matricardi, P., Marianecci, C., Alhaique, F., 2007. Polysaccharide hydrogels for modified release formulations. *J. Control. Release* 119, 5–24.
- Dolatabadi-Farahani, T., Vashghani-Farahani, E., Mirzadeh, H., 2006. Swelling behaviour of alginate-N,O-carboxymethyl chitosan gel beads coated by chitosan. *Iran. Polym. J.* 15, 405–415.
- Fundueanu, G., Nastruzzi, C., Carпов, A., Desbrieres, J., Rinaudo, M., 1999. Physico-chemical characterisation of Ca-alginate microparticles produced with different methods. *Biomaterials* 20, 1427–1435.
- Gacesa, P., 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8, 161–182.
- Gallardo, A., Eguiburu, J.L., Berridi, M.J., Roman, J.S., 1998. Preparation and *in vitro* release studies of ibuprofen loaded films and microspheres made from graft copolymers and poly(L-lactic acid) on acrylic backbones. *J. Control. Release* 55, 171–179.
- Gaudio, P., Colombo, P., Colombo, G., Russo, P., Sonvico, F., 2005. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *Int. J. Pharm.* 302, 1–9.
- Haug, A., Myklestad, S., Larsen, B., Smidsrød, O., 1967. Correlation between chemical structure and physical properties of alginate. *Acta Chem. Scand.* 21, 691–704.
- Heng, P., Chan, L., Wong, T., 2003. Formation of alginate microspheres produced using emulsification technique. *J. Microencapsul.* 20, 401–413.
- Hodson, A., Mitchell, J., Davies, M., Melia, C., 1995. Structure and behaviour of hydrophilic matrix sustained release dosage form 3. The influence of pH on the sustained-release performance and internal gel structure of sodium alginate matrixes. *J. Control. Release* 33, 143–152.
- Hwang, S.J., Rhee, G.J., Lee, K.M., Oh, K.H., Kim, C.K., 1995. Release characteristics of ibuprofen from excipient-loaded alginate gel beads. *Int. J. Pharm.* 116, 125–128.
- Kulkarni, A.R., Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., Rudzinski, W.E., 2001. *In vitro* release of cefadroxil-loaded sodium alginate interpenetrating network beads. *Eur. J. Pharm.* 51, 127–133.
- Lee, B.J., Cui, J.H., Kim, T.W., Heo, M.Y., Kim, C.K., 1998. Biphasic release characteristics of dual drug-loaded alginate beads. *Arch. Pharm. Res.* 21, 645–650.
- Mehlich, D.R., Jasper, R.D., Brown, P., Korn, S.H., McCarroll, K., Murakami, A.A., 1995. Comparative study of ibuprofen lysine and acetaminophen in patients with post operative dental pain. *Clin. Ther.* 17, 852–860.
- Moore, N., 2003. Forty years of ibuprofen use. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* 135, 28–31.
- Ostberg, T., Graffner, C., 1994. Calcium alginate matrices or oral multiple unit administration: II influence of calcium concentration, amount of drug added and alginate characteristics on drug release. *Int. J. Pharm.* 111, 271–282.
- Puttipatkhachorn, S., Pongjanyakul, T., Priprom, A., 2005. Molecular interaction in alginate beads reinforced with sodium starch glycolate or magnesium aluminium silicate, and their physical characteristics. *Int. J. Pharm.* 293, 51–62.
- Ray, R., Maity, S., Mandal, S., Chatterjee, T.K., Sa, B., 2010. Development and evaluation of a new interpenetrating network bead of sodium carboxymethyl xanthan and sodium alginate for ibuprofen release. *Pharmacol. Pharm.* 1, 9–17.
- Redenbaugh, K., Paasch, B.D., Nichol, J.W., Kossler, M.E., Viss, P.R., Walker, K.A., 1986. Somatic seeds: encapsulation of asexual embryos. *Biotechnology* 4, 797–801.
- Sabra, W., Zeng, A.P., Deckwer, W.D., 2001. Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 315–325.

- Segui, N., Yotsuyanagui, T., Ikeda, K., 1989. Interaction of calcium-induced gelation of alginic acid and pH sensitive reswelling of dried gels. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 3092–3095.
- Velings, N.M., Mestdagh, M.M., 1994. Protein adsorption in calcium alginate gel beads. *J. Bioact. Biocomp. Polym.* 9, 133–141.
- Visted, T., Bjerkvig, R., Enger, P., 2001. Cell encapsulation technology as a therapeutic strategy for CNS malignancies. *Neuro-Oncology* 3, 201–210.

- Zimmermann, H., Zimmermann, D., Reuss, R., Feilen, P.J., Manz, B., Katsen, A., Weber, M., Ihmig, F.R., Ehrhart, F., Gessner, P., Behringer, M., Steinbach, A., Wegner, L.H., Sukhorukov, V.L., Vázquez, J.A., Schneider, S., Weber, M.M., Volke, F., Wolf, R., Zimmermann, U., 2005. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunoisolated transplantation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 16, 491–501.

## The 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (PBP Meeting) April 7–10, 2008, Barcelona, Spain

### PARAMETERS AFFECTING THE RELEASE PROFILE OF ALGINATE BEADS LOADED WITH IBUPROFEN LYSINATE

Francesc Caballero, Mercè Foradada, Montserrat Miñarro, Pilar Pérez-Lozano, Encarna García-Montoya, Josep Ramon Ticó, Josep Maria Suñé-Negre

Pharmacy and Pharmaceutica Technology Department. School of Pharmacy. University of Barcelona. Avda. Joan XXIII s/n 08028 Barcelona

#### INTRODUCTION

In the last years biopolymers have attracted the interest of biomedical and pharmaceutical industries, mainly in alginates that their particular characteristics make a potential polymer suitable for the development of controlled-release systems (1).

Ibuprofen lysinate is a potential NSAID candidate to be studied for modified release preparations based on alginates as releasing matrix, since good entrapment efficiencies and efficient bead formation have been demonstrated in previous works.

Different parameters have to be considered during bead preparation, such as gelling time, ion and polymer concentrations that could affect the further release profile of obtained beads.

The aim of this work is the study of the release profile of Ibuprofen lysinate loaded in alginate beads cross-linked with divalent cation calcium prepared under different conditions.

#### MATERIAL AND METHODS

##### *Alginate ibuprofen lysinate solutions.*

Alginate solutions of 1, 2, and 3% (w/v) were prepared by dissolving alginate powder in deionised water and stirring until complete dissolution. Ibuprofen lysinate was dissolved into each polymer solution immediately before bead preparation at concentration of 17% w/v.

##### *Alginate-ibuprofen lysinate bead preparation.*

Beads were obtained by ionotropic gellation extruding through a 0,25 mm needle the different alginate – ibuprofen lysinate solutions into a gelling bath containing  $\text{CaCl}_2$  at 1, 2, 3% and 4% (w/v). Times of 30, 60, 90 and 120 min. for curing beads were studied. Height from the dropping device to the bath surface was controlled. Beads were left into the bath during curing time and filtered through a sieve (0,200 mm).

The obtained beads were washed thrice with deionised water and dried at room temperature into a dessicator until constant weight.

##### *Analytical validations*

Stability of ibuprofen lysinate in gelling media polymer and release solution was studied. Spectrophotometric method 258 nm wavelength was validated for Ibuprofen lysinate determination within the working range.

##### *Ibuprofen lysinate load*

Beads were accurately weighed in an amount of (0,100 g) and were crushed into a porcelain mortar. Crushed beads were dissolved in methanol into a 10 ml volumetric flask with aid of sonication bath. Samples were filtered in a 0,45  $\mu\text{m}$  nylon filter and spectrophotometrically determined for ibuprofen content.

##### *Release studies*

Ibuprofen lysinate loaded beads were suspended in distilled water using a 8 paddles dissolution test bath PHARMATEST PTW SIII at 37°C and 50 rpm agitation. 1 ml samples were taken at interval times of 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 120, 180 and 300 minutes. The sampled volume was restored with distilled water. One of the samples was suspended in acid media (HCl 0,1 N pH=1,2) to simulate gastric conditions.

##### *Statistical analysis*

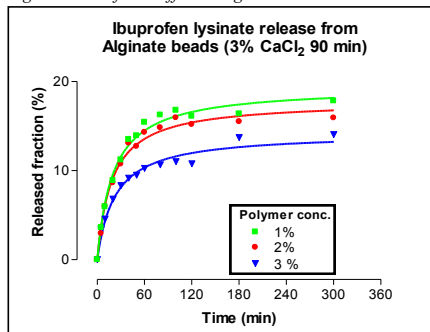
One way ANOVA test was performed for statistical differences ( $p < 0,05$ ) between studied batches.

#### RESULTS AND DISCUSSION

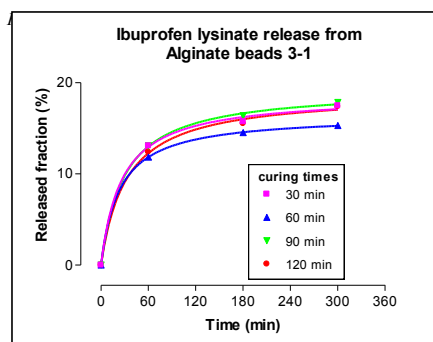
Quantitatively, there was differences in the ibuprofen lysinate loads, with maximum observed values at polymer concentrations of 2% in solutions of 4% calcium chloride. Different ibuprofen lysinate release profiles have been attained with beads of different polymer concentrations, however it seems to be more affected by the different drug loads rather than release rate.

Beads obtained with 1% polymer concentrations released the drug slightly faster than those obtained with concentrations of 3% (fig 1)

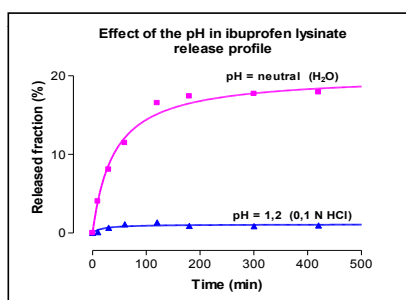
Fig 1. Release from different alginate concentration beads.



