



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Formación y caracterización de nanosistemas terapéuticos con alginato

Pablo Bonilla Valladares

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

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

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX ([www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://diposit.ub.edu)) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

# **FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS TERAPÉUTICOS CON ALGINATO**

**PABLO BONILLA VALLADARES, 2016**



UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

PROGRAMA DE DOCTORADO:  
INVESTIGACIÓN, DESARROLLO Y CONTROL DE MEDICAMENTOS

# **FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS TERAPÉUTICOS CON ALGINATO**

Memoria presentada por Pablo Bonilla Valladares para optar al título de Doctor por la  
Universidad de Barcelona

Directora y tutora de la Tesis doctoral:

Dra. María José García Celma

Doctorando:

Pablo Bonilla Valladares

**PABLO BONILLA VALLADARES, 2016**

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Alginato.....</b>	<b>16</b>
1.1.1. Estructura, obtención y propiedades características.....	16
1.1.2. Reticulación del alginato.....	21
1.1.3. Aplicaciones farmacéuticas y biomédicas del alginato.....	27
<b>1.2. Emulsiones altamente concentradas.....</b>	<b>34</b>
1.2.1. Definición, clasificación y propiedades generales de emulsiones...	34
1.2.2. Formación, estabilidad y propiedades de las emulsiones altamente concentradas .....	41
1.2.3. Las emulsiones altamente concentradas como medios de difusión de principios activos .....	44
1.2.4. Las emulsiones altamente concentradas como plantilla para la preparación de materiales porosos y nanopartículas .....	46
<b>1.3. Nano-emulsiones .....</b>	<b>50</b>
1.3.1. Formación, estabilidad y propiedades de las nano-emulsiones.....	50
1.3.2. Aplicaciones farmacéuticas de las nano-emulsiones.....	53
<b>2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO .....</b>	<b>57</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>63</b>
<b>3.1. Materiales.....</b>	<b>65</b>
3.1.1. Principios activos.....	65
3.1.2. Excipientes.....	69
3.1.2.1. Biopolímero y agentes de reticulación y estabilización	69
3.1.2.2. Tensioactivos.....	70
3.1.2.3. Componentes oleosos.....	71
3.1.2.4. Componentes acuosos .....	74
3.1.3. Reactivos analíticos.....	74
3.1.4. Otros materiales.....	75
<b>3.2. Equipos e instrumentos .....</b>	<b>76</b>

<b>3.3. <u>Métodos experimentales</u></b> .....	<b>81</b>
3.3.1 Preparación y caracterización de dispersiones de alginato de sodio y cloruro de calcio .....	81
3.3.2. Preparación y caracterización de emulsiones altamente concentradas (HIPREs) .....	82
3.3.2.1. Preparación de emulsiones altamente concentradas.....	82
3.3.2.2. Caracterización de emulsiones altamente concentradas...	85
3.3.3. Preparación y caracterización de nano-emulsiones.....	87
3.3.3.1. Preparación de nano-emulsiones.....	87
3.3.3.2. Caracterización de nano-emulsiones.....	87
3.3.4. Preparación y caracterización de materiales porosos.....	89
3.3.4.1. Preparación de materiales porosos.....	89
3.3.4.2. Caracterización de materiales porosos.....	91
3.3.5. Preparación y caracterización de nanopartículas.....	94
3.3.5.1. Preparación de nanopartículas a partir de emulsiones altamente concentradas .....	94
3.3.5.2. Preparación de nanopartículas a partir de nano-emulsiones .....	96
3.3.5.3. Preparación de nanopartículas de alginato a partir de soluciones .....	96
3.3.5.4. Caracterización de nanopartículas.....	97
3.3.6. Ensayos de liberación de fármacos a partir de emulsiones altamente concentradas .....	98
3.3.7. Determinación cuantitativa de fármacos.....	100
3.3.7.1. Análisis cuantitativo de ketoprofeno.....	100
3.3.7.2. Análisis cuantitativo de hidrocloreto de clindamicina.....	101
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>103</b>
<b><u>4.1. Preparación y caracterización de dispersiones de alginato de sodio y cloruro de calcio</u></b> .....	<b>105</b>
<b><u>4.2. Preparación y caracterización de emulsiones altamente concentradas basadas en alginato y estudios de incorporación y liberación de fármacos</u></b> .....	<b>109</b>
4.2.1. Preparación de emulsiones altamente concentradas.....	110
4.2.1.1. Preparación de HIPREs W/O e incorporación de fármacos .....	111
4.2.1.2. Preparación de HIPREs O/W e incorporación de fármacos .....	114
4.2.2. Caracterización de emulsiones altamente concentradas.....	117
4.2.2.1. Caracterización de HIPREs W/O.....	117
4.2.2.2. Caracterización de HIPREs O/W.....	123
4.2.3. Estudios de liberación de fármacos desde emulsiones altamente concentradas .....	129
4.2.3.1. Estudios de liberación de ketoprofeno .....	131
4.2.3.2. Estudios de liberación de clorhidrato de clindamicina .....	149

<b><u>4.3. Formación y caracterización de materiales porosos a partir de emulsiones altamente concentradas con alginato reticulado con cloruro de calcio</u></b> .....	<b>159</b>
<b><u>4.4. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio</u></b> .....	<b>166</b>
4.4.1. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro calcio en solución .....	166
4.4.2. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio a partir de HIPREs W/O .....	168
4.4.3. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio a partir de nano-emulsiones .....	172
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>183</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>191</b>





# RESUMEN



El alginato es un polímero aniónico ampliamente utilizado en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, debido a sus propiedades características como son la ausencia de toxicidad, biodegradabilidad, fácil disponibilidad, biocompatibilidad, propiedades mucoadhesivas, ausencia de inmunogeneicidad y facilidad de gelificar en presencia de cationes. Los objetivos de esta Tesis Doctoral se han planteado con la finalidad de desarrollar nuevas formas de dosificación de fármacos basadas en alginato. Teniendo en cuenta las propiedades del alginato y los estudios publicados sobre gelificación y formación de nanopartículas, se ha pretendido utilizar sistemas tensioactivos nanoestructurados, tales como las emulsiones altamente concentradas (HIPREs) de fase externa oleosa (W/O) y de fase externa acuosa (O/W) y las nano-emulsiones de fase externa oleosa (W/O), como plantilla para la obtención de materiales porosos y nanopartículas de alginato, que permitan la incorporación y la liberación controlada de fármacos y que también puedan ser de utilidad en ingeniería biomédica. La utilización de las emulsiones como plantilla puede conseguir un mejor control del tamaño de partícula de los materiales formados. La correcta selección de los aceites y tensioactivos y la emulsificación por métodos de baja energía permitiría la obtención de materiales biocompatibles por métodos escalables industrialmente y sostenibles.

