

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE NANO-EMULSIONS
DE FASE EXTERNA AQUOSA I SOLUBILITZACIÓ DE
FÀRMACS LIPÒFELS

Núria Sadurní Gràcia, 2006

3. EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALS

3.1.1. TENSIOACTIUS

3.1.1.1. TENSIOACTIUS NO IÒNICS

Cremophor® EL (BASF)

És un tensioactiu no iònic de tipus etoxilat obtingut de la reacció d'un mol d'oli de ricí amb trenta-cinc mols d'òxid d'etilè. El component principal és el ricinoleat de glicerina de polietilenglicol, juntament amb d'altres èsters d'àcids grassos de polietilenglicol, polietilenglicols lliures i etoxilats de glicerina (Handbook Pharm. Exc., 2005). És un líquid oliós de color groc clar i d'olor dèbil. El seu nombre HLB està comprès entre 12 i 14. Té una viscositat de 0,7-0,85 Pa.s i una densitat de 1,05-1,06 g/ml a 25°C. És soluble en aigua i també en diversos dissolvents orgànics com ara alcohol etílic, alcohol n-propílic, alcohol isopropílic, acetat d'etil, cloroform, entre d'altres (Handbook Pharm. Exc., 2005).

El Cremophor EL és estable en solucions aquoses tant àcides com salines poc concentrades. És estable fins a 300°C. Per evitar l'oxidació del tensioactiu es convenient emmagatzemar-lo en recipients ben tancats i protegits de la llum (BASFa, 2001).

Els derivats polioxietilenats d'oli de ricí s'utilitzen en formulacions farmacèutiques d'aplicació oral, tòpica i parenteral, així com en formulacions cosmètiques i en el camp de l'alimentació animal. En concret, el Cremophor EL s'usa principalment com a tensioactiu i agent solubilitzant i es particularment adequat per la preparació de formulacions líquides aquoses que continguin olis volàtils, vitamines liposolubles i principis actius hidrofòbics, com ara anestèsics, sedants, agents immunosupressors, entre d'altres (Macek, 1963; Webb, 1976; Gelderblom, 2001; Li, 2005).

El Cremophor EL no presenta toxicitat aguda en ser administrat per via oral ni tòpica ni per inhalació. No té acció irritant sobre la pell ni mucoses (solucions aquoses del 30% no irriteren mucoses). No s'han vist símptomes d'intoxicació en assajos d'alimentació realitzats durant 6 mesos. El

tensioactiu no presenta acció teratògena o embriotòxica. En casos aïllats i especials, s'ha vist que en l'administració per via parenteral de medicaments o vacunes tant per a ús veterinari com per a ús humà que contenen Cremophor EL en elevada concentració o tensioactius de composició similar l'aparició de reaccions anafilàctiques (Weiss, 1990; Rowinsky, 1993; Eisenhauer, 1994). No obstant, aquestes no han estat descrites en l'administració per via oral de medicaments que contenen Cremophor EL (BASFa, 2001; Handb. Pharm. Excip., 2005).

Solutol® HS 15 (BASF)

Tensioactiu no iònic de tipus etoxilat. La part lipòfila del tensioactiu (Figura 3.1) està formada per mono- i di- esters de poliglicol de l'acid 12-hidroxiestearic. La part hidròfila la formen polietilenglicols lliures.

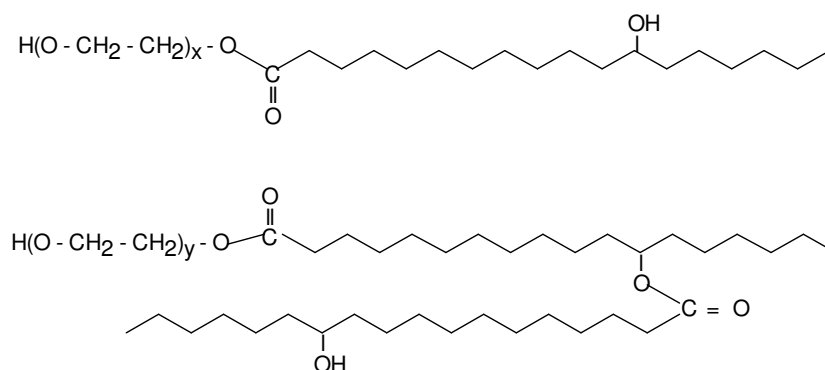


Figura 3.1. Estructura química dels principals components de la part lipòfila del Solutol® HS 15.

És una pasta de color blanc groguenc a temperatura ambient. A partir de 30°C esdevé líquid. El seu nombre HLB està comprès entre 14 i 16. Té una viscositat de 0,012 Pa.s al 30% en aigua, a 25°C. És soluble en aigua, etanol i 2-propanol. Té una elevada estabilitat química enfront solucions àcides i bàsiques i a temperatures elevades. Amb l'acció prolongada al calor es produeix una separació física del tensioactiu que és reversible. El Solutol HS15 es pot esterilitzar per autoclau a 120°C en solució aquosa, tot i que pot disminuir lleugerament el pH de la solució. En ser un producte susceptible a

oxidar-se es recomana emmagatzemar-lo en recipients ben tancats i protegits de la llum (BASFb, 2005).

El Solutol HS15 s'utilitza en la indústria farmacèutica principalment per a la preparació d'injectables de tipus aquós que contenen les vitamines A, D, E i K o bé d'altres principis actius lipòfils (Jumaa, 2002; BASFb, 2005).

El Solutol HS15 no és tòxic en ser administrat per via tòpica, oral o parenteral. Tampoc té acció irritant sobre la pell o mucoses (BASF, b).

Synperonic F68 (ICI)

És un tensioactiu no iònic de tipus bloc copolímer d'òxid d'etilè i d'òxid de propilè. Té un pes molecular aproximat de 8350g/mol. La seva estructura química es mostra en la Figura 3.2.

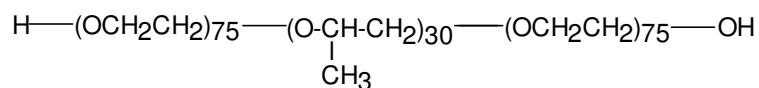


Figura 3.2. Estructura química del Synperonic F68.

És un sòlid de tipus escamós blanc a 25°C. Té una temperatura de fusió de 54,7°C. Té una viscositat de 1,325 Pa.s a 77°C i una densitat de 1,06 g/ml també a 77°C. És soluble en aigua i etanol, parcialment soluble en toluè i insoluble en querosè i etilenglicol (ICI, 2001).

Els tensioactius bloc copolimèrics són substàncies químicament estables. Les solucions aquoses són estables en presència d'àcids i bases i de metalls iònics (Handbook Pharm. Exc., 2005).

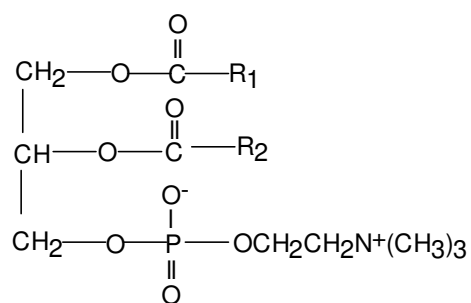
S'utilitza, principalment, en Farmàcia per a la formulació d'emulsions per aplicació tòpica i intravenosa (Lundberg, 1996; Jumaa 1999; Kan, 1999), de sabons i de supositoris. També s'utilitza en Cosmètica per a la formulació de xampús i en el camp de la detergència i la pintura (ICI, 2001).

És un producte de baixa toxicitat. No és irritant, ni sensibilitzant per via cutània (ICI, 2001) i ocular (Handbook Pharm. Exc., 2005). No s'ha observat hemòlisi en cèl·lules sanguínies humanes en un estudi realitzat durant 18 hores a 25°C amb concentracions de tensioactiu de fins un 10% p/v. En estudis realitzats en animals, no s'ha observat toxicitat en administrar fins 0,5g/kg/dia de tensioactiu durant 14 dies per via parenteral i fins 5% per via oral durant 2 anys (Handbook Pharm. Exc., 2005).

3.1.1.2. TENSIOACTIUS AMFÒTERS

Epikuron 200 (lecitina de soja purificada) (DEGUSSA BIOACTIVES)

És una mescla de fosfolípids purificats d'origen vegetal. S'obté de l'oli de soja i es produeix en columna cromatogràfica per a ser utilitzat en la indústria farmacèutica. Està compost, bàsicament, de fosfatidilcolina (Figura 3.3) en una proporció mínima del 92% i, en petita proporció, de liso-fosfatidilcolina, un 3% com a màxim, entre d'altres fosfolípids. L'Epikuron 200 també conté com a màxim un 2% d'oli de soja, 0,8% d'aigua i 0,2% α -tocopherol (Degussa BioActives, 2002).