Curing times into the gelling bath are not affecting the release profile, and no differences can be observed between the beads obtained in the same conditions with different curing times (fig. 2)



The study of release in acidic (pH=1,2) conditions revealed that little ibuprofen lysinate was released to the media within the studied period. (fig.3)

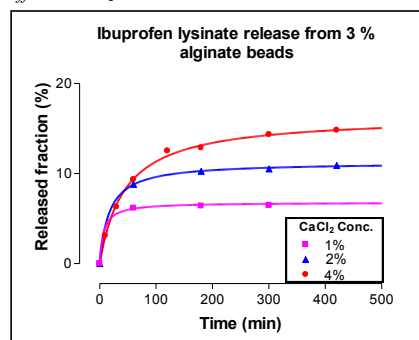


These results suggest that the amount of ibuprofen lysinate release in gastric conditions could be small, acting the polymeric system for the retention of drug while the pass trough the stomach.

Further experiments will be needed to confirm if a subsequent change raising the media pH will allow an appropriate release of entrapped ibuprofen lysinate in order to simulate physiological conditions.

Beads obtained from different CaCl<sub>2</sub> concentrations in the gelling media and the same polymer concentration showed that as increasing the ion concentration the drug release is slow. Differences in ibuprofen lysinate load can also be graphically observed (fig 4).

Fig 4: Ibuprofen lysinate release form beads obtained in different CaCl<sub>2</sub> concentrations



## CONCLUSIONS

Alginates can be used to modify the release of Ibuprofen lysinate when formulated forming calcium cross-linked beads. Different polymer concentrations and curing times do not significantly affect the release profile, however lower drug loads are observed as higher is polymer concentration. Release profile at pH=1,2 vs neutral pH is revealing that alginates could be useful to avoid stomach release of drug, since near zero percent of ibuprofen lysinate fraction is detected in the sampling times. Gelling calcium concentrations affect the release profile as well as the drug load.

## REFERENCES

1. Shilpa A, et al, 2003 J Macromol Sci Pol ym rev. 43:187-221
2. Gohel and Amin, 1998. J. Contr. Rel 31:115-734
3. Sung-Joo et al., 1995. Int. J. Pharm. 116125-128
4. Fernández-Hervás et al., 1998. Int. J. Pharm. 163:23-34

## The 6th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology (PBP Meeting) April 7–10, 2008, Barcelona, Spain

### OPTIMISATION OF THE METHOD FOR OBTAINING IBUPROFEN LYSINATE LOADED ALGINATE BEADS, WITH MODIFIED RELEASE PROPERTIES

Francesc Caballero, Mercè Foradada, Montserrat Miñarro, Pilar Pérez-Lozano, Encarna García-Montoya, Josep Ramon Ticó, Josep Maria Suñé-Negre

Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department. School of Pharmacy. University

#### INTRODUCTION

Biopolymers have been used in the last years in many different pharmaceutical fields, one of its potential uses is the ability to act as drug release modifiers when are formulated with non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS).

Although several works have been published using alginate to produce beads with drugs entrapped and to determine their release profile, little have been published about the optimisation of the method to be used, and the parameters that seems to influence the drug entrapment and release.

Different parameters have been seen to affect the bead formation and the ability to properly entrap the drug. In this work Ibuprofen lysinate has been used as a model of NSAID with good solubility in alginate solutions.

The aim of this work is the optimisation of the method for obtaining ibuprofen lysinate loaded beads, using alginates as polymer, the study of capabilities and potential use of alginates to act as release modifiers of Ibuprofen lysinate.

#### MATERIAL AND METHODS

##### *Bead formation*

Beads were attained by ionotropic gellation using calcium chloride as gelling agent. Different concentrations of alginate (1%, 2%, 3%), and four concentrations of gelling agent Calcium Chloride (1%, 2%, 3% and 4%) were assayed at different gelling times (30, 60, 90, and 120 min).

##### *Alginate ibuprofen lysinate solutions.*

Alginate solutions of 1, 2, and 3% (w/v) were prepared by dissolving alginate powder in deionised water and stirring until complete dissolution. Ibuprofen lysinate was dissolved at different concentrations into each polymer solution immediately before bead preparation.

##### *Alginate-ibuprofen lysinate bead preparation.*

Beads were obtained by extruding through a 0,25 mm needle the different alginate – ibuprofen lysinate solutions into a gelling bath containing CaCl<sub>2</sub> at 1, 2, 3, and 4% (w/v). Curing times of 30, 60, 90, 120 min and 15h were studied. Bead formation and behaviour into the bath was observed visually. Height from the dropping device to the bath surface was controlled. Beads were left into the bath during curing time and filtered trough a sieve (Ø 0,200 mm). Remaining ibuprofen in the bath was measured.

##### *Analytical validations*

Stability of ibuprofen lysinate in gelling media and polymer solution was studied. Spectrophotometric method ( $\lambda = 258$  nm) was validated for Ibuprofen lysinate determination within the working range.

##### *Effect of pH*

The effect of pH in the gelling bath for bead preparation was studied by preparing different CaCl<sub>2</sub> buffered solutions at pH=2, pH=4, pH=6, and pH = 8. pH measurements were carried out using a glass-electrode pH-meter.

##### *Ibuprofen load*

Beads were accurately weighed in an amount of (0,100 g) and crushed into a porcelain mortar. Crushed beads were dissolved in methanol into a 10 ml volumetric flask with aid of sonication bath. Samples were filtered in a 0,45  $\mu$ m nylon filter and spectrophotometrically determined for ibuprofen lysinate content.

##### *Static Release profile*

Ibuprofen lysinate loaded beads were suspended in distilled water, and left at room temperature without agitation. Samples were collected at 1, 2, 3 and 5 hours after for spectrophotometric analysis of ibuprofen lysinate released.

##### *Statistical analysis*

One way ANOVA test was performed for statistical differences ( $p < 0,05$ ) between studied batches.



## RESULTS AND DISCUSSION

### Bead formation

Ibuprofen lysinate was dissolved at different concentrations up to 50% (w/w) into the polymer solutions, however beads could not be formed until this amount was less than 25% of ibuprofen as lysinate.

For not working in the top limit of bead formation a constant content of 17% of ibuprofen lysinate (10% Ibuprofen as basis) was chosen as optimal working concentration for next experiments.

Whilst alginate blank bead formation was attained with all polymer and gelling agent concentrations, ibuprofen lysinate loaded beads (table1) could be only properly attained at any polymer concentration using the gelling agent at a minimum concentration of 2% (w/v) having into account that as higher the gelling agent concentration better the bead formation.

CaCl <sub>2</sub> % (p/v)	Polymer concentration % (p/v)		
	1	2	3
1	-	-	+
2	-	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+

(+) formation (-) not formation

Beads were measured using a Vernier calliper. Diameter (Ø) µm distribution of loaded beads ranged from 0,7 to 1,6 mm. Bead size and homogeneity was affected by polymer and gelling agent concentrations as well as pH of the gelling bath. Bead stability was better at higher polymer and cation concentrations.

### pH influence

Unhomogeneous beads were obtained at pH=8 with lower drug load. Whereas pH=6 pH=4 showed a better behaviour in size uniformity and load capacity, the best behaviour was shown at acidic pH=2 gelling conditions.

It is suggested that low pH values of the gelling bath involve the protonation of ionised soluble ibuprofen lysinate avoiding a quick release to the media, also changes in the matrix structure should be considered (reference).

### Percentage of drug loaded

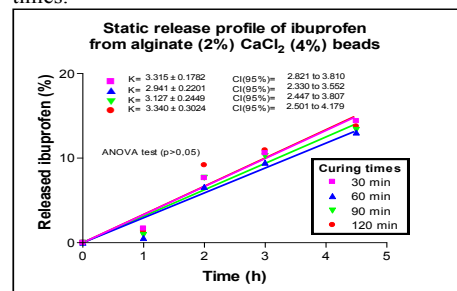
Higher ibuprofen lysinate percentages were attained with low polymer concentration 1%, and 2 % and high level concentrations of gelling cation 3% and 4%. pH showed influence on the ibuprofen lysinate loaded amount with better results in acid conditions than alkaline or neutral conditions.

### Ibuprofen lysinate concentration in gelling bath

Measured concentrations of ibuprofen in the gelling bath after beading, showed no differences between curing times of 30 min to 120 min. However, beads left into the bath for 15 hours showed higher concentrations in the media, suggesting that partial ibuprofen lysinate quick diffusion from the polymer matrix to the gelling bath occurs during bead formation until an average concentration of 0,99 mg/ml and slow release of ibuprofen lysinate to the media is produced during curing time until 1,49 mg/ml at 15 h. The presence of ibuprofen lysinate into the media is affecting the gradient differential and therefore the velocity of release. These results suggest that although curing times lower than 2 hour have no incidence in the Ibuprofen lysinate losses, better entrapment efficiencies could be attained with ibuprofen lysinate added to the gelling media.

### Static release profile

A near zero order release profiles were obtained in static conditions, with a lasting time of 4,5 hours and average maximum release in the studied period around 12% (w/w) of ibuprofen lysinate with no influence ( $p > 0,05$ ) of curing times.



## CONCLUSIONS

Results showed the ability of alginate for entrapping ibuprofen lysinate as well as to modify its release with no dependence of the conditions that beads have been prepared. We conclude that polymer and gelling ion concentrations are important for bead formation and stability, although does not significantly affect the static release profile of ibuprofen lysinate, however, dynamic release experiments should be done to confirm the influence of these parameters in the release profile. pH of gelling bath influences in the entrapment efficiency as well as the homogeneity and size of beads.