Se ha estudiado la reticulación del alginato de sodio mediante cloruro de calcio, utilizando el método de gelificación externa y se han seleccionado las mezclas más adecuadas para ser incorporadas a los distintos sistemas tensioactivos como componente acuoso, en función de la viscosidad de la mezcla, de las características de la emulsión y de la finalidad del estudio. La composición del componente acuoso ha sido: a) en las HIPREs utilizadas como sistemas de liberación de fármacos: 1% de alginato de sodio y 0,015% de cloruro de calcio, por la baja viscosidad de la mezcla y la facilidad de incorporación en la preparación de la emulsión; b) en las HIPREs utilizadas como plantilla para la formación de materiales porosos y nanopartículas: 2% de alginato de sodio y 0,1% de cloruro de calcio, para conseguir una mayor cantidad de alginato reticulado y c) en las nano-emulsiones W/O utilizadas como plantilla para la formación de nanopartículas: 0,05-0,06% de alginato de sodio y alrededor del 0,1% de

cloruro de calcio, para evitar la precipitación del alginato debido a la baja proporción de componente acuoso.

Se ha estudiado la incorporación del alginato de sodio y el cloruro de calcio como componente acuoso de HIPREs W/O, con un 83% de componente acuoso y una relación de parafina líquida y Cremophor WO7 de 70/30 en peso, y en HIPREs O/W, con un 83% de Miglyol 812 y una relación de componente acuoso y Cremophor RH455 de 80/20. Se ha caracterizado la estructura de las emulsiones mediante microscopía óptica y electrónica y reología, pudiéndose comprobar que las gotas de las HIPREs W/O obtenidas son de tamaño nanométrico mientras que las de las HIPREs O/W son de tamaño micrométrico. La viscosidad está claramente influenciada por la presencia de alginato y por el orden de incorporación del alginato de sodio y el cloruro de calcio en la preparación de la HIPREs, especialmente en las HIPREs W/O, cuyo valor del módulo elástico ( $G'$ ) aumenta considerablemente en presencia de alginato de sodio y cuando se incorpora en primer lugar el cloruro de calcio y seguidamente el alginato de sodio, lo que indica que el proceso de reticulación está influenciado por el orden de incorporación de los componentes. El efecto en la viscosidad de la emulsión no es tan notable como en las HIPREs W/O debido a la baja proporción del componente acuoso que constituye la fase externa.

Se ha incorporado a HIPREs W/O y O/W con alginato reticulado con calcio un fármaco prácticamente insoluble en agua, ketoprofeno, y un fármaco muy soluble en agua, clorhidrato de clindamicina. Se ha estudiado la influencia de la estructura y composición de dichas emulsiones en la liberación de los fármacos desde las emulsiones a una solución receptora. Se ha podido constatar la posibilidad de controlar la liberación del ketoprofeno cuando se incorpora en emulsiones altamente concentradas W/O, en comparación con una solución de ketoprofeno o un hidrogel comercial, especialmente cuando se incorpora alginato en la fase interna y también se ha observado una mayor retención de ketoprofeno cuando el componente acuoso de la HIPRE es el alginato reticulado con cloruro de calcio, cuando se ha incorporado en primer lugar el cloruro de calcio y en segundo lugar el alginato. La mayor retención del principio activo en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W cuando la fase

acuosa está reticulada se podría justificar por la localización preferente del principio activo en las interfases de las HIPREs W/O, debido a su solubilidad y también por la elevada proporción de alginato reticulado en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W, por lo que el efecto de retención en la matriz de alginato es mucho menor.

Los resultados de los estudios de liberación de un fármaco hidrosoluble, clorhidrato de clindamicina, han demostrado que las HIPREs pueden controlar la liberación del mismo: cuando el principio activo está en la fase interna acuosa (HIPREs W/O), debido a su elevada solubilidad en agua, la liberación es extraordinariamente lenta y se acelera ligeramente cuando en la fase interna hay alginato reticulado, probablemente debido a un efecto *salting out* provocado por el cloruro de calcio; sin embargo, cuando el principio activo está mayoritariamente en la fase externa (HIPREs O/W), la liberación es mucho más rápida, alcanzándose la total liberación después de 24-25 horas aunque dicha liberación es muy inferior a la difusión que se produce desde una solución acuosa, por lo que el medio altamente compartimentalizado que caracteriza a las HIPREs permite retardar considerablemente la liberación. El efecto del alginato o del alginato reticulado es insignificante cuando se encuentra en la fase externa, probablemente debido a su baja concentración.

Se ha demostrado que la aplicación del método de gelificación externa de alginato en un medio altamente compartimentalizado como son las HIPREs ofrece nuevas posibilidades para la obtención de materiales que permitan la liberación controlada de fármacos. Del mismo modo en estudios previos realizados con otros sistemas y otros principios activos, se ha constatado la eficacia de los estudios de liberación de principio activo para interpretar las propiedades de sistemas micro y nanoestructurados y diseñar formas de liberación controlada.