R₁ i R₂ = àcids grassos idèntics o diferents

Figura 3.3. Estructura química de l' α -fosfatidilcolina.

Té aspecte cerós i color groc. És pràcticament inodor. És soluble en greixos, olis i etanol i dispersable en aigua (Degussa BioActives, 2002).

Es descomposa a pH extrems. A partir de 60°C la lecitina sofreix la reacció de Maillard, produint-se tant l'oxidació, l'enfosquiment com la descomposició del producte. A 160–180°C la lecitina es degrada en 24 hores. Cal emmagatzemar-la en recipients ben tancats, protegits de la llum i a temperatura ambient.

Les lecitines s'utilitzen en una gran varietat d'aplicacions farmacèutiques, cosmètiques i alimentàries. En el camp farmacèutic, concretament, s'utilitzen com a tensioactius i agents estabilitzants. Formen part, principalment, de preparats injectables intramusculars i intravenosos, de preparats nutricionals parenterals i enterals (Benita, 1993; Klang, 1998) i formulacions per aplicació tòpica (Verma, 2004; Boinpally, 2003).

La lecitina, essent un component de les membranes cel·lulars, es consumida en la dieta diària. Es poden arribar a ingerir dosis terapèutiques de fins a 80g diaris de lecitina, com és el cas del tractament de la diskinesia tardana. No obstant, la ingesta en excés pot resultar perjudicial. No té acció irritant ni sensibilitzant sobre la pell. Pot resultar irritant en mucoses (Handbook Pharm. Exc., 2005).

3.1.2. CO-TENSIOACTIUS

Polietilenglicol 400 (SIGMA)

El polietilenglicol 400 és un polímer de condensació format per la reacció d'òxids d'etilè i aigua, mitjançant pressió i amb la presència d'un catalitzador (Real Farmacopea Española, 2005). Té un pes molecular de 380–420 g/mol. La seva estructura química es mostra en la Figura 3.8.

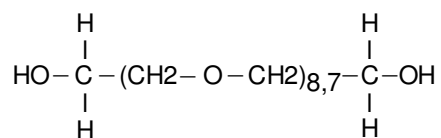


Figura 3.8. Estructura química del polietilenglicol 400

És un líquid clar i viscos, de tonalitat lleugerament groga. Té una olor característica i lleugera i un gust amarg. La seva densitat és de 1,11–1,14 g/ml a 25°C i la seva viscositat és de 90,0 mm²/s a 25°C. És soluble en aigua, acetona, alcohols, benzè, glicerina i glicols. És miscible en totes les proporcions en altres polietilenglicols (SIGMA, 2003).

Els polietilenglicols són estables químicament tant en l'aire com en solució. El polietilenglicol 400, concretament, és higroscòpic i pot oxidar-se amb l'exposició a temperatures superiors als 50°C durant períodes llargs. Els polietilenglicols i les solucions aquoses de polietilenglicol poden esterilitzar-se per autoclau, per filtració o per radiacions gamma (Bhalla, 1983). L'activitat de certs antibiòtics, com ara penicil·lina i bacitracina, i conservants, com els parabens, pot veure's reduïda pels polietilenglicols degut a la complexació de les substàncies amb polietilenglicol. Cal emmagatzemar-lo en recipients ben tancats, preferiblement, d'acer, alumini o vidre i en un lloc fresc i sec (Handbook of Pharm. Excip., 2005).

Els polietilenglicols són àmpliament utilitzats en formulacions farmacèutiques administrades per via tòpica, rectal, oral, ocular i parenteral. Quan s'utilitzen conjuntament amb altres tensioactius actuen com a agents estabilitzadors d'emulsions, mentre que en solució aquosa s'utilitzen com a reguladors de la viscositat (Handbook of Pharm. Excip., 2005). També s'usen per millorar la solubilitat de substàncies poc solubles en aigua (Miralles, 1982). El polietilenglicol 400 pot utilitzar-se com a vehicle per formulacions administrades per via parenteral fins a concentracions del 30% v/v (Handbook of Pharm. Excip., 2005).

Els polietilenglicols no tenen acció irritant ni tòxica per via tòpica. No obstant, s'ha observat l'aparició de reaccions d'hipersensibilitat de tipus al·lèrgica, acidosi metabòlica i fallada renal, en els casos més greus, quan es va administrar per via tòpica en pacients que presentaven cremades (Fruijtier-Pölloth, 2005; Handbook of Pharm. Excip., 2005).

Transcutol P (GATTEFOSSÉ)

El Transcutol P és l'èter monoetílic de dietilenglicol purificat. El seu pes molecular és de 134,17 g/mol i la seva estructura química es mostra en la Figura 3.9.

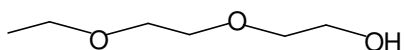


Figura 3.9. Estructura química del Transcutol P.

El Transcutol P és un líquid incolor d'olor dèbil. Té una densitat de 0,985–0,991 g/ml a 20°C. És soluble en aigua i etanol, parcialment soluble en olis vegetals i insoluble en olis minerals. Es recomana conservar el producte en el seu envàs original, hermèticament tancat i utilitzar-lo ràpidament un cop obert l'envàs (Gattefossé, 2002).

S'utilitza en Farmàcia en formulacions parenterals, tòpiques, transdèrmiques i orals per la seva capacitat de solubilització de nombrosos principis actius com ara la indometacina, el nifedipí, hormones i esterols, entre d'altres (Gattefossé, 2002).

No té acció irritant ni sensibilitzant per via tòpica, ja sigui cutània, transdèrmica o ocular. Tampoc és tòxic per via oral (Gattefossé, 2002).

3.1.2. SOLVENTS

Miglyol 812 (triglicèrid de cadena mitjana) (ROIG FARMA)

És un triglicèrid de cadena mitjana obtingut a partir de l'extracció de l'oli fixat de la fracció seca i dura de l'endosperma de la planta *Cocos nucifera L.* per hidròlisi, seguit del fraccionament dels àcids grassos obtinguts i d'una posterior re-esterificació. Consisteix en una mescla de triglicèrids de cadena mitjana i curta d'àcids grassos, sent un 95% dels quals com a mínim els àcids

grassos saturats octanoic o caprílic i decanoic o càpric (Figura 3.4) (Handbook Pharm. Exc., 2005).

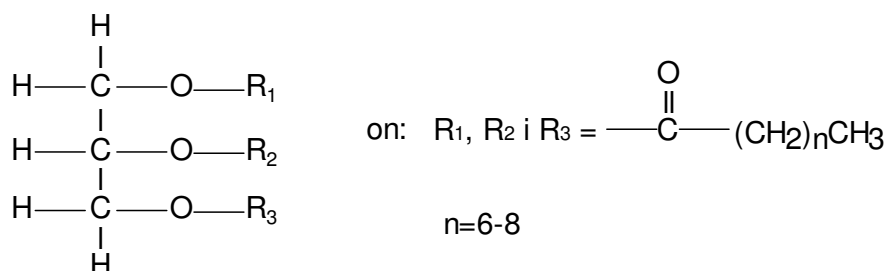


Figura 3.4. Estructura química del Miglyol 812.

És un líquid oliós de tonalitat lleugerament groga pràcticament inodor i insípid. Té una densitat de 0,94–0,95g/ml a 20°C i una viscositat de 0,028–0,032 Pa.s a 20°C. És soluble a 20°C en acetona, benzè, cloroform, diclorometà, etanol, èter, acetat d'etil i èter de petroli, entre d'altres, miscible en triglicèrids i hidrocarburs de cadena llarga i pràcticament insoluble en aigua (Handbook Pharm. Exc., 2005).

Els triglicèrids de cadena mitjana són estables a un ampli rang de temperatures. No obstant, no s'hauria d'exposar el producte a temperatures superiors a 40°C durant llargs períodes de temps. Pot esterilitzar-se a 170°C durant una hora. Per evitar l'oxidació del producte es recomana emmagatzemar-lo en recipients ben tancats i ben plens, idealment, a una temperatura inferior a 25°C i en envasos de vidre, metall, polipropilè o polietilè de baixa densitat i protegits de la llum.

Els triglicèrids de cadena mitjana són àmpliament utilitzats per aplicacions farmacèutiques i cosmètiques, degut a les seves propietats com a solvent, emolient i potenciador de la penetració. Concretament, en el camp farmacèutic, s'utilitzen en formulacions destinades a ser administrades tant per via tòpica, oral, com parenteral. Per via tòpica, formen part d'ungüents, cremes i emulsions (Youenang Piemi, 1999; Souto, 2004). En formulacions orals com ara solucions, microemulsions, emulsions i suspensions (Nicolaos, 2003), s'utilitzen per la seva capacitat de solubilització de principis actius inestables o insolubles en medi aquós. En formulacions parenterals com ara

solucions, emulsions o suspensions s'utilitzen per solubilitzar principis actius (Santos–Magalhaes, 2000) o bé com a agent nutricional en les nutricions parenterals totals (NPT) (Demorest, 1992; Klang, 1998). Els triglicèrids de cadena mitjana aporten 35 kJ (8,3 kcal) d'energia per gram. També formen part de dietes prescrites en malalties associades a una mala absorció de greixos .