## REFERENCES

- Puttipipatkachor. 2005. Int J. Pharm 293:51-62
- Liew et al., 2006. Int. J. Pharm. 309: 25-37
- Segui et al., 1989. Chem. Pharm. Bull. 37: 3092- 3095

## REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES





## A

- Abletshauer CB, Scheneider R, Rupprecht H. (1993). Film coating pellets with insoluble polymers obtained in situ crosslinking in the fluidized bed. *J. Control. Release.* **27**(2): 149-156.
- Abioye AO, Armitage R, Kola-Mustapha AT. (2016). Thermodynamic changes induced by intermolecular interaction between ibuprofen and chitosan: effect on crystal habit, solubility and in vitro release kinetics of ibuprofen. *Pharm. Res.* **33**: 337-357.
- Acartürk F. (1989). Preparation of a prolonged-release tablet formulation of diclofenac sodium. *Pharmazie.* **44**: 547-549.
- Agnihotri SA, Mallikarjuna NN, Aminabhavi TM. (2004). Recent advances on chitosan-based micro and nano particles in drug delivery. *J. Control. Release.* **100** (1): 5-28.
- Alai MS, Jen Lin WJ, Pingale SS. (2015). Application of polymeric nanoparticles and micelles in insulin oral delivery. *J. food Drug Anal.* **23**: 351-358.
- Almeida H, Amaral MH, Lobao P. (2012). Temperature and pH stimuli-responsive polymers and their applications in controlled and self-regulated drug delivery. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2**(6): 1-10
- Anal AK, Stevens WF. (2005). Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. *Int. J. Pharm.* **290**:45-54
- Andrews J, Djakiew D, Krygier S, Andrews P. (2002). Superior effectiveness of ibuprofen compared with other NSAIDs for reducing the survival of human prostate cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **504**:277-284.
- Arica B, Çalis S, Atilla P, Durlu NT, Çakar N, Kas HS, Hincal AA. (2005). *In vitro* and *in vivo* studies of ibuprofen loaded biodegradable alginate beads. *J. Microencapsul.* **22**: 153-165.
- Ariens EJ, (1986). Stereochemistry: a source of problems in medicinal chemistry. *Med. Res. Rev.* **6**: 451-466.
- Atchison JA, Grizzle WE, Pillion DJ. (1989). Colonic absorption of insulin: an in vitro and in vivo evaluation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **248** (2): 567-72
- Avgerinos A, Hutt AJ. (1990). Interindividual variability in the enantiomeric disposition of ibuprofen following the oral administration of the racemic drug to healthy volunteers. *Chirality* **3**: 249-256

## B

- Bagul US, Patil RV, Shirsath YA, Nikam AJ, Gujar KN. (2011). Stomach specific drug delivery systems: a review. *Int. J. Periodont. Res.* **4** (04): 147-150.
- Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery. *Prog. In Pol. Sci.* **33**: 1088-1118

- Bajpai SK, Kirar N. (2016). Swelling and drug release behavior of calcium alginate/poly (sodium acrylate) hidrogel beads. *Des. Monom. Biopol.* **19**(1): 89-98
- Bansode SS, Banarjee SK, Gaikwad DD, Jadhav SL, Thorat RM. (2010). Microencapsulation: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **1**(2): 38-43.
- Bawa P, Pillay V, Choonara YE, du Toit LC. (2009). Stimuli-responsive polymers and their applications in drug delivery. *Biomed. Mater.* **4**: 1-15
- Beaver WT. (2003). Review of the analgesic efficacy of ibuprofen. *Int. J. Clin. Pract. Suppl.* **135**:13-17
- Benita S, (1996). Microencapsulation: methods and industrial Applications. *Drugs and the pharmaceutical sciences*, vol. 73. Marcel Dekker, New York.
- Bennett A, Charlier EM, McDonald AM, Simpson JS, Stamford IF, Zebro T (1977) Prostaglandins and breast cancer. *Lancet.* **2**:624-626.
- Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Gurny R. (2004). Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **57**: 35-52.
- Bertagnolli MM, Eagle CJ, Zauber AG. (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* **355**: 873- 884.
- Bhattarai N, Ramay HR, Gunn J, Matsen FA, Zhang M. (2005). PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustaines protein release. *J. Control. Release.* **103**(3): 609-624.
- Bjarnason I, Sancak O, Crossley A, Penrose A, Lanas A. (2017). Differing disintegration and dissolution rates, pharmacokinetic profiles and gastrointestinal tolerability of over the counter ibuprofen formulations. *J. Pharm. Pharmacol.* **70**:223-233
- Boneberg EM, Zou MH, Ullrich V. (1996). Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-) and S(+)-ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* **36**:16-19.
- Box GE, Behnken DW. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics.* **2**: 455-475
- Broaders KE, Pastine SJ, Grandhe S, Fréchet JM. (2011). Acid-degradable solid walled microcapsules for pH-responsive burst-release drug delivery. *Chem. Commun.* **47**(2): 665-667
- Brune K, Beck WS. (1991). Towards safe nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Agents Actions Suppl.* **32**:13-25
- Bu H, Kjøniksen AL, Nyström B. (2005). Effects of pH on Dynamics and rheology during association and gelation via the Ugi reaction of aqueous alginate. *Eur. Pol. J.* **41**:1708-1717
- Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *J. Food Eng.* **104**: 467-483

Burkatovskaya M, Tegos GP, Swietlik E, Demidova TN, Castano AP, Hamblin MR. (2006). Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials* **27**(22): 4157-64

## C

Caldorera-Moore M, Peppas NA. (2009). Micro and nanotechnologies for intelligent and responsive biomaterial-based medical systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**(15): 1391-1401

Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA. (2005). Long-term use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colo-rectal cancer. *JAMA* **294**: 914-923

Caldwell J, Hutt, AJ, Fournel-Gigleux S. (1988). The metabolic chiral inversion and dispositional enantioselectivity of the 2-arylopropionic acids and their biological consequences. *Biochem. Pharmacol.* **37**: 105-114

Candioti LV, Robles JC, Mantovani V, Goicoechea HC. (2006). Multiple response optimization applied to the development of a capillary electrophoretic method for pharmaceutical analysis. *Talanta* **69**: 140-147

Chandrasekharan NV, Hu D, Roos LT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. (2002). COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **15**; **99**(21): 13926-31.

Chang CH, Lin YH, Yeh CL, Chen YC, Chiou SF, Hsu YM, Chen YS, Wang CC. (2010). Nanoparticles incorporated in pH-sensitive hydrogels as amoxicillin delivery for eradication of *Helicobacter pylori*. *Biomacromolecules* **11**(1): 133-142

Chuang J, Huang Y, Lo S, Hsu T, Huang W, Huang S, Lin Y. (2017). Effects of pH on the shape of alginate particles and its release behavior. *Int. J. Pol. Sci.* 2017:1-9

Czechovska-Biscuk R, Jarosińska D, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. (2012). Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin Deriv.* Vol. 17, 5-20.

Chen J, Park H, Park K. (1999). Synthesis of superporous hydrogels: hydrogels with fast swelling and superabsorbent properties. *J. Biomed. Mater. Res.* **44**: 53-62.

Chen JX, Liang Y, Liu W, Huang J, Chen JH. (2014). Fabrication of doxorubicin and heparin-loaded microcapsules for synergistic cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **69**:554-560

Cheng CJ, Chu LY, Ren PW, Zhang J, Hu L. (2007). Preparation of monodisperse thermo-sensitive poly(N-isopropylacrylamide) hollow microcapsules. *J. Colloid Interf. Sci.* **313**(2): 383-388

Choi SW, Kim WS, Kim JH. (2003). Surface modification of functional nanoparticles for controlled drug delivery. *J. Disper. Sci. Technol.* **24** (3-4): 475-487

Chu LY. (2005). Controlled release systems for insulin delivery. *Expert Opin. Ther. Pat.* **15**(9): 1147-1155

- Chu LY, Liang YJ, Chen WM, Ju XJ, Wang HD. (2004). Preparation of glucose-sensitive microcapsules with a porous membrane and functional gates. *Colloid Surface B*. **37** (1-2): 9-14
- Chu LY, Park SH, Yamaguchi T, Nakao S. (2001). Preparation of thermoresponsive core-shell microcapsules with a porous membrane and poly(N-isopropylacrylamide) gates. *J. Membr. Sci.* **192** (1-2): 27-39
- Chu LY, Park SH, Yamaguchi T, Nakao S. (2002). Preparation of monodispersed thermo-responsive core-shell microcapsules with a porous membrane and poly(N-isopropylacrylamide) gates. *J. Membr. Sci.* **192**(1-2): 27-39
- Chu LY, Yamaguchi T, Nakao S. (2002). A molecular recognition microcapsule for environmental stimuli-responsive controlled-release. *Adv. Mater.* **14**(5): 386-389
- Chu LY, Xie R, Ju XJ, Wang W. (2013). Glucose-Responsive Membranes and Microcapsules for Controlled Release. *Smart Hydrogel Functional Materials*, 275-295
- Clementi F, Crudele MA, Parente E, Mancini M, Moresi M. (1999). Production and characterisation of alginate from *Azotobacter vinelandii*. *J. Sci. of food Agric.* **79** (4): 602-610
- Coghill AE, Phipps AI, Bavry AA, Wactawski-Wende J, Lane DS, LaCroix A, Newcomb PA. (2012). The association between NSAID use and colorectal cancer mortality: results from the women's Health initiative. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **29**: 1967 - 1973
- Collet JP, Sharpe C, Belzile E, Boivin JF, Hanley J, Abenhaim L. (1999). Colorectal cancer prevention by non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects of dosage and timings. *Br. J. Cancer.* (81): 62-68
- Cooper SA, Reynolds DC, Gallegos LT. (1994). A PK/PD study of ibuprofen formulations. *Clin. Pharmacol. Ther.* **55**, 126
- Cornejo-Bravo JM, Siegel RA. (1996). Water vapor sorption behavior of copolymers of N, N-diethylaminoethyl methacrylate and methyl methacrylate. *Biomaterials.* **17**: 1187-1193
- Cox SR, Brown MA, Squires DJ, Murril EA, Lednicer D., Knuth DW. (1988). Comparative human study of ibuprofen enantiomer plasma concentrations produced by two commercially available ibuprofen tablets. *Biopharm. Drug Dispos.* **9**: 539-549
- Cuzik J, Otto F, Baron JA. (2009). Aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: an International consensus statement. *Lancet Oncol.* **10**: 501-507

## D

- Dai Z, Ma X, Kang H, Gao J, Min W, Guan H, Diao Y, Lu W, Wang X. (2012). Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in vitro and in vivo. *Cancer Cell. Int.* **12**(53): 1-8
- Darrabie MD, Kendall WF, Opara EC. (2006). Effect of alginate composition and gelling cation on microbead swelling. *J. Microencapsul.* **23**(6): 63-621

Davidson III GW, Peppas NA. (1986). Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. V. Relaxation-controlled transport in P (HEMA-co- MMA) copolymers. *J. Control. Release.* **3**: 243–258

Debdatta R, Karger-Kocsis J. (2011). Shape memory polymer system of semi-interpenetrating network structure composed of crosslinked poly(methylmethacrylate) and poly(ethylene oxide). *Polymer.* **52**: 1063-1070