Se han obtenido materiales porosos de alginato reticulado con calcio, utilizando como plantilla HIPREs O/W, con un 83% de Miglyol 812 y una relación de componente acuoso y Cremophor RH455 de 80/20, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio al 0,1%. Después de eliminar el componente

oleoso y el tensioactivo, el material poroso obtenido ha sido caracterizado mediante microscopía electrónica y porosimetría. Dichos materiales presentan una porosidad no sólo debida al efecto plantilla de las emulsiones, sino que también presentan porosidad en las paredes de los poros, lo que puede atribuirse a que el alginato está en una proporción muy baja en la fase continua de la HIPRE y no es suficiente para cubrir toda la superficie de la fase continua, con lo que quedan espacios vacíos. El valor relativamente bajo de superficie específica,  $28,85 \text{ m}^2/\text{g}$ , muestra que dichos materiales son básicamente macroporosos.

Se han obtenido nanopartículas de alginato de sodio reticulado con calcio, utilizando como plantilla HIPREs W/O, con un 83% de componente acuoso y una relación de parafina líquida y Cremophor WO7 de 70/30 en peso, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio al 0,1%. Después de eliminar el componente oleoso y el tensioactivo, el material nanoparticulado obtenido ha sido caracterizado mediante microscopía electrónica, constatándose la forma isodiamétrica, la agregación de las partículas y la gran polidispersidad en el tamaño, característico de las HIPREs que se han utilizado como plantilla. El método de preparación, a partir de emulsiones altamente concentradas favorece la agregación de las partículas y la polidispersidad, obteniéndose un material nanoparticulado, cuya estructura es inversa a la estructura del material poroso obtenido a partir de las HIPREs O/W. Si se comparan las partículas obtenidas a partir de las HIPREs con las obtenidas en solución, se observa una mayor densidad de partículas cuando se utilizan HIPREs como plantilla, lo que puede atribuirse tanto a la mayor concentración de alginato utilizado como a la estructura compartimentalizada de las HIPREs, que permite una distribución del alginato más homogénea. Asimismo, se observan diferencias en la morfología de las partículas, siendo mucho más redondeadas las obtenidas a partir de HIPREs.

Se han obtenido nanopartículas de alginato de sodio reticulado con calcio, utilizando como plantilla nano-emulsiones W/O del sistema componente acuoso/mezcla de tensioactivos Cremophor EL:Cremophor WO7 (1:7, en peso)/miristato de isopropilo, con un 85% de miristato de isopropilo y una relación de componente acuoso y mezcla

de tensioactivos de 30/70 en peso, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 0,05-0,06% y cloruro de calcio alrededor del 0,1%. Las nanopartículas de alginato reticulado obtenidas se han caracterizado mediante técnicas de Dynamic Light Scattering (DLS) presentando tamaños inferiores a 150 nm. Se ha constatado una disminución en el tamaño de partícula cuando el alginato está reticulado con calcio, cuando se somete a ultrasonidos después de la incorporación del componente oleoso. Los tamaños obtenidos son considerablemente inferiores y más homogéneos que los de las nanopartículas de alginato de sodio reticuladas sólo con cloruro de calcio descritas en la bibliografía. Los resultados obtenidos en los estos estudios preliminares de preparación de nanopartículas de alginato reticulado a partir de nano-emulsiones ofrecen grandes posibilidades en cuanto al desarrollo de nuevas formas de dosificación de principios activos.





# **INTRODUCCIÓN**



# 1.- INTRODUCCIÓN

El objetivo principal de la Tecnología farmacéutica es el diseño, la fabricación y el control de formulaciones farmacéuticas, consideradas como el producto resultante del proceso tecnológico que confiere a los medicamentos las características adecuadas para facilitar su administración, asegurar la dosificación correcta y conseguir una eficacia terapéutica óptima (Domínguez-Gil, 2004). La liberación de fármacos es un ámbito de investigación fundamental en Farmacia y otras ciencias relacionadas con la salud y la calidad de vida. Los tratamientos farmacológicos para curar o aliviar alteraciones patológicas del organismo requieren que la molécula activa administrada alcance la biofase o lugar de acción. La rapidez con la que el fármaco accede a la zona patológica objeto del tratamiento depende de la vía de administración y la duración de la acción está condicionada por la forma de dosificación empleada. Por ello, en el campo de la Tecnología farmacéutica, es de gran importancia el diseño de nuevas formulaciones que permitan aumentar el rendimiento terapéutico del fármaco ampliando su tiempo de permanencia en la biofase y, además, permitan pautas de dosificación que reduzcan en lo posible los efectos adversos y favorezcan la adherencia al tratamiento por parte del enfermo. Las formas farmacéuticas de liberación controlada cumplen estas condiciones y son objeto preferente en la investigación y el desarrollo farmacéutico (Allen, 2004).

El objetivo de la liberación controlada es conseguir la cantidad necesaria de un fármaco en el momento adecuado y en el lugar preciso (Zhang, 2013). En un sistema de liberación controlada, el fármaco se incorpora a una formulación, que es un soporte constituido generalmente por un material polimérico. La velocidad de liberación del fármaco desde este sistema al medio que lo rodea viene determinada por las propiedades del fármaco y de la formulación, pero también por factores ambientales como pueden ser el pH, la temperatura y la composición de los tejidos o las células del organismo (Peppas, 2013). Dependiendo del fármaco y de la patología a tratar interesará que la liberación tenga el perfil cinético más adecuado. Entre las ventajas de los sistemas poliméricos de liberación controlada de fármacos cabe destacar: a) el mantenimiento de concentraciones plasmáticas de forma continuada durante el

intervalo terapéutico deseado, disminuyendo así el número de dosis, b) la reducción de los efectos adversos derivados de un metabolismo demasiado rápido o de la sobredosificación, c) la protección del fármaco de una rápida degradación química y la vectorización en el lugar de acción evitando efectos indeseables en otros lugares del organismo y d) el aprovechamiento eficaz del fármaco pudiéndose reducir la dosis a administrar. Los sistemas de liberación controlada de fármacos basados en materiales poliméricos se pueden clasificar en tres tipos: sistemas polímero-fármaco conjugado, sistemas reservorio, y sistemas matriciales (Yang, 2012). En los sistemas polímero-fármaco conjugado, el fármaco se encuentra unido covalentemente al polímero de modo que en este sistema, tanto la velocidad como el tiempo de liberación del fármaco se encuentra regulado por el entorno del polímero, ya que es necesaria una degradación de este para su liberación. En los sistemas reservorio se pueden distinguir en dos partes, una parte interior donde se encuentra el fármaco, y otra parte periférica donde se encuentra el polímero, que será el responsable de controlar la liberación. En estos sistemas el fármaco se encuentra encapsulado en la parte interna, por lo que su liberación estará condicionada por las características y propiedades de la cubierta polimérica y por su grosor. Finalmente, en los sistemas matriciales el fármaco se encuentra homogéneamente distribuido dentro de la matriz polimérica, y la liberación dependerá de la estructura de la matriz polimérica.