Els triglicèrids de cadena mitjana no presenten acció irritant ni tòxica per via tòpica ni ocular. Estudis de toxicitat crònica realitzats en animals per via oral, intraperitoneal, parenteral o per inhalació, no mostren l'aparició d'efectes adversos perjudicials. En alguns pacients en els quals s'havien prescrit triglicèrids de cadena mitjana en la dieta s'ha observat l'aparició de dolors abdominals i diarrea (Handbook Pharm. Exc., 2005).

Oli de ricí (SIGMA)

És un triglicèrid d'àcids grassos obtingut de les llavors de la planta *Ricinus communis* Linné (Familia Euphorbiaceae) per extracció en fred (Real Farmacopea Española, 2005). La composició en àcids grassos és, aproximadament, d'un 87% d'àcid ricinoleic (Figura 3.5), un 7% d'àcid oleic, un 3% d'àcid linoleic, un 2% d'àcid palmític, un 1% d'àcid esteàric i una petita quantitat d'àcid dihidroxiesteàric (SIGMA, 2003).

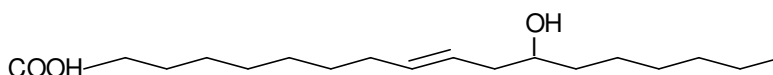


Figura 3.5. Estructura química del principal component de l'oli de ricí, l'àcid ricinoleic.

És un líquid clar, oliós i viscos, de tonalitat lleugerament groga. Té una olor dèbil. La seva densitat és de 0,955–0,968 g/ml a 25°C i té una viscositat de 1 Pa.s a 20°C. És soluble en cloroform, dietil èter, àcid acètic glacial i metanol; fàcilment soluble en etanol i èter de petroli i pràcticament insoluble en aigua i en olis minerals (SIGMA, 2003).

L'oli de ricí és estable i només s'enrancian quan s'exposa a elevades temperatures durant un període llarg de temps. Per evitar l'oxidació del producte es aconsella emmagatzemar-lo en recipients ben plens i hermètics, protegits de la llum i a temperatures inferiors a 25°C (Handbook Pharm. Exc., 2005).

L'oli de ricí és àmpliament utilitzat en el camp farmacèutic, alimentari i en el cosmètic. En farmàcia, s'usa en formulacions tòpiques, tipus emulsions i unguents (Sintov, 2004). També s'utilitza en formulacions orals, formant part de comprimits i càpsules i en injeccions intramusculars com a solvent (Jumaa, 2001).

És considerat no tòxic i no irritant (Irwin, 1982). L'administració de dosis elevades d'oli de ricí per via oral pot causar nàusees, vòmits, còlics i diarrea severa. També s'ha associat l'ús d'oli de ricí en cosmètica (barres labials) a l'aparició de dermatitis de contacte de tipus al·lèrgica (Fisher, 1981; Andersen, 1984; Handbook Pharm. Excip., 2005).

Oli de soja (SIGMA)

És l'oli refinat obtingut de les llavors de les plantes *Glycine soja* i *Glycine max* (Familia Leguminosae) per extracció i subsegüent refinament (Real Farmacopea Española, 2005). Està compost pels següents àcids grassos: àcid linoleic en un 50–57% (Figura 3.6), àcid linolènic en un 5–10%, àcid oleic en un 17–26%, àcid palmític en un 9–13%, àcid esteàric en un 3–6% i petites quantitats d'altres àcids (SIGMA, 2003).

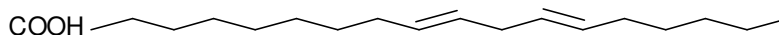


Figura 3.6. Estructura química del principal component de l'oli de soja, l'àcid linoleic.

És un líquid clar, de color groc pàl·lid, inodor o gairebé inodor. Té una densitat de 0,916–0,922 g/ml a 25°C i una viscositat de 0,0501 Pa.s a 25°C.

És miscible en disulfid de carboni, cloroform, èter i petroli lleuger i pràcticament insoluble en etanol i en aigua (SIGMA, 2003).

L'oli de soja és un producte estable, sempre i quan estigui protegit de l'oxigen atmosfèric. És necessari emmagatzemar el producte a temperatures inferiors a 25°C, en atmosfera de nitrogen i en envasos de vidre ben plens i hermètics, protegits de la llum. L'emmagatzemament d'emulsions d'oli de soja durant llargs períodes de temps i, sobretot, a altes temperatures, contribueix a la formació d'àcids grassos lliures que donen lloc a una reducció del pH de l'emulsió. La degradació de l'oli a elevades temperatures es minimitza mantenint el pH de l'emulsió entre 6–7. Cal tenir en compte les nombroses incompatibilitats que presenta l'oli de soja amb diversos excipients (clorur de calci, gluconat de calci, clorur de magnesi, etc.), principis actius (amfotericina B, hidroclorur de tetraciclina, fenitoïna sòdica, etc.) i ions (Handbook Pharm. Excip., 2005).

L'oli de soja és emprat en el camp farmacèutic, cosmètic i alimentari. En aplicacions farmacèutiques s'utilitza principalment en la formulació d'emulsions destinades a nutricions parenterals totals, doncs s'ha vist que és un oli associat a molt pocs efectes adversos (McNiff, 1977). També com a component oliós d'emulsions destinades a solubilitzar principis actius per la seva administració per via oral o intravenosa, com ara vitamines (Dahl, 1994), esteroides poc solubles en aigua (Malcolmson, 1993) i diazepam (Nankevis, 1994), entre d'altres. Els liposomes (Krishna, 1999), les nano-emulsions i les nanocàpsules (Santos–Magalhaes, 2000) són alguns sistemes d'alliberació de principis actius formulats amb oli de soja.

Es considera no tòxic i no irritant. No obstant, s'han descrit l'aparició d'efectes adversos greus en formar part d'emulsions administrades per via parenteral, com ara reaccions d'hipersensibilitat, reaccions del sistema nerviós central i embolismes (Hiyama, 1989; Estebe, 1991). També s'ha observat l'aparició de reaccions anafilàctiques degudes a l'ingesta d'aliments que contenen oli de soja o algun derivat (Handbook Pharm. Excip., 2005).

Oli d'oliva (SIGMA)

És un triglicèrid d'àcids grassos obtingut del fruit de *Olea europaea*. Està compost d'una elevada proporció d'àcids grassos insaturats. D'entre ells, els més abundants són l'àcid oleic (Figura 3.7), que està present en una proporció del 55 al 83%, l'àcid linoleic, del 3,5 al 21%, l'àcid palmític, del 7,5 al 20%, l'àcid esteàric, del 0,5 al 5% i l'àcid palmitoleic, del 0,3 al 5% (Handbook of Pharm. Excip., 2005).

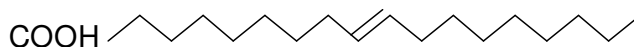


Figura 3.7. Estructura química del principal component de l'oli d'oliva, l'àcid oleic.

És un líquid oliós, clar, incolor o lleugerament groguenc-verd. És poc soluble en etanol i miscible en èter, cloroform i disulfid de carboni.

L'oli d'oliva es pot saponificar en presència d'hidròxids bàsics. Degut a que es fàcilment oxidable és aconsellable emmagatzemar-lo en recipients plens i protegits de la llum. Addicionalment, en cas d'un oli d'oliva refinat per a ús en formulacions parenterals cal que s'emmagatzemi sota un gas inert (Real Farmacopea Española, 2005).

És un oli comestible que s'utilitza àmpliament en el camp alimentari, així com en formulacions cosmètiques i farmacèutiques per administració tòpica, oral i parenteral. Les formes farmacèutiques més comuns formulades amb oli d'oliva són els unguents, liniments, enemes, emulsions, gels, càpsules i solucions (Handbook of Pharm. Excip., 2005).

Està considerat un excipient no tòxic i no irritant. En casos aïllats s'ha trobat que pot provocar reaccions d'hipersensibilitat (Van Joost, 1981; Kranke, 1997).

Aigua desionitzada filtrada (Ultra-pure Millipore water system, Milli-Q_{PLUS} 185 filter).