Deng JP, Wang LF, Liu LY, Yang WT. (2009). “Developments and new applications of UV-induced surface graft polymerizations”. *Prog. Polym. Sci* **34** (2): 156-193

DeWit MA, Gillies ER. (2009). “Cascade biodegradable polymer based on alternating cyclization and elimination reactions”. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(51): 18327-18334

Dodane V., Viivalam V. (1998). Pharmaceutical applications of chitosan. *Parm. Sci. Tech. Today.* **1**(6): 246-253

Doré M. (2011). “Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers”. *Vet. Pathol.* **48**(1): 254-65

Draget KI, Skjåk Bræk, Smidsrød O.(1994). “Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight”. *Carbohydrate Polymers* **25** (1): 31-38

## E

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. (1994). Up-regulation of cyclooxygenase-2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* **107**: 1183–1188

Eller M.G., Wright C., Della-Coletta A.A. (1989). Absorption kinetics of rectally and orally administered ibuprofen. *Biopharm. Drug Dispos.* **10**: 269-278

Elvira C, Mano JF, SanRoman J, Reis RL. (2002). Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems. *Biomaterials.* **23**: 1955-1966

Esser-Kahn AP, Odom SA, Sottos NR, White SR, Moore JS. (2011). Triggered release from polymer capsules. *Macromolecules.* **44**(14): 5539-5553

Evans AM. (2001). Comparative pharmacology of S(+)-ibuprofen and (RS)-ibuprofen. *Clin Rheumatol.* **20** (1): 9-14

Ewe K, Press G, Bollen S, Schuh I. (1991). Gastric emptying of indigestible tablets in relation to composite on and time of ingestion of meals studied by metal detector. *Dig. Dis. Sci.*, **36**: 146–152

## F

Fang Z, Wan LY, Chu LY, Zhang YQ, Wu JF. (2015). Smart nanoparticles as drug delivery systems for applications in tumor therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* **12** (12): 1943-1953

FDA .(2004). Guidance for Industry, PAT- A framework for innovative pharmaceutical development, manufacturing and quality assurance. Center for Drug evaluation and research (CDER) – Rockville MD. USA

Félétou M, Huang Y, Vanhoutte PM. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British J. Pharmacol.* **164**: 894-912

Fernández-Hervàs MJ, Holgado MA, Fini A, Fell JT. (1998). In vitro evaluation of alginate beads of diclofenac salts. *Int. J. Pharm.* **163**: 23 – 34

Firestone B.A., Siegel R.A. (1988). Dynamic pH-dependent swelling of a hydrophobic polyelectrolyte gel. *Polym. Commun.* **29**: 204-208

Fitzpatrick SD, Fitzpatrick LE, Thakur A, Mazumder MA, Sheardown H. (2012). Temperature-sensitive polymers for drug delivery. *Expert Rev. Med. Devices* **9**(4): 339-351

Flory PJ. (1953). Principles of polymer chemistry. Cornell University Press. Ed. Ithaca. New York

Fornasini G, Monti N, Brogin G, Gallina M, Eandi M, Persiani S, Bani M, Della Pepa C, Zara G, Strolin-Benedetti M. (1997). Preliminary pharmacokinetic study of ibuprofen enantiomers after administration of a new oral formulation (ibuprofen arginine) to healthy male volunteers. *Chirality* **9**: 297-302

Fournel S, Caldwell J. (1986). The metabolic chiral inversion of 2-phenylpropionic acid in rat, mouse and rabbit. *Biochem. Pharmacol.* **35**: 4153–4159

## G

Garcia Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C. (2000). Reduced incidence of colorectal adenoma among long-term users of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a pooled analysis of published studies and a new population-based study. *Epidemiology* **11**: 376 –381

Gaserod O, Sannes A, Skiah-Braek G. (1999). Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials.* **20**(8): 773-783

Gehrke SH, Palasis M, Lund M, Fisher J. (2006). "Factors determining hydrogel permeability". *Ann. NY. Acad. Sci.* **831**: 179

Geisslinger G, Dietzel K, Bezler H, Nuernberg B, Brune K. (1989). Therapeutically relevant differences in the pharmacokinetic and pharmaceutical behavior of ibuprofen lysinate as compared to ibuprofen acid". *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* **27**: 324–328

Geisslinger G, Schuster O, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. (1990). Pharmacokinetics of S (+) and R (-) ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **38**: 493-497

- Geisslinger G, Stock K.P, Bach GL, Loew D, Brune K. (1989). Pharmacological differences between R(-) and S(+) ibuprofen. *Agents and Actions*, **27** (3-4): 455-457
- Geisslinger G, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. (1993). Variability in the stereoselective disposition of ibuprofen in patients with rheumatoid arthritis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **35**: 603-607
- Gibbs BF, Kermasha S, Ali I, Mulligan CN. (1999). Encapsulation in the food industry: a review. *Int. J. of food Sci. Nutrit.* **50**: 213-224
- Gil ES, Hudson SM. (2004). Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* **29**: 1173-1222
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer GA, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC. (1994). Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann. Intern. Med.* **121**: 241-246
- Gombotz WR, Wee SF. (1998). Protein release from alginate matrices *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **31**:267-285
- Gong JP, Nitta T, Osada Y. (1994). Electrokinetic modeling of the contractile phenomena of polyelectrolyte gels. One-dimensional capillary model. *J. Phys. Chem.* **98**: 9583-7
- Gonzalez-Rodriguez ML, Olgado MA, Sanchez-Lafuente C, Rabasco AM, Fini A. (2002). Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *Int. J. Pharm.* **232**:225-234
- Goradel NH, Najafi M, Salehi E, Farhood B, Mortezaee K. (2018). Cyclooxygenase-2 in cancer: A review. *J. Cel. Physiol.* **234**(5): 5683-5699
- Grinsted RA, Clark L, Koenig IL. (1992) Study of Cyclic Sorption-Desorption into Poly (methyl methacrylate) Rods Using NMR Imaging. *Macromolecules.* **25**: 1235-1241
- Grosch S, Maier TJ, Schiffmann S, Geisslinger G. (2006). Cyclooxygenase 2 (COX-2) independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**: 736-747
- Gunder W, Lippold BH, Lippold BC,. 1995. Release of drugs from ethyl cellulose microcapsules (diffusion pellets) with pore formers and pore fusion. *Eur. J. Pharm. Sci.* **3**:203 - 214
- Gupta RA, Tejada LV, Tong BJ, Das SK, Morrow JD, Dey SK, Dubois RN. (2003). Cyclooxygenase-1 is overexpressed and promotes angiogenic growth factor production in ovarian cancer. *Cancer Res.* **63**: 906-911.
- Gupta BP, Thakur N, Jain NP, Banweer J, Jain S. (2010). Osmotically controlled drug delivery system with associated drugs. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **13**(3): 571-588
- Gupta R, Tripathi P, Bhardwaj P, Mahor A. (2018). Recent advances in gastro retentive drug delivery systems and its application on treatment of H. pylori infections. *J. Anal. Pharm. Res* **7**(4): 404-410



## H

- Hall SD, Rudy AC, Knight PM, Brater DC. (1993). Lack of presystemic inversion of ( R )-to (S)-ibuprofen in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**: 393-400
- Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staianocoico L, Shiff SI, Rigas B. (1996). Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent path-way. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 237-245
- Harris R, Chlebowski RT, Jackson RD, Frid DJ, Ascenseo JL, Anderson G, Loar A, Rodabough RJ, White E, McTiernan A, (2003) "Women's Health Initiative Breast cancer and nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prospective results from the Women's Health Initiative". *Cancer Res.* **63**: 6096-6101
- Harris RE, Robertson FM, Abou-Issa JM, Farrar WB, Brueggemeier R. (1999). Genetic induction and up-regulation of cyclooxygenase (COX) and aromatase (CYP 19): an extension of the dietary fat hypothesis in breast cancer. *Med Hypotheses.* **52**: 291-292
- Hermann T.W. (1995). "Recent research on bioavailability of drugs from suppositories". *Int. J. Pharm.* **123**: 1-11
- Hermann TW, Glówka FK, Garret ER. (1993). Bioavailability of racemic ibuprofen and its lysinate from suppositories in rabbits. *J. Pharm. Sci.* **82**: 1102-1111
- Holme HK, Davidsen L, Kristiansen A, Smidsrød O (2008). Kinetics and mechanisms of depolymerization of alginate and chitosan in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers* **73**: 656-664
- Holme HK, Lindmo K, Kristiasen A, Smidsrød O. (2003). Thermal depolymerization of alginate in the solid state. *Carbohydrate Polymers* **54**: 431-438
- Hu S, Tsai C, Liao C, Liu D, Chen S. (2008). Controlled rupture of magnetic polyelectrolyte microcapsules for drug delivery. *Lagmuir* .**24**(20): 11811-11818
- Hua S. Marks E, Schneider JJ, Keely S. (2015). Advances in oral nano-delivery systems for colon targeted drug delivery in inflammatory bowel disease: Selective targeting to diseased versus healthy tissue. *Nanomedicine.* **11**: 1117-1132
- Huang X, Voit B. (2013). Progress on multi-compartment polymeric capsules. *Polym. Chem.* **4**(3): 435-443
- Huang Y, Leobandung W, Foss A, Peppas NA. (2000). Molecular aspects of muco and bioadhesion: tethered structures and site specific surfaces. *J. Control. Release.* **65**(1-2):63-71
- Hutt AJ, Caldwell J. (1983). The metabolic chiral inversion of 2-arylpropionic acids.- a novel route with pharmacological consequences. *J. Pharm. Pharmacol.* **35** (11): 693-704
- Hwang SJ, Rhee GJ, Lee KM, Oh KH, Kim CK. (1995). Release characteristics of ibuprofen from excipient-loaded alginate gel beads. *Int. J. Pharm.* **116**:125-128