La nanotecnología aplicada al campo farmacéutico ha permitido el desarrollo de nuevas formas de dosificación basadas en sistemas coloidales. Las tecnologías de nanofabricación, *top-down* y *bottom-up*, han proporcionado sistemas de liberación de fármacos más eficientes, controlando el tamaño y la forma de los materiales obtenidos (Zhang, 2013). La interacción de farmacéuticos, ingenieros, químicos, físicos y médicos, entre otros, ha favorecido el diseño de nuevos sistemas de liberación de fármacos estudiando los fenómenos de transporte a través de materiales avanzados en diferentes condiciones de contorno, obteniendo nuevos dispositivos y perfiles cinéticos inesperados (Sharp, 2011). Las innovaciones en química de materiales han favorecido el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos (*drug delivery systems*), creando vehículos biodegradables, biocompatibles que permiten la vectorización (*targeting*) y que pueden controlar la liberación de la molécula activa en función de

estímulos del medio (Torchilin, 2006). En los últimos años, la nanotecnología ha revolucionado conceptualmente la administración de medicamentos, permitiendo mejores índices terapéuticos, que se traducen en una mejora de la actividad farmacológica disminuyendo la toxicidad, así como la vectorización de fármacos a tejidos y células. No obstante, el estudio de los sistemas nanoestructurados, la correcta caracterización, y el estudio de la cinética de liberación y la biodistribución de los fármacos es lo que permite el diseño óptimo de estas nuevas formas farmacéuticas (Couvreur, 2013). El desarrollo de nuevos sistemas nanoestructurados de liberación controlada de fármacos, tales como las emulsiones altamente concentradas, las nano-emulsiones, los materiales porosos o las nanopartículas, basados en un polímero biocompatible de origen natural como es el alginato, la caracterización y el estudio de la cinética de liberación han sido objeto de la presente Tesis doctoral.

El alginato es un biopolímero formado por ácido D-mannurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) unidos por enlace 1-4. Es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de bacterias (Draget, 2009). El alginato se solubiliza lentamente en agua, formando soluciones coloidales viscosas (Raymond, 2009). La propiedad del alginato para unirse selectivamente a iones es la base de sus propiedades gelificantes (Draget, 2005). El entrecruzamiento de las cadenas de alginato se puede conseguir por métodos químicos o físicos, y la gran variedad de métodos de reacción hacen posible el control de la cinética de gelificación y de las propiedades del hidrogel formado (Bidarra, 2014; Yu, 2008a). Su biocompatibilidad junto con sus propiedades bioadhesivas y mucoadhesivas, justifican su utilización en sistemas de liberación de fármacos a través de mucosas (George, 2006; Swain, 2012). Tanto el alginato como sus derivados representan una opción de futuro para la obtención de nuevos biomateriales para inmovilización de células, control de la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos (Alban, 2002; Coleman, 2011; Senni, 2011; Bidarra, 2014; Venkatesan, 2015). La incorporación de alginato sódico reticulado con cloruro de calcio a sistemas coloidales, tales como las emulsiones altamente concentradas y las nano-emulsiones, para desarrollar sistemas de liberación

controlada de fármacos y para obtener nuevos materiales ha sido objeto de esta Tesis doctoral.

Las emulsiones altamente concentradas, también denominadas HIPREs (High Internal Phase Ratio Emulsions) (Princen, 1983) o emulsiones-gel (Solans, 1986), son emulsiones en que la fracción de volumen de la fase dispersa es superior a 0.74, valor correspondiente al empaquetamiento máximo de esferas monodispersas. Presentan unas propiedades reológicas, estructurales y ópticas características debido a su alto contenido de fase dispersa. Su estructura consiste en un empaquetamiento de gotas en forma poliédrica separadas por una fina capa de fase continua que puede tener, a la vez, una estructura de microemulsión o de cristal líquido (Kunieda, 1987; Solans, 2004). Dependiendo de la fracción de volumen de la fase dispersa, temperatura, etc. su comportamiento reológico puede pasar de elástico a viscoelástico (Pons, 1993). Las emulsiones altamente concentradas son de interés para un gran número de aplicaciones: en industria alimentaria, en formulaciones cosméticas, como sistemas de liberación controlada de fármacos (Calderó, 2012) y como plantillas para la preparación de materiales porosos poliméricos (Ruckenstein, 1992; Williams, 1988) y partículas. Los materiales porosos estructurados suponen una innovación galénica como sistemas de administración de fármacos. La utilización de emulsiones altamente concentradas como plantilla para la obtención de materiales porosos permite el control del tamaño y de la forma de los poros (Esquena, 2003; Blin, 2006; Canal, 2012). Las espumas poliméricas sólidas de baja densidad, con macroporos interconectados se pueden obtener por la polimerización o la deposición polimérica en la fase continua de emulsiones altamente concentradas. Cuando el proceso tiene lugar en la fase interna, es posible obtener material en forma de partículas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de materiales meso / macroporosos a partir de emulsiones altamente concentradas de fase externa acuosa y oleosa para diferentes aplicaciones industriales (Esquena, 2006).