3.1.4. PRINCIPIS ACTIUS

Flurbiprofè (SIGMA)

El flurbiprofè és l'àcid 2-(2-fluorobifenil-4-il)propioníc (Figura 3.10). El seu pes molecular és de 244,3 g/mol.

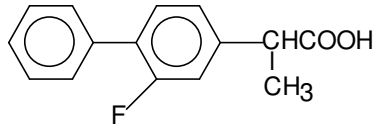


Figura 3.10. Estructura química del flurbiprofè.

És una pols cristal·lina blanca o gairebé blanca, pràcticament insoluble en aigua i fàcilment soluble en alcohol i en diclorometà. És dissol en solucions aquoses de carbonats i hidrurs alcalins (Real Farmacopea Española, 2005).

El flurbiprofè és un antiinflamatori no esteroïdic derivat de l'àcid propioníc amb acció analgèsica i antipirètica. S'absorbeix ràpidament des del tracte gastrointestinal quan s'administra per via oral. S'utilitza en trastorns musculoesquelètics i de les articulacions com ara artritis reumatoide o osteoartritis, en trastorns de teixits tous, en el dolor degut al postoperatori i en dolors lleugers i moderats com ara migranya i dismenorrea. També està indicat per l'alleujament simptomàtic de mal de gola (Martindale, 2002). Les dosis diàries usuals administrades per via oral i per via rectal són de 150 a 300 mg, com a màxim, repartides en períodes de 4 a 8 hores. Es pot administrar per via ocular per inhibir la miosi durant una intervenció quirúrgica ocular o bé per controlar la inflamació postoperatoria. Les dosis són de 0,03% de flurbiprofè sòdic administrades en períodes curts de temps.

Les formes de dosificació comercialitzades a Espanya amb flurbiprofè són els coliris (0,3% de flurbiprofè) i les càpsules (50, 100 i 200mg de flurbiprofè) (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2005). En d'altres països també es comercialitzen supositoris (Martindale, 2003).

Lidocaïna (SIGMA)

La lidocaïna és la 2-dietilamino-2,6-dimetilacetanilida (Figura 3.11). El seu pes molecular és de 234,3 g/mol.

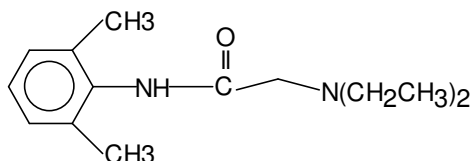


Figura 3.11. Estructura química de la lidocaïna.

És una pols cristal·lina blanca o gairebé blanca, pràcticament insoluble en aigua, molt soluble en alcohol i en clorur de metilè i fàcilment soluble en èter (Real Farmacopea Española, 2005). Cal emmagatzemar el principi actiu en recipients tancats i protegits de la llum.

La lidocaïna és molt estable degut a la protecció estèrica que li confereixen els dos grups metil disposats en posició orto respecte l'anell aromàtic. En solució aquosa és resistent al calor, i als medis àcids i bàsics. Tot i així, en medis àcids forts s'hidrolitza donant lloc a la 2,6-dimetilanilina i a l'àcid dietilaminoacètic (Gröningsson, 1985).

La lidocaïna és un anestèsic local de tipus amida també utilitzat per la seva activitat antiarrítmica. S'absorbeix ràpidament des del tracte gastrointestinal si s'administra per via oral, des de mucoses i a través de la pell danyada si s'administra per via tòpica i en el llocs d'injecció, incloent el múscul, si la via d'administració és la parenteral (AHFS, 2004). Degut a la seva baixa solubilitat en aigua s'administra, generalment, en forma d'hidroclorur. Com a anestèsic local, s'utilitza en anestesia d'infiltració i en anestèsia superficial. La lidocaïna s'inclou en formulacions injectables, típicament de corticosteroides, per prevenir el dolor, el picor i la irritació locals. La lidocaïna sòdica també s'inclou en injeccions intramusculars d'antibiòtics per reduir el dolor produït durant la injecció. Les concentracions d'hidroclorur de lidocaïna en solució administrades per via parenteral són del 0,5 al 5%. En anestesia superficial, les concentracions terapèutiques del principi actiu són

del 2 al 10%. Les formulacions utilitzades per aquesta finalitat són nombroses: ungüents, gels, solucions, emulsions, pegats transdèrmics i col·liris. Pel que fa referència a la seva activitat antiarrítmica s'usa en el tractament d'arrítmies ventriculars, especialment després de l'infart de miocardi. Les dosis administrades per aquesta indicació són d'1 a 1,5 mg per via intravenosa d'hidroclorur de lidocaïna per kg de pes corporal que poden repetir-se després de pocs minuts (Martindale, 2003).

Les formes de dosificació comercialitzades a Espanya amb lidocaïna són les solucions injectables (20mg/ml de lidocaïna), les pomades per via rectal i cutània (4mg/g i 20mg/g d'hidroclorur de lidocaïna), els gels (2% de lidocaïna), cànules (300mg/cànula d'hidroclorur de lidocaïna), solucions per via cutània (25mg d'hidroclorur de lidocaïna), emulsions per via rectal i vaginal (2%, 10mg/g, 20mg/g i 25mg/g de lidocaïna), comprimits per desfer a la boca (2mg/comprimit de lidocaïna), gotes òtiques (6,16mg/ml d'hidroclorur de lidocaïna) i aerosols per via bucal (1mg/ml de lidocaïna) (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2005). En d'altres països també es comercialitzen ungüents (Martindale, 2003).

3.1.5. REACTIUS PER ANÀLISI

Els següents productes analítics són els utilitzats en els assajos d'HPLC.

Metanol (MERCK), qualitat per cromatografia en fase líquida.

Acetonitril (MERCK), qualitat per cromatografia en fase líquida.

Àcid orto-fosfòric, 85% (MERCK)

Trietanolamina (FLUKA)

3.2. APARELLS I INSTRUMENTS

3.2.1. Balances: Balances de precisió de 10^{-4} g METTLER TOLEDO del model B204-S, AB204 i AJ-100.

3.2.2. Banys d'aigua o d'oli termostatitzats: Banys de metacrilat de metil de 15L de capacitat. La temperatura s'ha controlat mitjançant termostats d'immersió i amb lectura digital HAAKE dels models DC10 i criostats HAAKE dels models EK20 i EK12. Per a temperatures superiors als 60°C s'han emprat vasos de precipitats PYREX. Per a estudis d'estabilitat en que s'han observat mostres durant llargs períodes de temps, l'aigua es substitueix per oli de silicona Rhodorsil® fluid tipus 47V50. La temperatura s'ha controlat mitjançant termòmetres de contacte elèctric SELECTA o bé termòmetres de contacte electrònics 'Sensoterm' HEIDOLPH del model EKT 3001 amb lectura digital, connectats a plaques calefactores SELECTA dels models Agimatic-N i Agimatic-E o plaques GERHARDT dels models MAG-K i MAG-H.

3.2.3. Centrífugues: HERAEUS SEPATECH del model Labofuge Ae, de fins un màxim de 5000 rpm.

3.2.4. Ultracentrífuga: SORVALL model RC-5C PLUS amb sistema refrigerant R-502, que te una velocitat màxima de 21000 rpm i una capacitat màxima de 3 L i el rotor SM-24.

3.2.5. Agitadors vibradors de tubs tipus vòrtex: HEIDOLPH model REAX top de 100 a 2400 rpm de velocitat i model REAX 2000 de 200 a 2000 rpm de velocitat.

3.2.6. Agitador mecànic estàndard: HEIDOLPH model RZR-1, de regulació mecànica i en continu de la velocitat, que pot agitar un volum màxim de 20 l d'aigua a velocitats de 280 a 2200 rpm. S'ha emprat una vareta d'acer inoxidable de pala fixa d'1,5 cm de diàmetre i de 40 cm de llargada.

3.2.7. Homogeneïtzador d'alta pressió: S'ha emprat l'homogeneïtzador d'alta pressió de MICROFLUIDICS Microfluidizer model M-110L, que te un flux de descàrrega màxim de 270 ml/min i arriba a una pressió pneumàtica de treball màxima de 160psi (11 bar). La pressió de procés és la pressió

pneumàtica multiplicada per un factor, 233. L'equip consta d'un serpentí i d'una safata reguladors de la temperatura. Per controlar la temperatura s'acobla un bany termostatitzat (veure apartat 3.2.2.).

3.2.8. Bany d'ultrasons: SELECTA model Ultrasons-H amb sistema calefactor i termostat regulador de la temperatura (des de temperatura ambient fins a 75°C).

3.2.9. Conductímetre: CRISON model 525. La cel·la de mesura consta d'un electrode Pt/platinitzat.

3.2.10. Tensiòmetre: Krüss K12 amb una placa de tipus Wilhelmy.

3.2.11. pHmetre: pHmetre digital METTLER TOLEDO model Seven Easy i el Thermo Orion 420A.