## I

- ICH Q8 (2009). Guidance for Industry Q8 Pharmaceutical development.
- Illum L, Farraj NF, Davis SS. (1994). Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drgs. *Pharm. Res.* **11**:1186-1189
- Illum L. (1998). Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharm. Res.* **15**: 1326-1331
- Irvine J, Afrose A, Islam N (2018). Formulation and delivery strategies of ibuprofen: challenges and opportunities. *Drug. Dev. and Ind. Pharm.*, **44**(2):173-183
- Ishak RA, Awad GA, Mortada ND, Nour SA. (2007). Preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of stomach-specific metronidazole-loded alginate beads as local anti-helicobacter pylory therapy. *J. Control. Release.* **119**: 207-214
- Islam N, Ferro V. (2016). Recent advances in chitosan-based nanoparticulate drug delivery. *Nanoscale* **8**: 14341-14358
- Ito Y, Casolaro M, Kono K, Imanishi Y. (1989). An insulin-releasing system that is responsive to glucose. *J. Control. Release.* **10**(2): 195-203
- Itoh Y, Matsusaki M, Kida T, Akashi M, (2008). Locally controlled release of basic fibroblast growth factor from multilayered capsules. *Biomacromolecules* **9**(8): 2202-2206

## J

- Jain KK. (2008). Drug Delivery Systems (Cap 1 Drug Delivery Systems- an overview). *Methods in molecular biology* **437**: 1-49
- Jalil R, Nixon JR. (1990). Biodegradable poly(lactic acid) and poly (lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. *J. of Microencapsulation* **7**(3): 297-325
- Jamali F, Mehvar R, Rusell AS, Sattari S, Yakimets WW, Koo J. (1992). "Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formulations: intestinal chiral inversion". *J. Pharm. Sci.*, **81**: 221-225
- Jamali F, Singh NN, Pasutto FM, Rusell AS, Coutts RT. (1988). Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in humans following oral administration of tablets with different absorption rates. *Pharm. Res.* **5**: 40-43
- Jamali F, Mehvar R, Passutto FM, (1989). Enantioselective aspects of drug action and disposition: therapeutic pitfalls. *J. Pharm. Sci.* **78**: 695-715
- Jamali F, Mehvar R, Russell AS, Sattari S, Yakimets WW, Koo J. (1992). "Human pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formula- tions: intestinal chiral inversion. *J. Pharm. Sci.* **81**: 221 – 225

Jana S, Trvedi MK, Tallapragada RM, Branton A, Trivedi D, Nayak G, Mishra R. (2015). Characterization of physicochemical and thermal properties of chitosan and sodium alginate after biofield treatment. *Pharm. Anal. Acta.* **6**(10): 1-9

Jang TJ, Jung HG, Jung KH, O MK. (2002). Chemopreventive effect of celecoxib and expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 on chemically-induced rat mammary tumours. *Int. J. Exp. Path.* **83**: 173–182

Janssen A., Schiffmann S., Birod K., Maier TJ., Wobst I., Geisslinger G., Grosch S. (2008). p53 is important for the anti-proliferative effect of ibuprofen in colon carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **365**: 698-703

Jeffrey PH., Tucker GT, Bye A, Creve HK, Wrigh, PA. (1991). The site of inversion of R(-)-ibuprofen: studies using rat in-situ isolated perfused intestine / liver preparations. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 715–720

Jones DS, Lorimer CP, McCoy CP. ((2008). Characterization of the physicochemical, antimicrobial, and drug release properties of thermoresponsive hydrogel copolymers designed for medical device applications. *J. Biomed Mater Res.* **85**: 417-426

Joshi S, Patel P, Lin S, Madan PL. (2012). Development of cross-linked alginate spheres by ionotropic gelation technique for controlled release of naproxen orally. *Asian J. Pharm. Sci.* **7**(2):134-142

Jyothi NV, Prasanna PM, Sakarkar SN, Prabh KS, Ramaiah PS and Srawan GY. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* **27**:187–197

## K

Kailasapathy K. (2009). Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture. *Vet. Sci. Nutr. Nat. Resources*, **4**: 1-19.

Kamel S, Ai N, Jahangir K, Shah SM, El-Gendy AA. (2008). Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *Express Polymer Letters* **2**(11): 758-778.

Kargman SL, O'Neill GP, Vickers PJ, Evans JF, Mancini JA, Jothy S. (1995). Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.* **55** (12): 2556-2559

Kashyop N., Kumar N., Ravi Kumar M.N.V. (2005). Hydrogels for pharmaceutical and Biomedical Applications. *Therapeutic Drug Carrier Systems* **22**(2): 107-150.

Katchalsky A. (1949) "Rapid swelling and deswelling of reversible gels of polymeric acids by ionization". *Experimentia* **5**: 319-320

Katchalsky A., Michaeli I (1955). Polyelectrolyte gels in salt solution. *J. Polym. Sci* **15**: 69-86

- Kawashima, Y., Lin, S.Y., Kasai, A., Handa, T., Takenaka, H., (1985). Preparation of a prolonged release tablet of aspirin with chitosan. *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 2107-2113
- Kawashima Y, Niwa T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh Y. (1989). Preparation of prolonged-release spherical micro-matrix of ibuprofen with acrylic polymer by the emulsion-solvent diffusion method for improving bioavailability. *Chem. Pharm. Bull.* **37**:425-429
- Kawashima Y, Iwamoto T, Niwa T, Takeuchi H, Itoh Y. (1991). Preparation and characterisation of a new controlled release ibuprofen suspension for improving suspendibility. *Int. J. Pharm.* **75**:25-36
- Kawashima Y, Niwa, T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh Y. (1989). Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with an acrylic polymer by novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *J. Pharm. Sci.* **78**:68-72
- Kawashima Y, Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Itoh Y. (1992). Controlled of prolonged drug release and compression properties of ibuprofen microsponges with acrylic polymer, Eudragit RS, by changing their intra-particle porosity. *Chem. Pharm. Bull.* **40**:196 - 201
- Kawashima Y, Iwamoto T, Niwa T, Takeuchi H, Hino T. (1993). Size control of ibuprofen microspheres with an acrylic polymer by changing the pH in an aqueous dispersion medium and its mechanism. *Chem. Pharm. Bull.* **41**:191 - 195
- Kelley EG, Albert JN, Sullivan MO, Epps TH (2013). Stimuli-responsive copolymer solution and surface assemblies for biomedical applications. *Chem. Soc. Rev.* **42**(17): 7057-7071
- Klenke F, Gebhard M, Ewerbeck V, Abdollahi A, Huber P, Sckell A. (2006) "The selective Cox-2 inhibitor Celecoxib suppresses angiogenesis and growth of secondary bone tumors: an intravital microscopy study in mice". *BMC Cancer* **6**: 1-8.
- Klouda L, Mikos AG. (2008). Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* **68**(1): 34-45.
- Kofuji K, Shibata K, Murata Y, Miyamoto E, Kawashima S. (1999). Preparation and drug retention of biodegradable chitosan gel beads. *Chem. Pharm. Bull.* **47**(10): 1494-1496.
- Kono K, Nishihara Y, Takagishi T. (1995). Photoresponsive permeability of polyelectrolyte complex capsule membrane containing triphenylmethane leucohydroxide residues. *J. Apply. Polym. Sci.* **56**(6): 707-713.
- Kono K, Tabata F, Takagishi T. (1993). pH-responsive permeability of poly (acrylic acid)-poly (ethylenimine) complex capsule membrane. *J. Membrane Sci.* **76** (2-3), 233-243.
- Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker EM, Buri P, Peppas NA. 1983. Mechanism of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* **15**:25-35
- Kubota N, Kikuchi Y. (1999). Macromolecular complexes of chitosan Polysaccharides: Structural Diversity and Functional Versatility (ed. S. Dimitrius), pp 595 - 628.
- Kumar G, Gupta GD. (2009). Development of in vitro evaluation of osmotically controlled oral drug delivery system of carvedilol. *Int. J. Pharm. Sci. Drug Res.* **1** (2): 80-82

Kumar MN. (2000). A review of chitin and chitosan application. *Reactive and functional polymers* **46**(1): 1-27

Kumar MNV, Muzzarelli RA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *J. Chem. Rev.* **104**(12): 6017-6084.

Kumaresan C. (2010). S+ ibuprofen (dexibuprofen): The superior non steroidal antiinflammatory agents for development of pharmaceutical. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* **2** (3): 1-3

Kumudhavalli MV, Chandira M, Sripriya D, Jayakar B. (2010). Studies on synthesis, method development, characterization and antimicrobial activities of ibuprofen lysinate. *Int. J. Pharma Bio. Sci.*, **1**(2): 1- 25,

Kwon IC, Bae YH, Okano T, Kim SW. (1991). Drug release from electric current sensitive polymers. *J. Control. Release* **17**: 149–56.

## L

Lachman L, Liberman HA, Kanig JL. (1986). *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lea & Febiger, Philadelphia: 171-195.

Leahy KM, Koki AT, Masferrer JL. (2000). Role of cyclooxygenases in angiogenesis. *Current Medicinal Chemistry* **7**: 1163-1170.

Lee SH., Bajracharya R., Min JY., Han J-W., Park BJ., Han H-K (2020). "Strategic approaches for colon targeted drug delivery: an overview of recent advancements". *Pharmaceutics* **12** (68): 1-20

Lee SY, Tae G. (2007). Formulation and in vitro characterization of an in situ gelable, photopolymerizable Pluronic hydrogel suitable for injection. *J. Control. Release.* **119**: 313–9

Legg TJ, Laurent AL, Leyva R, Kellstein D. (2014). Ibuprofen sodium is absorbed faster than Standard ibuprofen tablets: Results of two open-label, randomized, crossover pharmacokinetic studies. *Drugs* **14**:283-290

Lendlein A. Shastri VP. (2010). Stimuli-sensitive polymers. *Adv. Mater* **22**(31): 3344-3347

LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. (1999). Compressive and shear properties of alginate gel: effects of sodium ions and alginate concentration. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**: 46–53.

Li X. (1996). The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **23**(3): 69-272.

Li,G, Treiber G, Maier K, Walker S, Klotz U. (1993). Disposition of ibuprofen in patients with liver cirrhosis. Stereochemical considerations. *Clin. Pharmacokin.* **25**: 154 –163.

Liew CV, Chan L.W, Ching AL, Sia Heng PW. (2006). Evaluation of sodium alginate as drug release modifier matrix tablets. *Intern. J. Pharm.* **309** (1-2): 25-37.