Las nano-emulsiones, también denominadas miniemulsiones, emulsiones submicrométricas o emulsiones ultrafinas, son emulsiones con tamaño de gota en el rango nanométrico (20-200 nm) y presentan un creciente interés científico y

tecnológico, debido a su amplia gama de aplicaciones en diferentes campos, y en especial en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Solans, 2005). Las ventajas de las nano-emulsiones con respecto a las emulsiones convencionales (con gotas de tamaño micrométrico) son consecuencia de su pequeño tamaño de gota que les confiere una gran estabilidad cinética, elevada superficie interfacial y transparencia óptica. Las nano-emulsiones también presentan ventajas con respecto a las microemulsiones, ya que necesitan una concentración de tensioactivo inferior para su formación (García-Celma, 2016). Las nano-emulsiones se pueden formar por métodos de alta energía, utilizando homogeneizadores de alta presión o sonicadores de ultrasonidos, o por métodos de baja energía, que aprovechan la energía intrínseca de los componentes del sistema que se libera durante el proceso de emulsificación y que permiten obtener tamaños de gota muy pequeños y baja polidispersidad (Solans, 2012). Las nano-emulsiones han sido estudiadas en nuestro grupo de investigación como plantilla para la preparación de nanopartículas para la vehiculación de fármacos (Calderó, 2011; Morral-Ruíz, 2012; Fornaguera, 2015).

En la presente Tesis doctoral se han preparado emulsiones altamente concentradas, W/O y O/W, basadas en alginato de sodio reticulado con cloruro de calcio como sistemas de liberación de fármacos hidrófilos y lipófilos; a partir de estas emulsiones altamente concentradas se han preparado materiales porosos y nanopartículas y también se han elaborado nanopartículas de alginato reticulado con calcio utilizando nano-emulsiones como plantilla.

En el apartado de introducción de esta Tesis doctoral se describe el alginato como polímero biocompatible de origen natural, con el que se han preparado emulsiones altamente concentradas como sistemas de liberación de fármacos, materiales porosos y nanopartículas. Asimismo, se explicarán las propiedades características de las emulsiones altamente concentradas y de las nano-emulsiones, que han servido como plantilla para la obtención de los materiales porosos y las nanopartículas.

## 1.1. Alginato

### 1.1.1. Estructura, obtención y propiedades características

Los alginatos son biomoléculas binarias copoliméricas que están formadas por ácido D- mannurónico (M) y ácido L-gulurónico (G) unidos por enlace 1-4 (Figura 1.1).

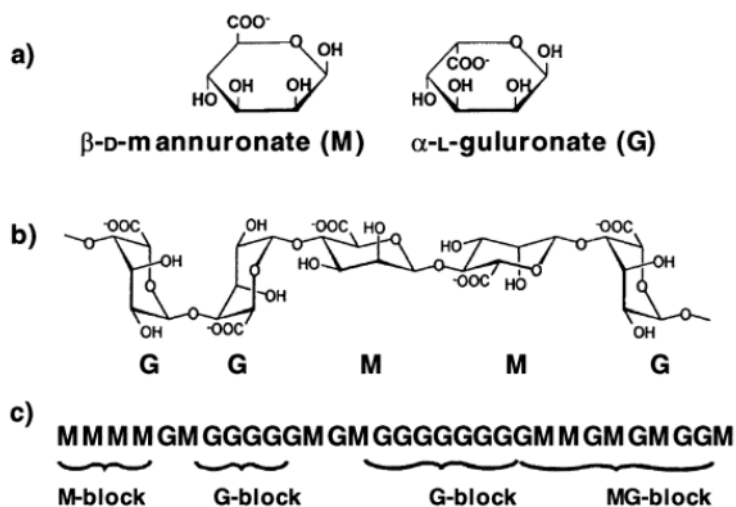


Figura 1.1 Características estructurales del alginato: a) Monómeros, b) Cadena, c) Fracciones o bloques (Draget, 2005).

El alginato es abundante en la naturaleza y se puede encontrar como componente estructural de las algas marinas pardas y como polisacárido estructural de bacterias (Draget, 2009). La composición química y la secuencia monomérica puede variar ampliamente entre especies de algas aún en diversas partes de la misma y con el año de cosecha. El alginato comercializado se extrae de algas pardas (*Phaeophyceae*) como *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lessonia nigrescens*, *Durvillea antarctica* y *Sargassum* spp (Lee, 2012) (Figura 1.2). El alginato se encuentra en la matriz intracelular en forma de sal de varios cationes como el magnesio, el calcio o el sodio (Gombotz, 2012).





Figura 1.2. Esquema representativo de las especies del género *Laminaria*.

([www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net))

También se puede obtener por biosíntesis bacteriana de *Azobacter vinelandii* y varias especies de *Pseudomonas*, resultando un alginato con estructura química y propiedades físicas más bien definidas que el procedente de las algas (Draget, 2005; Gombotz, 2012; Lee, 2012). La biosíntesis bacteriana del alginato consiste en la oxidación de la fuente de carbono a acetil-CoA para entrar en el ciclo de Krebs y vía gluconeogénesis formar fructosa-6-fosfato. Posteriormente, sobre esta fructosa-6-fosfato se producen una serie de reacciones para convertirla en ácido mannurónico, que será el precursor del alginato (Clark, 1936; Pawar, 2012).

El ácido algínico fue descubierto, extraído y patentado por Standford durante la década del 1880 (Standford, 1881). La patente describe la obtención del alginato, sumergiendo las algas en agua o ácido diluido, haciendo una extracción con carbonato sódico y precipitando el alginato de la solución con ácido. Aunque Krefting (Krefting, 1898) fue el primero en obtener una forma de ácido algínico purificado, no fue hasta 1930 cuando se describió la estructura del alginato (Nelson, 1929).

El alginato obtenido a partir de fuentes naturales puede presentar algunas impurezas, como endotoxinas, metales pesados o proteínas, entre otras. Estas impurezas se

deben eliminar si se pretende utilizar el alginato para aplicaciones farmacéuticas (Gombotz, 2012).