3.2.12. Microscopi òptic: LEICA model Reichert Polyvar 2, acoplat a una videocamera SONY i al controlador de càmera Reichert Trimatic. Les imatges del microscopi es capturen, es processen, i s'analitzen mitjançant el programa LEICA IM 500.

3.2.13. Espectrofotòmetre de correlació fotònica: Malvern model 4700, consta d'un laser d'argó de longitud d'ona de 488 nm i d'intensitat variable, del detector de les fluctuacions de la intensitat que consta, a la vegada, d'un fotomultiplicador, un amplificador del senyal i un discriminador que elimina senyals produïdes pel soroll de fons, i del correlador que genera la funció d'autocorrelació. L'instrument està acoplat a un bany termostatitzat. Les dades són processades i analitzades segons el mètode dels cumulants (Koppel, 1972) del qual s'obté el diàmetre mitjà de gota de la dispersió (Z-average) i l'index de polidispersitat de la dispersió i pel mètode Contin (Provencher, 1982a, 1982b).

3.2.14. Espectrofotòmetre de dispersió de raigs X a angles petits (SAXS): MBRAUN, equipat amb generador Siemens model Kristalloflex K-760 i un ànode Cu-K α de longitud d'ona de 15,42 nm. La colimació té lloc a la càmera Kratky i la intensitat dispersada es detecta amb el detector de posició lineal OED 50M, ambdós de HECCUS MBRAUN. La temperatura es controla

amb el regulador AP Paar K-PR. Les dades són processades i analitzades amb el programa 3DVIEW.

3.2.15. Instrument de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC): S'han utilitzat dos instruments. L'instrument Waters model LC-Module I que opera a temperatura ambient i consta d'un sistema automàtic d'injecció de mostres equipat amb una vàlvula d'injecció de 200 µl, d'un detector UV/VIS de longitud d'ona variable i d'un desgasificador en línia. Les dades van ser processades i analitzades amb el programa Millennium 32. També es va utilitzar l'instrument JASCO, amb un detector UV (JASCO UV-2075 Plus) de longitud d'ona variable. Les dades van ser processades i analitzades mitjançant el programa EZStart.

3.2.16. Evaporímetre: AquaFlux AF102 de Biox systems Ltd. L'aparell consta de dos sensors situats a distàncies diferents, a 3 i a 9mm de la superfície de la pell. Cadascun dels sensors determinen la humitat relativa i la temperatura a cada punt on estan situats. Les senyals dels sensors són processades obtenint-se el gradient de pressió parcial entre ambdues distàncies i la velocitat d'evaporació.

3.2.17. Espectrofotòmetre CM-2600d: Konica Minolta, per mesurar el color de la superfície de la pell. És un instrument amb 40 sensors per mesurar la reflectància d'un objecte a cada longitud d'ona o en un rang determinat. Les dades de la reflectància espectral mesurades s'emmagatzemen en la memòria de l'aparell. A partir d'aquestes dades es calculen els valors numèrics mitjançant integració amb el seu processador de dades. Mitjançant l'espectrofotòmetre també s'obtenen gràfics dels espectres de reflectància del color. L'aparell pot mesurar també diferències de color en relació a un blanc.

3.2.18. Dermatòmitzador: Per tallar la pell de l'orella del porc, Zimmer® Electric Dermatome, Ref. 8821-06.

3.3. MÈTODES

3.3.1. Elaboració de diagrames de fases

Els tensioactius, components oliosos i components aquosos utilitzats en aquesta tesi doctoral s'abreugen com a T, O i A, respectivament. Tant els percentatges com les relacions entre components corresponen a valors en pes.

A fi d'estudiar el comportament fàsic dels sistemes tipus aigua/tensioactiu(s)/component oliós s'han elaborat diagrames de fases ternaris a temperatura constant. S'ha utilitzat el mètode de valoració que consisteix en successives addicions d'un dels components, generalment l'aigua, a la barreja dels altres dos a una temperatura determinada. Després de cada addició les mostres són agitades, homogeneïtzades i deixades en un bany termostatitzat. Les mostres són observades a temperatura constant durant aproximadament 72 h amb l'objectiu de que puguin assolir la separació de fases. Per tal de definir els límits entre regions d'igual equilibri de fases en el diagrama s'han preparat composicions pesant tots els components a la vegada en vials de vidre que han estat tancats a la flama per evitar la possible evaporació de la mostra. Posteriorment, s'han homogeneïtzat les mostres mitjançant un agitador vòrtex a una temperatura determinada i s'han deixat en un bany termostatitzat i observat fins assolir la separació de fases, també a una temperatura determinada.

Es considera que s'ha obtingut l'equilibri de fases d'una composició quan s'observa una o més fases transparents separades per interfícies. La presència de cristalls sòlids o líquids s'ha identificat, en primer lloc, mitjançant l'observació a través de polaritzadors de la llum creuats i exposats a una font lluminosa. Per confirmar la presència d'un cristall o un cristall líquid o bé en aquells casos en que les mostres presentaven opacitat, s'ha fet ús del microscopi òptic amb llum polaritzada. Així mateix s'ha caracteritzat l'estructura dels cristalls líquids mitjançant la tècnica de SAXS.

Els símbols utilitzats en aquest treball per denominar les regions que apareixen en els diagrames de fases i el corresponent significat es mostren en la Taula 3.1.

Taula 3.1. Símbols de les regions dels diagrames de fases amb les corresponents descripcions.

SÍMBOL	DESCRIPCIÓ
L_1	Fase líquida isotropa: solució micel.lar directa o microemulsió de fase externa aquosa
L_2	Fase líquida isotropa: solució micel.lar inversa o microemulsió de fase externa oliosa
L	Fase líquida isotropa: solució micel.lar o microemulsió bicontínua
L_α	Fase anisotropa: fase de cristall líquid laminar
H	Fase anisotropa: fase de cristall líquid hexagonal invers
II	Dues fases isotropes líquides
M	Regió multifàsica
M_{CL}	Regió multifàsica amb presència de cristall líquid

3.3.2. Caracterització de fases de cristall líquid laminar i hexagonal

3.3.2.1. Microscopia òptica

S'han observat mostres que presentaven anisotropia per microscopia òptica amb polaritzadors en disposició creuada i a temperatura ambient amb la finalitat de caracteritzar el tipus de cristall líquid. La preparació de la mostra consisteix en col·locar una petita quantitat de la composició que es vol observar sobre un portaobjectes i sobre aquesta, es posa el cubreobjectes pressionant lleugerament les vores. Seguidament, es procedeix a l'observació de la mostra amb objectius de diferents augments, normalment començant per augments petits a més grans. Cal tenir en compte que quan les estructures de cristall líquid a observar són fràgils la pressió que s'exerceix en posar el cubre sobre la mostra pot destruir-les.

Mitjançant aquesta tècnica les fases de cristall líquid laminar presenten una textura en forma de mosaic o xarxa plana i les característiques creus de Malta (Figura 3.12.a). Les fases de cristall líquid hexagonal, en canvi, tenen una textura angular o de vano (Figura 3.12.b).

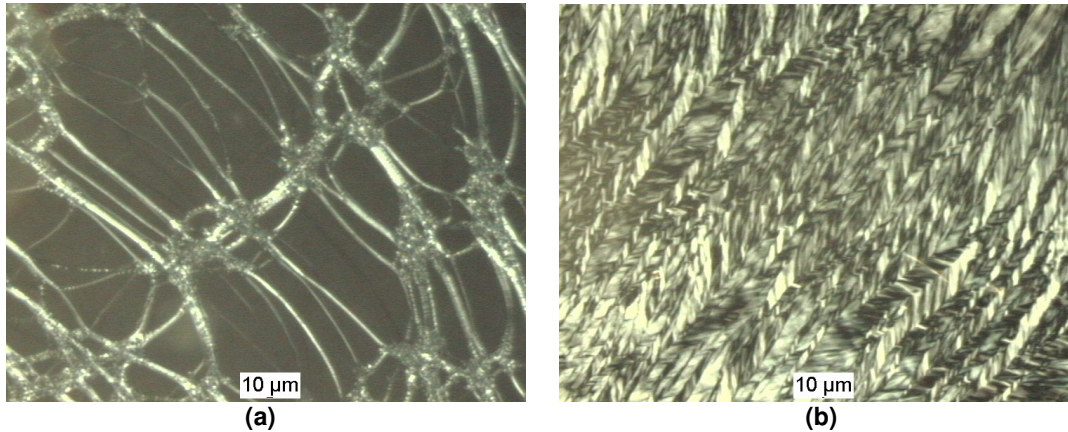


Figura 3.12. Textures d'un cristall líquid laminar (a) i un hexagonal (b) observades mitjançant microscopia òptica amb polaritzadors creuats.