- Lim LY, Khor E, Koo O. (1998). Gamma irradiation of chitosan. *Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **43**: 282-290.
- Lipatov YS. (2002). Polymer blends and interpenetrating polymer networks at the interface with solids. *Progr. Pol. Sci.* **27**: 1721-1801.
- Lira AA, Rossetti FC, Nanclares DM, Neto AF, Bentley MV, Marchetti JM. (2009). Preparation and characterization of chitosan-treated alginate microparticles incorporating all trans retinoic acid. *J. Microencapsulation* **26**(3): 243-50
- Liu L, Wang W, Ju XJ, Xie R, Chu LY. (2010). Smart thermo-triggered squirting capsules for nanoparticle delivery. *Soft Matter*. **6**(16): 3759-3763
- Liu YH, Zhu X, Zhou D, Jin Y, Zhao CY, Zhang ZR, Huang Y. (2011). pH-sensitive and mucoadhesive microspheres for duodenum-specific drug delivery system. *Drug Develop. Ind. Pharm.* **37**(7): 868-874
- Liu L, Yang JP, Ju XJ, (2011). Monodisperse core-shell chitosan microcapsules for pH-responsive burst release of hydrophobic drugs. *Soft Matter*. **7**(10): 4821-4827
- Liu Z, Liu L, Ju XJ, Xie R, Zhang B, Chu LY. (2011). Recognition capsules with squirting release mechanisms. *Chem. Commun.* **47**(45), 12283-12285
- Liu Z, Wang W, Xie R, Ju XJ, Chu LY. (2016). Stimuli-responsive smart gating membranes. *Chem. Soc. Rev.*; **45**: 460-475
- Lockwood GF, Albert KS, Gillespie WR, Bole GG, Harkcom TM, Szpunar GJ, Wagner JG. (1983). Pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/ dose relationship. *Clin. Pharmacol. Ther.* **34**: 97-103.
- Logan RF, Little J, Hawtin PG. (1993). Effect of aspirin and non-steroidal anti-inflammatory drugs on colorectal adenomas: case-control study of subjects participating in the Nottingham faecal occult blood screening programme. *BMJ*. **307**: 285-9.
- Lu S, Anseth KS. (2000). Release behaviour of high molecular weight solutes from poly(ethyleneglycol)-based degradable networks. *Macromolecules* **33**(7): 2509-2515
- Lucinda-Silva RM, Nunes Salgado HR, Evangelista RC (2010). Alginate-chitosan systems: In vitro controlled release of triamcinolone and in vivo gastrointestinal transit. *Carbohydrate Polymers* **81**: 260-268
- Lugano R., Ramachandran M, Dimberg A. (2020). Tumor angiogenesis: cause, consequences, challenges and opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**: 1745-1770.

## M

- Ma Y, Dong W, Hempenius M, Mohwald H, Vaneso G. (2006). Redox-controlled molecular permeability of composite-wall microcapsules. *Nature Matter* **5**(9): 724-729.
- Mahadevan U. (2004). Medical treatment of ulcerative colitis. *Clin Colon Rectal Surg.* **17**(1): 7-19.
- Mahkam M, Allahverdipour M, Mohammadi R, Ranaei-siadat SO, Rashidi MR, Davaran S, Barshan M, Ranaei-Siadat SE. (2006). A designed oral delivery system for insulin. *J. Bioact. Comp. Polym.* **21**: 135-48.
- Maier TJ, Schilling K, Schmidt R, Geisslinger G, Grösch S. (2004). Cyclooxygenase-2 (COX-2)-dependent and independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**: 1469-1478.
- Manna U. Patil S. (2010). Glucose-triggered drug delivery from borate mediated layer-by-layer self-assembly. *ACS Appl. Mater Interfaces.* **2**(5): 1521-1527
- Matsushashi N, Nakajima A, Fukushima Y, Yazaki Y, Oka T. (1997). Effects of sulindac on sporadic colorectal adenomatous polyps. *Gut.* **40**(3): 344-349
- McCauley (1991). Detection and characterization of polymorfism in the pharmaceutical industry. *Am. Inst. Chem. Eng. Symp. Ser.* **87**: 58-63.
- Mehlich DR, Jasper RD, Brown P, Korn SH, McCarroll K, Murakami AA. (1995). Comparative study of ibuprofen lysine and acetaminophen in patients with postoperative dental pain. *Clin. Ther.* **17**: 852-860
- Miles L, Hall J, Jenner B, Addis R, Hutchings S. (2018). Predicting rapid analgesic onset of ibuprofen salts compared with ibuprofen acid:  $T_{lag}$ ,  $T_{low}$ ,  $T_{med}$ , and a novel parameter,  $T_{C_{maxref}}$ . *Curr. Med. Res. Opin.* **34** (8): 1483-1490.
- Miyazaki S, Yokouchi C, Takada M. (1988). External control of drug release controlled release of insulin from a hydrophilic polymer implant by ultrasound irradiation in diabetic rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **40** (10): 16-17
- Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J. (2011). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. *Pharmaceutical Press.*
- Molina M, Asadian-Birjand M, Balach J. (2015). Stimuli responsive nanogel composites and their application in nanomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **44**(17): 6161-6186
- Monteiro OA, Airoidi C. (1999). Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous System. *Int. J. Biol. Macr.* **26**: 119-128
- Montgomery DC. (2012). Design and analysis of experiments. third edition. John Willey and Sons Inc, Somerset, NY, USA.
- Moo-Huh K., Chang-Hang H., Ju-Lee Y. Han-Bae Y. (2012). pH-Sensitive Polymers for Drug Delivery. *Macromol. Res.* **20** (3): 224-233

- Motornov M, Roiter Y, Tokarev I, Minko S. (2010). Stimuli-responsive nanoparticles, nanogels and capsules for integrated multifunctional intelligent systems. *Prog. Polym. Sci.* **35** (1-2): 174-211
- Murata Y, Tsumoto K, Kofugi K, Kawashima S. (2003). Effects of natural polysaccharide addition on drug release from calcium-induced alginate gel beads. *Chem. Pharm. Bull.* **51** (2): 218-220
- Murdan S. (2003). Electro-responsive drug delivery from hydrogels. *J. Control. Release.* **92**: 1-17.
- Muzzarelli RA. (1985) In the polysaccharides Aspinall G.O. Ed. Academic Press New York Vol3.
- Muzzarelli RA. (1997). Depolymerization of chitin and chitosan with hemicellulose, lysozyme, papain and lipases. In Muzzarelli RAA Martin GP (Eds) Chitin Handbook Atec. Grottammare 153-163
- Muzzarelli RA. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* **76** (2): 167-182
- Muzzarelli RA, Ilari P. (1994). Chitosan carrying the methoxyphenyl function typical of lignin. *Carbohydrate polymers* **23**(3): 155-160

## N

- Nakamura Y, Yamaguchi T. (1987). Stereoselective metabolism of 2-phenylpropionic acid in rat. I. In vitro studies on the stereoselective isomerization and glucuronidation of 2-phenylpropionic acid. *Drug Metab. Disp.*, **15**: 529-534.
- Naeem M, Choi M, Cao J, Lee Y, Ikram M, Yoon S, Lee J, Moon HR, Kim M, Jung Y, Yoo J. (2015). Colon-targeted delivery of budesonide using dual pH and time-dependent polymeric nanoparticles for colitis therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* **9**: 3789-3799.
- Navarro-Verdugo AL, Goyocoolea FM, Romero-Meléndez G, Higuera-Ciapara I, Argüelles-Monal W. (2011). A modified Boltzman sigmoidal model for the fase transition of smart gels. *Soft Matter* **7**: 5847-5853.
- Nelson JE, Harris RE. (2000). Inverse association of prostate cancer and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): results of a case-control study. *Oncol. Rep.* **7**(1): 169-239.
- Neupert W, Brugger R, Brune K, Geisslinger G. (1997). Stereoselective inhibition of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 by ibuprofenoyl-CoA-thioesters and ibuprofen enantiomers. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **355**, Suppl., R127.
- Newton A, Prabakaran L, Jayaveera K. (2012). Pectin-HPMC E15LV vs. pH sensitive polymer coating films for delayed drug delivery to colon: A comparison of two dissolution models to assess colonic targeting performance in-vitro. *Int. J. Appl. Res. Nat. Prod.*, **5**: 1-16.
- Nishimura S, Nishi N, Tokura S, Nishimura K, Azuma I. (1986). In Chitin in Nature and Technology, eds R. A. A. Muzzarelli, C. Jeuniaux & G. W. Gooday, Plenum Press, New York.



New N. (2002). Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction. *Biotechnology Letters* **24**(2): 131-134.

Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, Evans DF. (2001). Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosalicylates and other drugs. *Gut* **48**: 571-577.

## O

Obeidat WM, Abuznait AH, Al-Sayed AS. (2010). Sustained release tablets containing soluble polymetacrylates: comparison with tableted polymethacrylate IPEC polymers. *AAPA PharmSciTech*, **11** (1): 54-63

Ochs CJ, Such GK, Yan Y, Van-Koeverden MP, Caruso F. (2010). "Biodegradable click capsules with engineered drug-loaded multiulayers. *ACS Nano* **4**(3): 1653-1663

Ofokansi KC, Kenechukwu FC. (2013). Formulation development and evaluation of drug release kinetics from colon targeted ibuprofen tablets based on Eudragit RL 100 chitosan interpolyelectrolyte complexes. *ISRN Pharm.* 1-8

Okahata Y, Ariga K, Seki T. (1986). Redox-sensitive permeation from a capsule membrane grafted with viologen-containing polymers. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1**: 73-75.

Okahata Y, Lim HJ, Nakamura G, Hachiya S. (1983). A large nylon capsule coated with a synthetic bilayer membrane. Permeability control of NaCl by phase transition of the dialkylammonium bilayer coating. *J. Am. Chem. Soc.* **105**: 4855-4859

Okahata Y, Lim HJ, Hachiya S. (1983). Photoresponsible capsule membranes. Permeability control of NaCl from a nylon capsule coated with a synthetic bilayer membrane containing an azo-chromophore. *Macromol. Chem. Rapid Commun.* **4**(5): 303-306

Okahata Y, Noguchi H, Seki T. (1986). Thermoselective permeation from a polymer-grafted capsule membrane. *Macromolecules* **19**(2): 493-494

## P

Pasparakis G, Bouropoulos N. (2006). Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *Int. J. Pharm.* **323**: 34-42

Patrono C. (2016). Cardiovascular effects of cyclooxygenase-2-inhibitors: a mechanistic and clinical perspective. *Br. J. Clin. Pharmacol* **82**(4): 957-964

Peleg II, Maibach HT, Brown SH, Wilcox CM. (1994). Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer. *Arch. Intern. Med.* **154**: 394-399.