## **Propiedades fisico-químicas**

Los alginatos, como en general todos los polisacáridos, varían mucho en cuanto al peso molecular (Draget, 2009). El peso molecular del alginato sódico comercializado puede oscilar entre 32000 y 400000 g/mol (Lee, 2012). Se han realizado estudios de las propiedades fisicoquímicas y la reología de esferas de alginato en presencia de varios cationes divalentes y que muestran la influencia de la naturaleza del catión, la concentración del polímero, del catión y la fuerza iónica en las propiedades mecánicas de las esferas de alginato (Ouwerx, 1998).

El alginato sódico rico en ácido gulurónico es más soluble en agua que el alginato rico en ácido mannurónico (Goh, 2012). La viscosidad de las soluciones de alginato aumenta al disminuir el pH, alcanzando un máximo a pH 3-3,5 cuando los grupos carboxilo se protonan y forman enlaces de hidrógeno (Lee, 2012). Una solución de alginato es más viscosa cuanto más elevado sea el peso molecular del alginato (Draget, 2009). El peso molecular del alginato tiene una gran importancia en sus aplicaciones, ya que su composición y la relación de bloques M/G pueden variar la viscosidad de las soluciones y los hidrogeles de alginato (Lee, 2012). En general, hay tres parámetros que determinan y limitan la solubilidad del alginato en agua: el pH del disolvente, la fuerza iónica del medio y la presencia de iones gelificantes en el disolvente (Draget, 2005; Lee, 2012; Pawar, 2012). Mediante potenciometría se ha determinado que las constantes de disociación (pKa) de los monómeros del ácido mannurónico y gulurónico son 3,38 y 3,65 respectivamente (Draget, 2009). El alginato es prácticamente insoluble en etanol (95%), en éteres, cloroformo o en soluciones hidroalcohólicas en las que la concentración de etanol sea superior al 30%. También es prácticamente insoluble en otros disolventes orgánicos y en soluciones acuosas ácidas en las que el pH es inferior a 3. El alginato se solubiliza lentamente en agua, formando una solución coloidal viscosa (Raymond, 2009). Asimismo, la solubilidad del alginato

depende del grupo carboxílico. Un ácido algínico con el grupo carboxílico en forma protonada no será totalmente soluble en agua (Lee, 2012; Pawar, 2012).

La propiedad del alginato para unirse selectivamente a iones es la base de sus propiedades gelificantes (Draget, 2005). La unión a iones divalentes depende de la composición en bloques G del alginato, ya que los bloques M no han demostrado tener afinidad selectiva por dichos iones, tal como se ha indicado anteriormente. La afinidad de los alginatos por los iones divalentes de los metales alcalinos aumenta según el orden:  $Mn < Co, Zn, Ni < Ca < Sr < Ba < Cd < Cu < Pb$  (Gombotz, 2012; Pawar, 2012). Esta característica unión selectiva a iones se explicará más detalladamente en la formación de geles de alginato según el modelo denominado *caja de huevos* ("Egg-box model") (Grant, 1973).

El alginato sódico en forma de polvo seco es estable durante meses si se almacena en un lugar seco, fresco y protegido de la luz solar. En el congelador, el alginato sódico puede mantenerse estable durante varios años. En cambio, el ácido algínico desecado tiene una estabilidad limitada a temperatura ambiente debido a la degradación intramolecular catalizada por ácidos (Draget, 2009). Los alginatos pueden degradarse en presencia de ácidos y bases y también a pH neutro en presencia de compuestos reductores como hidroquinona, sulfito sódico, cisteína, ácido ascórbico o sulfato de hidrazina, entre otros. El mecanismo de degradación implica la formación de un peróxido que da lugar a la formación de radicales libres que finalmente provocan la rotura de la cadena de alginato (Draget, 2005; Lee, 2012; Pawar, 2012). También se produce la degradación del alginato por técnicas de esterilización por calor, con óxido de etileno o rayos gamma (Draget, 2005).

## Propiedades biológicas

El alginato no es tóxico y es biodegradable cuando se administra por vía oral (George, 2006). Está incluido entre los compuestos considerados seguros (GRAS o Generally Recognized as Safe) por la FDA (Food and Drug Administration). Se utiliza ampliamente en la industria alimentaria como emulsificante y estabilizante.

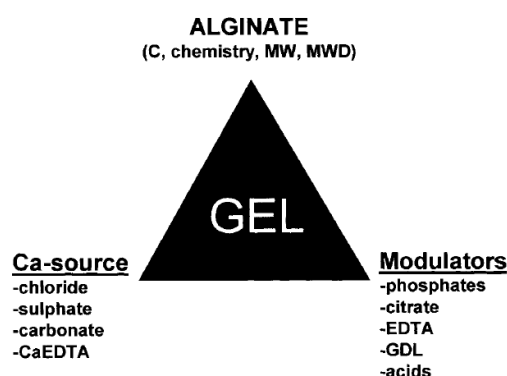
La biocompatibilidad del alginato se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo la administración intravenosa de alginato sigue siendo objeto de debate (George, 2006). Algunos estudios han demostrado que un alginato con un elevado contenido en bloques M es inmunogénico y aproximadamente 10 veces más potente que un alginato rico en bloques G, en cuanto a inducir la producción de citoquinas (Lee, 2012). Otros estudios, en cambio, han encontrado escasa o nula inmunorrespuesta cuando se han aplicado implantes de alginato. La respuesta inmunológica se podría atribuir a impurezas tales como metales pesados, endotoxinas o compuestos polifenólicos, ya que el uso de alginato purificado no ha demostrado reacción inmune (George, 2006).

La bioadhesión se refiere al contacto entre dos superficies, cuando una de ellas es un sustrato biológico. Si una de las superficies es una mucosa, se denomina mucoadhesión. El alginato tiene propiedades bioadhesivas y mucoadhesivas, por lo que es un buen candidato para ser utilizado en sistemas de liberación de fármacos a través de mucosas (Chickering, 1995; George, 2006; Swain, 2012).

Tanto el alginato como sus derivados obtenidos por modificaciones químicas en los grupos carboxilo e hidroxilo, representan una opción de futuro para la obtención de nuevos biomateriales para inmovilización de células, control de la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos (Alban, 2002; Senni, 2011; Coleman, 2011; Bidarra, 2014; Venkatesan, 2015).