3.3.2.2. Espectrofotometria de dispersió de raigs X a angles petits (SAXS)

Quan no ha estat possible caracteritzar les fases de cristall líquid per microscopia òptica degut a la fragilitat de les estructures s'ha utilitzat la espectrofotometria de dispersió de raigs X a angles petits. Les mostres s'han disposat en un portamostres especial per a fluids viscosos entre un film (Kalle GmbH, Austria). Les fases de cristall líquid han estat caracteritzades a partir de les relacions entre els pics de difracció obtinguts de les determinacions per SAXS en representar intensitat en funció del vector de dispersió màxima, ($q=4\pi/\lambda \cdot \sin(\theta/2)$). El vector de dispersió q es defineix com la diferència entre els vectors d'ona incident i dispersat a un angle θ . A partir de la distància entre capes o distància de Bragg ($d=2\pi/q$) es calculen els paràmetres geomètrics característics de les estructures de cristall líquid laminar i hexagonal. Els espectres de raigs X han estat suavitzats i, posteriorment, desemborronats (Singh, 1993).

Quan una estructura presenta periodicitat en l'espai i la distància entre els diferents plans de simetria és de l'ordre de la longitud d'ona de la radiació, λ , en incidir la radiació es produeix una reflexió, o dit d'altra manera, una interferència constructiva del feix dispersat per a certs angles, donant lloc a l'aparició de pics de difracció. Cada reflexió de radiació electromagnètica és deguda a un grup diferent de plans de simetria i cadascuna és identificada mitjançant els seus índexs de Miller. Per identificar l'estructura cal indexar

correctament les reflexions obtingudes de cada grup dels plans de simetria. Normalment, calen mètodes iteratius per desenvolupar aquesta tasca.

Caracterització de fases de cristall líquid laminar

La fase de cristall líquid laminar està formada per bicapes paral·leles entre si, en la que s'alternen dominis polars i dominis no polars separats per molècules de tensioactiu (Figura 3.13). Les distàncies entre pics de difracció presenten una relació $1: \frac{1}{2}: \frac{1}{3} \dots etc$ (Larsson, 1976).

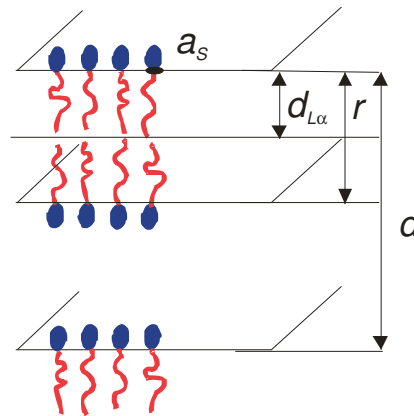


Figura 3.13. Estructura del cristall líquid laminar.

En cas d'un sistema binari aigua/tensioactiu, els paràmetres estructurals característics a determinar són el semigruix de la bicapa, $d_{L\alpha}$, i l'àrea per molècula del tensioactiu, a_s , que es calculen a partir de les següents equacions (Kunieda, 2000):

$$d_{L\alpha} = \frac{1}{2} d\phi_s \quad \text{Equació 3.1}$$

$$a_s = \frac{2V_s}{N_A d\phi_s} \quad \text{Equació 3.2}$$

on ϕ_s és la fracció en volum del tensioactiu, V_s és el volum molecular del tensioactiu i N_A és la constant d'Avogadro.

Per a un sistema ternari aigua/tensioactiu/component oliós els paràmetres estructurals més importants a determinar són el gruix del domini apolar, r , i l'àrea per molècula del tensioactiu, a_s . Aquests es poden calcular segons les equacions següents (Kunieda, 1999):

$$r = (\phi_L + \phi_o)d \quad \text{Equació 3.3}$$

$$a_s = \frac{2V_L}{rN_A} \left(\frac{\phi_L + \phi_o}{\phi_L} \right) \quad \text{Equació 3.4}$$

on V_L és el volum molar de la cadena lipòfila de tensioactiu, ϕ_L és la fracció en volum de la cadena lipòfila de tensioactiu i ϕ_o és la fracció en volum de l'oli.

La fracció en volum del tensioactiu, ϕ_s , del component oliós, ϕ_o , i de la cadena lipòfila de tensioactiu, ϕ_L , es calculen a partir de les equacions següents (Kunieda, 1999):

$$\phi_s = \frac{1}{1 + \frac{\rho_s}{W_s} \left(\frac{W_w}{\rho_w} + \frac{W_o}{\rho_o} \right)} \quad \text{Equació 3.5}$$

$$\phi_o = \frac{1}{1 + \frac{\rho_o}{W_o} \left(\frac{W_w}{\rho_w} + \frac{W_s}{\rho_s} \right)} \quad \text{Equació 3.6}$$

$$\phi_L = \frac{V_L}{V_s} \phi_s \quad \text{Equació 3.7}$$

on ρ_s , ρ_w i ρ_o són les densitats del tensioactiu, de l'aigua i del component oliós, respectivament, W_s , W_w i W_o són les fraccions en pes del tensioactiu, l'aigua i el component oliós, respectivament, i V_s i V_L són els volums molars del tensioactiu i de la seva cadena lipòfila, respectivament.

Caracterització de fases de cristall líquid hexagonal

El cristall líquid hexagonal és una agrupació de micelles cilíndriques, en la que una d'elles s'envolta de sis micelles cilíndriques més formant una estructura hexagonal. Com ja s'ha descrit en la Introducció, existeixen dos tipus de cristalls líquids hexagonals, el directe si les cadenes lipòfiles del tensioactiu estan orientades cap a l'interior de la micella (Figura 3.14) i l'invers, en cas que les cadenes lipòfiles estiguin orientades cap a l'exterior de la micella cilíndrica. Les distàncies entre pics de difracció presenten la relació $1: \frac{1}{\sqrt{3}}: \frac{1}{\sqrt{4}}$, etc (Larsson, 1976).

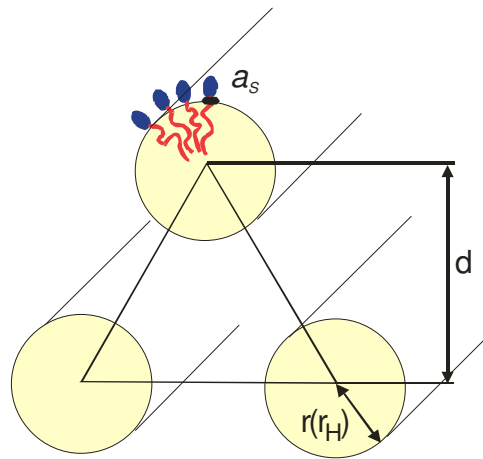


Figura 3.14. Estructura del cristall líquid hexagonal (directe).

Tenint en compte el sistema binari aigua/tensioactiu, els paràmetres estructurals més importants són el radi del cilindre, r , i l'àrea per molècula del tensioactiu, a_s , els quals es calculen a partir de les següents equacions (Kunieda, 2000):

$$r = \left\{ \frac{2}{\sqrt{3}\pi} \phi_s \right\}^{1/2} d \quad \text{Equació 3.8}$$

$$a_s = \frac{2V_s}{rN_A} \quad \text{Equació 3.9}$$

on ϕ_s és la fracció en volum del tensioactiu, V_s és el volum molecular del tensioactiu, N_A és la constant d'Avogadro.

En un sistema ternari aigua/tensioactiu/component oliós els paràmetres estructurals característics són igualment el radi del cilindre, r , i l'àrea per molècula del tensioactiu, a_s . Les equacions per calcular els paràmetres són les següents (Kunieda, 1999):

$$r = \left\{ \frac{2}{\sqrt{3}\pi} (\phi_L + \phi_o) \right\}^{1/2} d \quad \text{Equació 3.10}$$

$$a_s = \frac{2V_L}{rN_A} \left(\frac{\phi_L + \phi_o}{\phi_L} \right) \quad \text{Equació 3.11}$$

on V_L és el volum molar de la cadena lipòfila de tensioactiu, ϕ_L és la fracció en volum de la cadena lipòfila de tensioactiu i ϕ_o és la fracció en volum de l'oli.

Caracterització de fases de cristall líquid cúbic

Les fases de cristall líquid cúbic poden ser micel.lars o bicontínues. Els cristalls líquids cúbics micel.lars són fases molt viscoses formades per empaquetaments regulars de micel.lars. Poden tenir diverses morfologies. Les fases de cristall líquid cúbic bicontínu són agregats de molècules de tensioactiu formant estructures connectades que poden ser també de diverses morfologies, com per exemple, bicapes o micel.lars connectades formant estructures ramificades. En funció de l'orientació dels grups lipòfils i hidròfils de les molècules de tensioactiu els cristall líquids cúbics poden ser directes o inversos (Jönsson, 1989).