Peleg II, Lubin MF, Cotsonis GA. (1996). Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and other chemopreventors and risk of subsequent colorectal neoplasia. *Dig. Dis. Sci.* **41**: 1319–1326.

Peppas NA, Khare AR, (1993). Preparation, structure and diffusional behaviour of hydrogels in controlled release. *Adv. Drug. Delivery Rev.* **11**: 1-35

Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50** (1): 27-46

Philip AK, Philip B. (2010). Colon targeted drug delivery systems: a review on primary and novel approaches. *OMJ* **25**: 70-78

Pi SW, Ju XJ, Wu HG, Xie R, Chu LY. (2010). Smart responsive microcapsules capable of recognizing heavy metal ions. *J. Colloid Interf. Sci.* **349**(2): 512-518

Pugh S, Thomas GA. (1994). Patients with adenomatous polyps and carcinomas have increased colonic mucosal prostaglandin E. *Gut.* **35**(5): 675-678

## Q

Qu JB, Chu LY, Yang M, Xie R, Hu L, Chen WM. (2006). A pH-responsive gating membrane system with pumping effects for improved controlled release. *Adv. Funct. Mater.* **16** (14): 1865-1872

## R

Radt B, Smith T, Caruso F. (2004). Optically addressable nanostructured capsules. *Adv. Matter.* **16** (23-24): 2184-2189

Rahaman M, Aldalbahi A, Govindasami P, Khanam NP, Bhandari S, Feng P, Altalhi T. (2017). A new insight in determining the percolation threshold of electrical conductivity for extrinsically conducting polymer composites through different sigmoidal models. *Polymers.* **9** (527): 1 - 17

Rainsford KD (1999a) History and development of ibuprofen. In: Rainsford KD (ed) *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. Taylor & Francis, London, pp 3-24

Rainsford KD (1999b) Pharmacology and toxicology of ibuprofen. In: Rainsford KD (ed) *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. Taylor & Francis, London, pp 145-275

Rainsford KD (1999c) Safety and efficacy of nonprescription (OTC) ibuprofen. In: Rainsford KD (ed) *Ibuprofen: a critical bibliographic review*. Taylor & Francis, London, pp 357-405

Rainsford KD. (2003). Discovery, mechanisms of action and safety of ibuprofen. *Int. J. Clin. Pract.* **135**:3-8

Rainsford KD. (2004). Side effects and toxicology of the salicylates. In: Rainsford KD (ed) *Aspirin and related drugs* Taylor & Francis, London 367-554

- Rainsford KD. (2004). Aspirin and related drugs. (Ed.) Taylor & Francis, London, pp 215-366
- Rainsford KD. (2013). Ibuprofen: from invention to an OTC therapeutic mainstay. *Int. J. Clin. Pract. Sup.* **178**: 9-20
- Randall E, Harris J, Beebe-Donk J, Hani Doss D. (2005). Aspirin, ibuprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: A critical review of non-selective COX-2 blockade. *Oncol. Rep.* **13(4)**: 559-583
- Ray D, Gils S, Mohanta GP, Manavalan R, Sahoo PK. (2010). Comparative delivery of diltiazem hydrochloride through synthesized polymer: hydrogel and hydrogel microspheres. *J. Appl. Polym. Sci.* **116**: 959-968.
- Reddy BS, Rao CV, Seibert K. (1996). Evaluation of cyclooxygenase 2 inhibitor for potential chemopreventative properties in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **56**: 4566-9
- Reimers MS, Bastiaannet E, van Herk-Sukel MP. (2012). Aspirin use after diagnosis improves survival in older adults with colon cancer: a retrospective cohort study. *J. Am. Geriatr. Soc.* **60**: 2232-2236
- Reséndiz-Muñoz J, Corona-Rivera MA, Fernández-Muñoz JL, Zapata-Torres M, Márquez-Herrera A, Ovando-Medina V. (2017). Mathematical model of Boltzmann's sigmoidal equation applicable to the set-up of RF-magnetron co-sputtering in thin films deposition of  $Ba_xSr_{1-x}TiO_3$ . *Bull. Mater. Sci.* **40(5)**: 1043-1047
- Ricchi P, Zarrilli R, di Palma A, Acquaviva AM. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br. J. Cancer.* **88**: 803-807
- Ricka J, Tanaka T. (1984). Swelling of ionic gels: quantitative performance of the Donnan theory. *Macromolecules* **17**: 2916-2921
- Rigas B, Goldman IS, Levine L. (1993). Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J. Lab. Clin. Med.* **122**: 518-523
- Rinaki E, Valsami G, Macheras, P. (2003). The power law can describe the 'entire' drug release curve from HPMC-based matrix tablets: A hypothesis. *Int. J. Pharm.* **255**:199-207.
- Ritger PL, Peppas NA. (1987). A simple equation for description of solute release. I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, sphere, cylinders or discs. *J. Control. Release.* **5**: 23-36
- Roberts GA. (1992). Structure of chitin and chitosan. *Chitin chemistry* 1-53
- Rosas C, Sinning M, Ferreira A, Fuenzalida M, Lemus D. (2014). Celecoxib decreases growth and angiogenesis and promotes apoptosis in a tumor cell line resistant to chemotherapy. *Biological Research* **47(27)**: 1-9.
- Rubinstein A, Tirosh B, Baluom M. (1997). The rationale for peptide drug delivery to the colon and the potential of polymeric carriers as effective tools. *J. Cont. Rel.* **46**: 59-73
- Rubinstein M, Colby RH, Dobryni AV, Joanny JF. (1996). Elastic modulus and equilibrium swelling of polyelectrolyte gels. *Macromolecules.* **29**:398-426

Rudy AC, Knight PM, Brater DC, Hall SD, (1991). Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: administration of *R*-, *S*- and racemic ibuprofen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**: 1133–1139.

Ruel-Gariépy E, Leroux JC. (2004). In situ-forming hydrogels-review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**(2): 409-426

## S

Sabnis S, Block LH. (1997). Improved infrared spectroscopic method for the analysis of degree of N-deacetylation of chitosan. *Polymer Bulletin* **39**: 67-71

Saffran, M, Kumar GC, Savariar C, Burnham JC, Williams F, Neckers DC. (1986). A new approach to oral administration of insulin and other peptide drugs. *Science* **233**: 1081–4.

Salaün F, Bedek G, Devaux E, Dupont D, Gengembre L. (2011). Microencapsulation of a cooling agent by interfacial polymerization: influence of the parameters of encapsulation on poly(urethane-urea) microparticles characteristics. *J. Membrane Science* **379**: 23-33

Sandford P. (1989) Chitosan: Commercial uses and potential applications. pp. 51-69. In: G. Skjak-Braek, T. Anthosen, and P. Standford (eds.). Chitin and Chitosan. Sources, Chemistry, Biochemistry. Physical Properties and Applications. Elsevier Applied Science. New York, USA. 835 p.

Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res.* **55**: 3785–3789.

Schettler T, Paris S, Pellett M, Kidner S, Wilkinson D. (2001). Comparative pharmacokinetics of two fast-dissolving oral ibuprofen formulations and a regular-release ibuprofen tablet in healthy volunteers. *Clin. Drug Invest.* **21**(1): 73–78.

Schmaljohann D. (2006). Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **58**(15): 1655-1670

Segale L, Giovanelli L, Mannina P, Pattarino F. (2016). Calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads containing celecoxib solubilized in a self-emulsifying phase. *Scientifica.* 2016:1-8

Seki T, Okahata Y. (1984). pH sensitive permeation of ionic fluorescent probes from nylon capsule membranes. *Macromolecules* **17**(9): 1880-1882

Senel S, Ikinç G, Kas S, Yousef-Rad A, Sargon MF, Hincal AA. (2000). Chitosan films and hydrogels of chlorhexidine gluconate for oral mucosa delivery. *Int. J. Pharm.* **193**(2): 197-203

Senel S, Kremer MJ, Kas S, Wertz PW, Hincal AA, Squier CA. (2000). Enhancing effect of chitosan on peptide drug delivery across buccal mucosa. *Biomaterials* **21**: 2067-2071

Sengha SS, Anderson AJ, Hacking AJ, Dawes EA. (1989). The production of alginates by *Pseudomonas mendocina* in Batch and continuous culture. *J. Gen. Microbiol.* 135: 795-804.

- Sevcik C. (2017). Caveat on the Boltzmann distribution function in biology. *Prog. Bioph. Mol. Biol.* **127**: 33-42
- Sheetal SP, Robert DT, Todd MP. (2009). Poly(ethylene glycol)-modified proteins: implications for poly(lactide-co-glycolide)-based microsphere delivery. *The AAPS Journal* **11**(1): 88-98.
- Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RJ and DuBois RN (1997). Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. clin. Invest.* **99**: 2254–2259.
- Sheng J, Sun H, Yu FB, Li B, Zhang Y, Zhu YT. (2020). The role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Int. J. Med. Sci* **17**(8): 1095-1101.
- Sheskey P. (2017). Handbook of pharmaceutical excipients 9th Ed. Pharmaceutical Press.
- Shi J, Alves NM, Mano JF. (2007). Chitosan coated alginate beads containing poly(N-isopropylacrylamide) for dual-stimuli-responsive drug release. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* **84B**: 595-603.
- Shivashanka M, Mandal BK. (2012). A review on interpenetrating polymer network. *Int. J. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4** (Suppl. 5): 1-7.
- Shukla S, Bajpai AK, Bajpai J. (2003). Swelling controlled delivery of antibiotic from a hydrophilic macromolecular matrix with hydrophobic moieties. *Macromolecular Research* **11** (4): 273-282.
- Siegel RA, Firestone BA. (1988). pH-dependent equilibrium swelling properties of hydrophobic polyelectrolyte copolymer gels. *Macromolecules* **21**: 3254-3259
- Silva CM, Ribeiro AJ, Ferreira D, Veiga F. (2006). Insulin encapsulation in reinforced alginate microspheres prepared by internal gelation. *Eur. J. Pharm. Sciences.* **29**: 148-159
- Singh B, Mehta G, Kumar R, Bhatia A, Ahuja N, Katare OP. (2005). Design, development and optimization of nimesulide-loaded liposomal systems for topical application. *Curr. Drug. Deliv.* **2**(2): 143-153.
- Singh MN, Hemant KS, Ram M, Shivakumar HG. (2010). Microencapsulation: A promising technique for controlled delivery. *Res. Pharm. Sci.* **5**(2): 65-77
- Singla AK, Chawla M. (2001). Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects: an update. *J. Pharm. Pharmacol.* **53**(8): 1047-67
- Skaugrud O, Hagen A, Borgersen B, Dornish M. (1999). Biomedical and Pharmaceutical Applications of alginate and chitosan. *Biotechnol. Gen. Engin. Rev.* Vol 16
- Skouri R, Schoessler F, Munch JP, Candau SJ. (1995). Swelling and elastic properties of polyelectrolyte gels. *Macromolecules* **28**: 197-210
- Soares JP, Santos JE, Chierie GO, Cavalheiro ET. (2004). Thermal behavior of alginate acid and its sodium salt. *Ecl. Quim.* **29**(2):53-56

- Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. (2010). The role of cyclooxygenase-2 in Cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int. J. Cell. Biol.* Vol 2010: 1-19
- Smidsrød O, Haug A, Larsen B. (1963). Degradation of alginates in the presence of reducing compounds. *Acta. Chem. Scand.* **17**: 2628-2637.
- Sooriakumaran P. (2006). COX-2 inhibitors and the heart: are all coxibs the same?. *Postgrad. Med. J.* **82**: 242-245.
- Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. (2013). A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *Eur. J. Pharm. Sci.* **48**: 416-427
- Steinbach G, Lynch PM, Phillips RK. (2000). The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* **342**: 1946–1952.
- Streubel A, Siepmann JB, Bodmeier R. (2006). Gastroretentive drug delivery systems. *Expert Opin. Drug Deliv.* 3(2): 217-33
- Struszczyk H. (1987). Microcrystalline chitosan. I. Preparation and properties of microcrystalline chitosan". *J. Appl. Polymer Science.* 33(1):77-89
- Stuart MA, Huck WT, Genzer J. (2010). Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nat. Mater.* **9**(2); 101-113.
- Suave J, Dall'Agnol EC, Pezzin AP, Silva DA, Meier MM, Sold V. (2006). Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal* **7** (2): 12-20
- Swillens S. 1995. Interpretation of binding curves obtained with high receptor concentrations: Practical aid for computer analysis. *Molecular Pharmacology.* 47:1197 - 1203
- Szweda M, Rychlik A, Babinska I, Pomianowski A. (2019). Significance of cyclooxygenase-2 in oncogenesis. *J. Vet. Res.* **63**: 215-224

## T

- Takeda N, Nakamura E, Yokoyama M. (2004). Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses. *J. Control. Release.* **95**: 343-355
- Takemoto Y, Ajiro H, Asoh TA, Akashi M. (2010). Fabrication of surface modified. Hydrogels with polyion complex for controlled release. *Chem. Mater.* **22**: 2923–9.
- Takka S, Gurel A. (2010). Evaluations of chitosan /alginate beads using experimental design: Evaluation and *in vitro* characterisation. *AAPS PharmSciTech.* 11(1): 460 - 466
- Takka S, Ömer HO, Acartürk. Formulation and investigation of nicardipine HCl-Alginate gel beads with factorial design-based studies (1998). *Eur. J. Pharm. Sci.* 6(3):41-46
- Tanaka IN, Nishio I, Sun ST, Ueno NS. (1982). Collapse of gels in an electric field. *Science* **218**: 467–9.

- Tanaka T, Ishiwata S, Ishimoto. (1977). Critical behavior of density fluctuations in gels. *Phys. Rev. Lett.* **38**:771-774
- Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Hashemi-Najafabadi S (2013). The effect of polymer and CaCl<sub>2</sub> concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan beads. *Progress in Biomaterials.* **2**:10 (1-8)
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW. (1991). Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **325**: 1593–1596.
- Tsujii M, Kawano S, Tokarev J, Minko S. (2010). Stimuli-responsive porous hydrogels at interfaces for molecular filtration, separation, controlled release, and gating in capsules and membranes. *Adv. Mater.* **22**(31): 3446-3462
- Tommes M, Kleinenbude P. (2006). Use of Kappa-carrageenan as alternative pelletisation aid to microcrystalline cellulose in extrusion. I. Influence of type and fraction of filler. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **63**(1): 59-67
- Tomozawa S, Nagawa H, Tsuno N, hatano K, Osada T, Kitayama J, Sunami E, Nita ME, Ishihara S, Yano H, Tsuruo T, Shibata Y, Muto T. (1999). Inhibition of haematogenous metastasis of colon cancer in mice by a selective COX-2 inhibitor, JTE-522. *Br. J. Cancer.* **81**(8): 1274–1279.
- Tonnesen HH, Karlsen J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **28**(6): 621-630.
- Topping DL, Clifton PM. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol.* **81**: 1031-1064.
- Traitel T, Goldbart R, Kost J. (2008). Smart polymers for responsive drug-delivery systems. *J. Biomater. Sci. Polymer* **19** (6): 755-767.
- Tsuchida E., Abe K. (1982). Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes. *Adv. Polymer Sco:* **45**:1-119
- Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. (1998). Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, **93**(5): 705-716.
- Tucker GT, Lennard MS. (1990). Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmacology and Therapeutics* **45**: 309–329.

## V

- Vachoud L, Zydowicz N, Domard A. (2000). Physicochemical behaviour of chitin gels. *Carbohydrate Research* **326** (4): 295-304
- Van der Graaf S, Schroen CG, Boom RM. (2005). Preparation of double emulsions by membrane emulsification-a review. *J. Membrane Sci.* **251** (1-2): 7-15

Venkata N, Jyothi N, Muthu-Prasanna P, Narayan-Sakarkar S, Surya-Prabha K, Seetha- Ramaiah P, Srawan GY. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *J. Microencapsul.* **27** (3): 187-197.

Venktesan P, Manavalan R, Valliappan K. (2009). Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *J. Pharm. Sci. & Res.* **1**(4): 26-35.

Verma RK, Kausdal AM, Garg S. (2003). Development and evolution of extended release formulations of isosorbide mononitrate based on osmotic technology. *Int. J. Pharm.* **263** (1-2): 9-24.

Vidhyalakshmi R, Bhakayaraj R, Subhasreey RS. (2009). Encapsulation: The Future of Probiotics. A Review. *Adv. Biol. Res.*, **3**: 96-103.

Vladiskovic C i Masciocchi N, (2015) Reversibly changing a painkiller structure: A hot topic for a cold case – Ibuprofen Lysine salt. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 107:394-402

## W

Wandera D, Wichramasinghe SR, Husson SM. (2010). Stimuli-responsive membranes. *J. Memb. Sci.* **357**: 6-35.

Wang FQ, Li P, Zhang JP, Wang AQ, Wei Q. (2011). pH-sensitive magnetic alginate-chitosan beads for albendazole delivery. *Pharm. Develop. Technol.* **16**(3): 228-236

Wang W, Liu L, Ju XJ. (2009). A novel thermo-induced self-bursting microcapsule with magnetic-targeting property. *ChemPhysChem* **10**(14): 2405-2409

Wang W, Xu Deshi. (1994). Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation. *Int. J. Biol. Macrom.* **16** (3): 149-152.

Wang W, Zhang MJ, Chu LY. (2014a). Functional polymeric microparticles engineered from controllable microfluidic emulsions". *Chem. Res.* **47**(2): 373-384

Wang W, Zhang MJ, Chu LY. (2014b). Microfluidic approach for encapsulation via double emulsions. *Curr. Opin. Pharmacol.* **18**: 35-41

Wang D, DuBois RN. (2010). The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **29** (6): 781-788

Webber MJ, Anderson DG. (2015). Smart Approaches to Glucose-Responsive Drug delivery. *J. Drug Target.* **23**(7-8): 651–655.

Wilson N, Shah NP. (2007). Microencapsulation of vitamins. *Asian Food Journal* **14**(1): 1-14.

Wu K, White M, Khan MA. (2011). Quality-by-design: An integrated process analytical technology (PAT) approach for a dynamic pharmaceutical co-precipitation process characterization and process design space development. *Int. J. Pharm.* **405**:63-78



## X

Xiong B, Sun TJ, Yan HY, Hu MB, Hu WD, Cheng FL (2003). Cyclooxygenase -2-expression and angiogenesis in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **9**(6): 1237-1240.

## Y

Yamaguchi A, Ishida T, Nishimura G, Katoh M, Miyazaki I. (1991) Investigation of colonic prostaglandins in carcinogenesis in the rat colon. *Dis. Colon Rectum*, **34**: 572-576.

Yang WC, Xie R, Pang XQ, Ju XJ, Chu LY. (2008). Preparation and characterization of dual stimuli-responsive microcapsules with a superparamagnetic porous membrane and thermo-responsive gates. *J. Membrane Sci.* **321**(2): 324-330.

Yang HC, Hon MH (2010). The effect of the degree of deacetylation of chitosan nanoparticles and its characterization and encapsulation efficiency on Drug Delivery. *Polymer-plastics Technology and Engineering* **49**(12), 1292-1296.

Yao M, Zhou W, Sangha S, Albert A, Chang AJ, Liu TC, Wolfe MM. (2005) Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* **11**: 1618–1628.

Yeguín BA, Moulari B, Durlu-Kandilci NT, Korkusuz P, Pellequer Y, Lamprecht A. Sulindac loaded alginate beads for a mucoprotective and controlled drug release. *J. Microencapsul.* **24**(4): 371-382.

Yin RX, Tong Z, Yang DZ, Nie J. (2012). Glucose-responsive insulin delivery microhydrogels from methacrylated dextran/concanavalin A: preparation and in vitro release study". *Carbohydr. Polym.* **89**: 117–23.

Yoshihiro Ito, Mario Casolaro, Kenji Kono, Yukio Imanishi (1989). An-insulin-releasing system that is responsive to glucose. *J. Control. Release.* **10** (2): 195-203

Yu E., Kramarenko A, Khoklov AR. (1997). Collapse of polyelectrolyte macromolecules revisited. *Macromolecules* **30**: 3383-3388

Yurdasiper A, Sevgi F. (2010). An overview of modified release chitosan, alginate and Eudragit RS microparticles. *J. Chem. Pharm. Res.* **2**(3): 704-721

## Z

Zhou HY, Guan Chen X, Kong M, Sheng C, Cha DS, Kennedy JF (2008). Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydr. Polym.* **73**: 265-273

Zuidam NJ, Nedovic VA. (2010). Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing (pp. 3–29).