## 1.1.2. Reticulación del alginato

Los hidrogeles son estructuras tridimensionales reticuladas compuestas por polímeros hidrófilos con un elevado contenido en agua (alrededor del 95%) (Lee, 2012; Paques, 2014). La formación de un hidrogel depende de las características del polímero y del reticulador. En el caso de los hidrogeles de alginato, depende de la naturaleza y propiedades de la cadena polimérica, del tipo de reticulador y del tipo de modulador o agente auxiliar reticulador, tal como se resume en la Figura 1.3.



*Figura 1.3. Esquema de los parámetros que controlan la cinética y las propiedades de los hidrogeles de alginato (Draget, 2009).*

El alginato se utiliza en forma de hidrogel en biomedicina, en aplicaciones tales como la curación de heridas, en la liberación de fármacos y en ingeniería de tejidos (Lee, 2012). También se puede preparar esponjas oleosas de alginato los cuales puede ser útiles como vehículos para contener sustancias solubles en fase oleosa como ciertos saborizantes, vitaminas o colorantes (Nussinovitch, 1997).

El entrecruzamiento de la cadena de alginato se puede conseguir por métodos químicos o físicos, y la gran variedad de métodos de reacción hacen posible el control de la cinética de gelificación y de las propiedades del hidrogel formado (Yu, 2008a; Bidarra, 2014). Tal como se puede observar en la figura 1.4 (Draget, 2005), los geles

procedentes de alginatos con un elevado contenido en bloques G tienen tendencia a formar geles fuertes, rígidos y porosos, en cambio, los geles procedentes de alginato con un elevado contenido en bloques M tenderán a formar geles más débiles y elásticos (Lee, 2012; Paques, 2014).

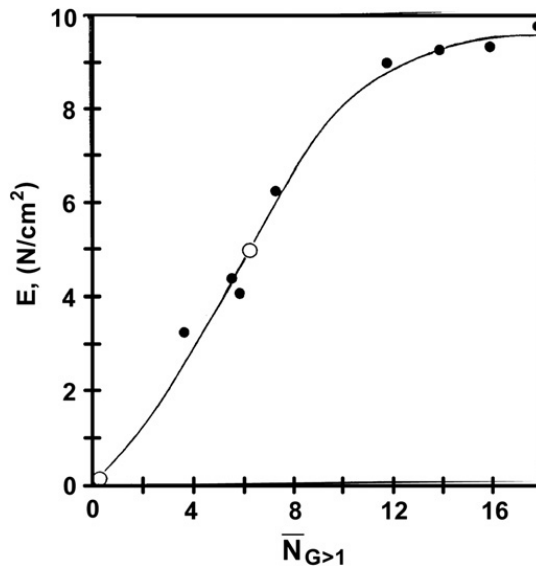


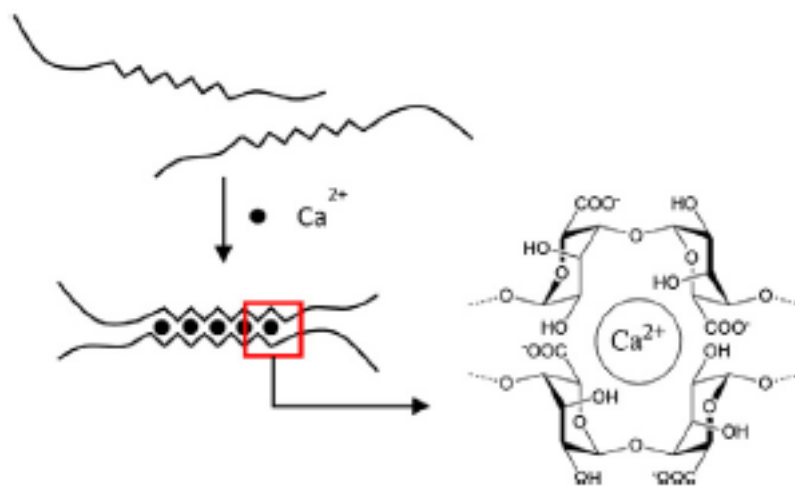
Figura 1.4. Gráfico de la fuerza del gel ( $E$ ) en función del contenido en bloques G (Draget, 2005).

A continuación, se describen brevemente los principales métodos de reticulación de las cadenas de alginato.

## Reticulación iónica

El método más utilizado para preparar hidrogeles de alginato consiste en mezclar una solución de alginato con un agente reticulador iónico, como son los cationes divalentes. El alginato con un alto contenido de ácido gulurónico proporciona importantes propiedades mecánicas en la formación de hidrogeles (Kurt, 2011). Los alginatos presentan diferente afinidad por los cationes divalentes, lo que dará lugar a

geles con diferentes propiedades físico-químicas y estabilidad (Bidarra, 2014). Los cationes divalentes como el calcio se unen preferentemente en los bloques de guluronato (bloques G), por ello, un alginato con una elevada proporción de bloques G formará un gel mucho más rígido que con otro alginato con baja proporción de guluronato (Lee, 2012; Pawar, 2012). El bloque G de un polímero se une con el bloque G de otro polímero formando una estructura característica en forma de caja de huevos (“egg-box model”) (Grant, 1973), que dará lugar a la formación de un gel, tal como se representa en la figura 1.5 (Paques, 2014). El alginato se une específicamente a numerosos iones divalentes para formar hidrogeles de alginato, sin embargo, esta afinidad no se manifiesta en presencia de  $Mg^{2+}$  e iones monovalentes, por lo que no se forman hidrogeles en presencia de dichos iones (George, 2006; Gombotz, 2012).