3.3.3. Formació de nano-emulsions

3.3.3.1. Emulsificació mitjançant agitació amb vòrtex

Les nano-emulsions s'han preparat per addicions d'aigua a mescles oli/tensioactiu (O/T) utilitzant el vòrtex a aproximadament 2000–2400 r.p.m. L'aigua s'ha afegit en addicions successives o bé el total de la quantitat a la vegada. En el primer cas, el període de temps usat en la

formació de les nano-emulsions ha estat condicionat a que la composició estigués perfectament homogeneïtzada entre addicions d'aigua, normalment de 10 a 15 min. L'emulsificació s'ha dut a terme en tubs d'assaig de vidre d'uns 10 ml de capacitat introduïts en banys d'aigua termostatitzats a una temperatura determinada (25, 50 o 70°C). Independentment de la temperatura de preparació, les emulsions un cop formades es deixen en banys d'aigua termostatitzats a 25°C.

3.3.3.2. Emulsificació mitjançant agitador mecànic estàndard amb vareta de pala

Les emulsions s'han preparat per addicions successives d'aigua a la mescla O/T prèviament homogeneïtzada utilitzant l'agitador mecànic a 2200 rpm. L'emulsificació s'ha dut a terme en tubs d'assaig de vidre d'uns 35 ml de capacitat introduïts en un bany termostatitzat a 50°C. Les emulsions, un cop formades, han estat guardades en banys d'aigua termostatitzats a 25°C.

3.3.3.3. Emulsificació mitjançant homogeneïtzador d'alta pressió

Les mostres, un cop emulsificades mitjançant l'agitador tipus vòrtex, han estat homogeneïtzades amb el Microfluidizer (Figura 3.15) a una pressió, una temperatura i un nombre de cicles determinats (un cicle correspon a la circulació del total del volum de l'emulsió per l'homogeneïtzador). La pressió de procés utilitzada ha estat de 5.000 a 15.000 psi. Uns 20 ml de mostra com a mínim es posen en el dipòsit de vidre que està envoltat d'un serpentí regulador de la temperatura. S'ajusta el sistema de pressió d'aire i s'obre la vàlvula que el subministra. El motor d'aire genera el moviment de la bomba intensificadora d'alta pressió. La mostra circula per la cambra d'interacció de dimensió mínima de pas de la vàlvula de 75 µm i es recull per un tub de sortida.

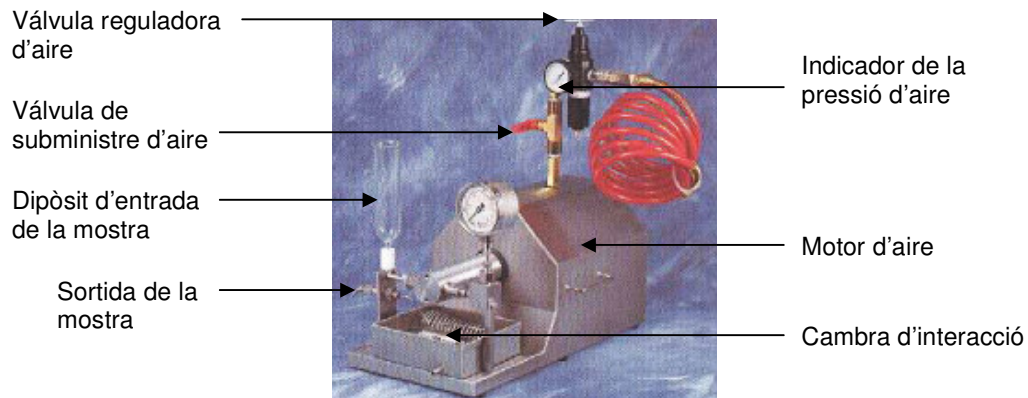


Figura 3.15. Parts del Microfluidizer.

3.3.4. Determinació de la mida de gota de les emulsions

3.3.4.1. Microscopia òptica

S'han observat emulsions O/W i nano-emulsions O/W per microscopia òptica a temperatura ambient. Les mostres s'han preparat segons s'explica en l'apartat 3.3.2. La tècnica permet identificar gotes de mida superior a 1 μm , el diàmetre de les quals pot ser mesurat mitjançant aplicacions del programa LEICA IM 500.

3.3.4.2. Espectrofotometria de dispersió dinàmica de la llum làser (DLS)

S'ha utilitzat aquesta tècnica per mesurar la mida promig de gota de nano-emulsions O/W de diferents relacions O/T i percentatges d'aigua del 90 i el 95% a 25°C i a 40°C. La tècnica permet mesurar diàmetres de partícules en el rang de 3 a 3000 nm.

La mostra a analitzar s'introdueix en una cubeta de quars que es disposa en un bany d'aigua termostatitzat ($\pm 0,1$ °C). L'obertura del detector i la intensitat del feix làser s'ajusten per obtenir una senyal òptima, de l'ordre de 80 a 90 kcomptes/s. El detector es situa a 90° del feix de llum làser que incidirà en la mostra. Mitjançant el correlador es processen les senyals

fotòniques dispersades i es transformen a un temps real d'oscil·lació que defineix la funció d'autocorrelació corresponent. Les viscositats de la fase dispersa, l'aigua, són 0,89 mPa.s a 25°C i 0,65 mPa.s a 40°C i l'índex de refracció relatiu a l'aire és de 1,33.

Les mostres transparents s'introdueixen directament en una cubeta de quars, mentre que les mostres d'aspecte translúcid es dilueixen abans en aigua amb la finalitat d'evitar el fenomen de dispersió múltiple. S'han realitzat diferents dilucions en aigua, de major a menor concentració en la mostra, fins a obtenir la proporció nano-emulsió:aigua més diluïda que presenti un índex de polidispersitat més petit per a una mateixa mida promig. Aquest estudi es va fer per a nano-emulsions de cada sistema estudiat. També s'ha estudiat la possible afectació de dispersió múltiple en algunes nano-emulsions d'aspecte transparent de manera que s'ha mesurat una mateixa dispersió sense diluir i diluint-la en diferents proporcions nano-emulsió:aigua. Els resultats no van mostrar diferències significatives en les diferents mesures tant en el mida mitja com en l'índex de polidispersitat, corroborant que les mesures de dispersions amb un 90 i un 95% d'aigua en els sistemes estudiats no presentaven dispersió múltiple.

3.3.5. Estabilitat cinètica de nano-emulsions

3.3.5.1. Observació macroscòpica

S'han observat macroscòpicament les nano-emulsions disposades en un bany termostatitzat en funció del temps per tal d'identificar canvis en l'aspecte de les mostres que indiquin l'acció de possibles mecanismes de desestabilització de tipus cremat o sedimentació (aparició de fase blanquinosa a la part superior o inferior de la mostra, respectivament) i maduració Ostwald o coalescència (pèrdua de transparència o translucidesa).

3.3.5.2. Determinació dels mecanismes de desestabilització

S'ha mesurat la mida de gota de les nano-emulsions en funció del temps mitjançant DLS a una temperatura determinada. L'aplicació de les equacions

1.7 i 1.10, ha permès identificar l'existència dels mecanismes de desestabilització maduració d'Ostwald i/o coalescència.

3.3.6. Solubilització de principis actius

3.3.6.1. Solubilització màxima de principis actius pel mètode d'addicions successives

S'han solubilitzat diversos principis actius en nano-emulsions mitjançant el mètode d'addicions successives. Aquest mètode consisteix en addicionar petites quantitats de principi actiu a la dispersió fins arribar a la concentració de saturació. En aquest treball, s'han addicionat els principis actius de dues maneres diferents: a la nano-emulsió un cop formada segons el mètode descrit en l'apartat 3.3.3.1. o bé a mescles O/T abans de l'addició d'aigua per formar les nano-emulsions. No s'han trobat diferències significatives respecte a la solubilització màxima pels dos mètodes utilitzats. S'han utilitzat tubs d'assaig de vidre de 10 ml de capacitat. Després de cada addició les mostres s'homogeneïtzen amb un agitador tipus vòrtex i s'ultrasonifiquen durant 15 min. Finalment, es posen en un bany d'aigua termostatitzat a 25°C. Després d'un mínim de 12 hores, les mostres s'examinen per observació visual directa i per microscopia òptica). L'aparició de cristalls, la separació de fases de la mostra o els canvis en l'aspecte de la dispersió són proves indicatives que s'ha sobrepassat la concentració màxima de principi actiu solubilitzat. Després de 24 h, com a mínim, es determina la concentració de principi actiu solubilitzat en la mostra per HPLC. La concentració obtinguda correspon a la concentració màxima de principi actiu solubilitzat.

La temperatura utilitzada per a realitzar els estudis de solubilització ha estat condicionada per l'estabilitat química dels principis actius.

3.3.6.2. Determinació de la quantitat de principi actiu solubilitzat mitjançant HPLC

La determinació de la quantitat de principi actiu solubilitzat s'ha realitzat mitjançant rectes de calibrat. S'han preparat com a mínim 8 solucions, per

cada recta de calibrat, amb diferents concentracions de principi actiu que han estat analitzades per triplicat mitjançant HPLC. En representar les àrees sota la corba obtingudes per cada solució en vers la seva concentració i mitjançant l'ajust a una regressió lineal s'obté la recta dels mínims quadrats o de regressió (Equació 3.12) del tipus:

$$y = A + Bx \quad \text{Equació 3.12}$$

on y és l'àrea cromatogràfica, A és l'ordenada a l'origen, B és el pendent de la recta i x és la concentració.

La concentració del principi actiu en una solució es pot determinar per interpolació de l'àrea cromatogràfica obtinguda a la recta de calibrat.

Condicions cromatogràfiques per la determinació de la quantitat de flurbiprofè solubilitzat

Les condicions experimentals utilitzades per a l'anàlisi de flurbiprofè han estat les següents:

La columna és del tipus Spherisorb ODS 2 (150x4.6 mm, 5 μ m). La fase mòbil consisteix en una mescla d'acetonitril, aigua i àcid orto-fosfòric al 85% en una proporció del 65/35/0,05 en volum. La longitud d'ona del detector de llum ultraviolada és de 254 nm. La velocitat de flux és d'1 ml/min, el volum d'injecció de 20 μ l i el temps de retenció de 2,6 min. La calibració es va fer diluint flurbiprofè en acetonitril. Es va determinar experimentalment que el flurbiprofè presenta una solubilitat d'1 en 5,5 parts (p/p) d'acetonitril.

Condicions cromatogràfiques per la determinació de la quantitat de lidocaïna solubilitzada

Les condicions experimentals utilitzades per a l'anàlisi de lidocaïna han estat les següents:

La columna és del tipus Spherisorb ODS 2 (150x4.6 mm, 5 µm). La fase mòbil consisteix en una mescla d'acetonitril, metanol, trietanolamina i àcid orto-fosfòric al 85% en una relació de 200/150/3/2, respectivament, fins a 1 l d'aigua i l'addició posterior d'àcid orto-fosfòric al 85% a la solució fins a obtenir un pH de 2,5. La longitud d'ona del detector de llum ultraviolada és de 205 nm. La velocitat de flux és d'1 ml/min, el volum d'injecció de 10 µl i el temps de retenció de 2,7 min. La calibració es va fer diluint la lidocaïna en metanol. Es va determinar experimentalment que la lidocaïna és molt soluble en metanol (>50% en pes).

3.3.7. Determinació de la temperatura HLB

La temperatura HLB d'un sistema aigua/tensioactiu no iònic pur/oli amb principi actiu solubilitzat en ell es va determinar mitjançant la mesura de la conductivitat en funció de la temperatura. S'ha emprat el conductímetre CRISON 525. La cel·la de mesura s'introdueix en l'emulsió la qual està en contínua agitació magnètica i en contacte amb un sistema calefactor (placa i sonda) que anirà augmentant la temperatura del sistema.

La fase aquosa va consistir en una solució aquosa de NaCl 10^{-2} M. Aquesta concentració de NaCl seleccionada és suficient per observar la inversió de fases de l'emulsió sense produir canvis significatius en el valor de la temperatura HLB (Shinoda, 1970).

3.3.8. Determinació de la tensió superficial

La tensió superficial d'una solució aquosa de principi actiu es va mesurar mitjançant el mètode de la placa de Wilhelmy. En aquest mètode la part inferior d'una placa de platí de forma rectangular i 39,2mm de longitud és disposada paral·lelament a la superfície de la solució. La solució ha de tocar lleugerament la part inferior de la placa. La força percebuda per la placa augmenta degut a l'efecte de la tensió superficial.

3.3.9. Determinació de la pèrdua transepidèrmica d'aigua (TEWL)

La pèrdua transepidèrmica d'aigua es va determinar mitjançant la mesura de la velocitat d'evaporació per un evaporímetre.

L'experiment es va realitzar en l'avantbraç de quatre voluntaris sans a temperatura ambient ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$) i una humitat relativa del $45\% \pm 5$. En primer lloc, es neteja la zona de l'avantbraç on es procedirà a fer les mesures amb compreses estèrils. Es van definir les àrees on realitzar les mesures posant una plantilla adhesiva a l'avantbraç amb orificis d'1,5cm de diàmetre, tal com es mostra en la Figura 3.16. Es mesura la pèrdua transepidèrmica d'aigua de les àrees on s'apliquen les formulacions posteriorment. A continuació es dipositen 0,2mL de cada formulació i d'aigua (control) sobre gassa estèril que ha estat disposada en cada orifici. La gassa estèril impregnada de fórmula es subjecta fermament amb paper adhesiu (Scotch® Taping). Després de dues hores es retiren les formulacions i l'aigua i es mesura novament la pèrdua transepidèrmica d'aigua. Es van fer repetides mesures durant dues hores.



Figura 3.16. Mesura de la pèrdua transepidèrmica d'aigua en l'avantbraç d'un voluntari.

3.3.10. Determinació del canvi de color de la pell

El canvi de color de la pell es va determinar mitjançant mesures de la reflectància de la llum realitzades amb un espectrofotòmetre.

L'experiment es va realitzar en l'avantbraç de quatre voluntaris sans a temperatura ambient ($25^{\circ}\text{C} \pm 1$) i una humitat relativa del $45\% \pm 5$, a l'igual que la determinació del TEWL. Un cop neta la zona de l'avantbraç es posa la

plantilla adhesiva amb orificis d'1,5cm de diàmetre i es mesura la reflectància en cada àrea abans d'incorporar la formulació. Llavors s'aplica 0,2mL de formulació i d'aigua (control) sobre una gassa estèril en els orificis i es subjecta amb paper adhesiu, igual com l'assaig del TWEL. Després de dues hores es retiren les formulacions i l'aigua i es realitzen mesures de la reflectància repetidament durant dues hores.

3.3.11. Permeació *in vitro* de principis actius

Assajos de permeació amb cel·les de difusió de Franz

Els estudis de permeació de principis actius *in vitro* s'han realitzat utilitzant cel·les de difusió de Franz d'1,5cm de diàmetre. L'àrea de difusió és, doncs, d'1,77cm². En el compartiment donador s'incorporen 2mL de formulació saturada amb el principi actiu. En el compartiment receptor s'addicionen una solució de tampó fosfat salí a pH 7,4 que està en constant agitació magnètica. Les cel·les de difusió es van dipositar verticalment en sistemes especials de permeació cutània (Skin permeation systems LG-1083) acoplats a un bany termostàtic a 37°C. Com a membrana situada entre el compartiment donador i el receptor es va utilitzar pell d'orella de porc dermatomitzada a un gruix de 750µm des de l'estrat corni. Periòdicament s'extreu 1,5mL de solució receptora i es reemplaça amb el mateix volum de solució receptora nova. Els estudis de permeació *in vitro* s'han realitzat amb pell de porc com a membrana per la seva fàcil obtenció a través del proveïment d'una granja col·laboradora amb el laboratori investigador. A més, tal com s'esmenta en la introducció, la pell de porc és la pell d'animal més similar a la humana.

Quantificació del principi actiu

La quantificació del principi actiu contingut en cada alíquota de solució receptora extreta es va fer mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). La determinació de la quantitat de principi actiu solubilitzat s'ha realitzat mitjançant rectes de calibrat, tal i com s'explica en l'apartat 3.3.6.2.

Condicions cromatogràfiques per la determinació de la quantitat de lidocaïna permeada a través de pell de porc

Les condicions experimentals utilitzades per a l'anàlisi de lidocaïna han estat les següents:

Per aquesta determinació es va utilitzar l'HPLC JASCO UV-2075 Plus. La fase mòbil consisteix en una mescla d'acetonitril, metanol, trietanolamina i àcid orto-fosfòric al 85% en una relació de 175/125/2,5/2, respectivament, fins a 1 L d'aigua i l'addició posterior d'àcid orto-fosfòric al 85% a la solució fins a obtenir un pH de 2,5. La longitud d'ona del detector de llum ultraviolada va ser de 205 nm. La velocitat de flux d'1 ml/min, el volum d'injecció de 20 µl i el temps de retenció de 5,63 min. La calibració es va fer diluint la lidocaïna en metanol.