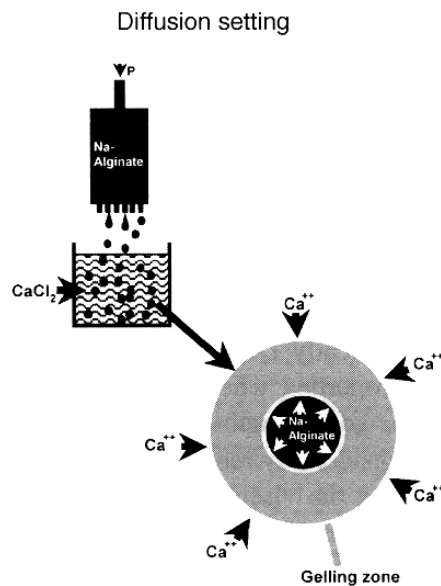
*Figura 1.5. Representación esquemática del modelo “Egg-box” con cationes calcio (Paques, 2014).*

El cloruro cálcico ( $CaCl_2$ ) es uno de los agentes más utilizados para la reticulación iónica debido a su solubilidad en soluciones acuosas, aunque el proceso de gelificación puede resultar rápido y descontrolado. Para reducir la velocidad de gelificación se puede utilizar una solución reguladora que contenga fosfato, ya que entonces los grupos fosfato compiten con los grupos carboxilos del alginato para unirse a los cationes divalentes, retardando así la gelificación. Otros agentes reticulantes son el

sulfato cálcico ( $\text{CaSO}_4$ ) y el carbonato cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ), ya que debido a su menor solubilidad en soluciones acuosas permiten reducir la velocidad de gelificación (Lee, 2012).

La gelificación de las soluciones de alginato mediante cationes se puede producir por dos métodos, denominados gelificación externa (o método de difusión) y gelificación interna (o gelificación *in situ*), tal como se representa en la Figura 1.6.

a)



b)

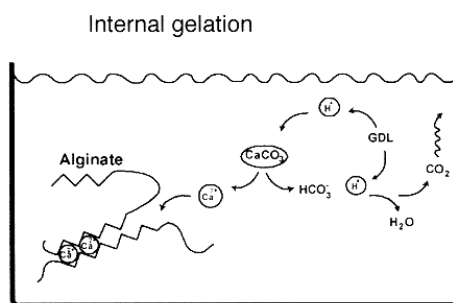


Figura 1.6. Representación de dos ejemplos de reticulación iónica: a) Gelificación externa: Solución de  $\text{CaCl}_2$  y b) Gelificación interna: Solución de  $\text{CaCO}_3$  (Draget, 2009).



El  $\text{CaCl}_2$  se utiliza como reticulante en el método de gelificación externa, en donde los iones calcio difunden desde una fase continua (solución de  $\text{CaCl}_2$ ) al interior de gotas de alginato, formando una matriz gelificada (Paques, 2014). En el método de gelificación interna se utiliza como reticulante una sal insoluble en agua, como el  $\text{CaCO}_3$ , que se mezcla con la solución de alginato. Los iones calcio se liberan desde el interior de la mezcla cuando se disminuye el pH y/o se aumenta la solubilidad de la sal de calcio, dando lugar a la formación del gel de alginato (Draget, 2009; Paques, 2014). Barbetta y colaboradores describen la formación de hidrogeles de alginato poroso para obtener matrices por medio de la formación de  $\text{CO}_2$  *in situ*, al ser desplazado por un ácido y posterior formación de burbujas de gas, que al ser desplazadas dejan una formación porosa (Barbetta, 2009).

La cinética de gelificación es un factor muy importante en el control de la fuerza y uniformidad del gel cuando se utilizan cationes divalentes, ya que una gelificación lenta permitirá obtener estructuras más uniformes y más integradas (Kuo, 2001).

La temperatura de gelificación también afectará a la cinética de gelificación y a las propiedades finales del hidrogel, ya que a bajas temperaturas se puede reducir la reactividad de los agentes reticulantes y, en consecuencia, la formación de gel (Lee, 2012).

Uno de los puntos críticos de la gelificación iónica, que puede resultar beneficioso o perjudicial en sus aplicaciones, es la limitada estabilidad a largo plazo en condiciones fisiológicas y el intercambio de cationes divalentes por cationes monovalentes así como la liberación de calcio en el interior del organismo. Además, los hidrogeles de alginato pueden utilizarse como matriz para la agregación de plaquetas y eritrocitos (Lee, 2012).

## Otros métodos de reticulación

La reticulación covalente se ha estudiado para mejorar las propiedades físicas de los geles, sobretodo en el campo de la ingeniería de tejidos. Uno de los primeros agentes reticulantes utilizados en la reticulación covalente fueron los polietilenglicoles de diferente peso molecular, con los que se prepararon una gran variedad de geles con diversas propiedades mecánicas. También se ha utilizado la PEG-diamina. Es importante tener en cuenta que el exceso de agente reticulante que no haya reaccionado debe eliminarse del gel para no inducir toxicidad (Lee, 2012). En la reticulación iónica hay pérdida de agua y deformación plástica, lo que se observa cuando los enlaces sometidos a tensión se disocian y se vuelven a asociar (Pawar, 2012). Este hecho también se ha constatado en la reticulación covalente pero la imposibilidad de disociarse hace que la deformación sea elástica.

La foto-reticulación es la gelificación *in situ* que se puede realizar en condiciones de reacción suaves. El alginato modificado con metacrilato y reticulado por la exposición a un láser (Láser de iones de argón, 514 nm) durante 30 segundos en presencia de eosina y trietanolamina, forma hidrogeles claros y flexibles. Estos geles tienen potencial en cirugía sin suturas ya que se podrían aplicar en el sellado de la córnea *in vivo* en casos de perforación (Lee, 2012). Al tratarse de un nuevo método de reticulación, se requieren más estudios para evaluar su efectividad (Alban, 2002).

La reticulación celular se basa en la capacidad de las células para contribuir en la formación de geles. Cuando el alginato se modifica con ligandos de adhesión celular, la capacidad para unir varias cadenas poliméricas puede llegar a gran distancia y mediante la unión receptor-ligando se puede formar una red uniforme. Por otra parte, las células añadidas a una solución de alginato no modificado, se agregan y forman una estructura no uniforme, tal como se puede apreciar en la figura 1.7 (Lee, 2012; Pawar, 2012).

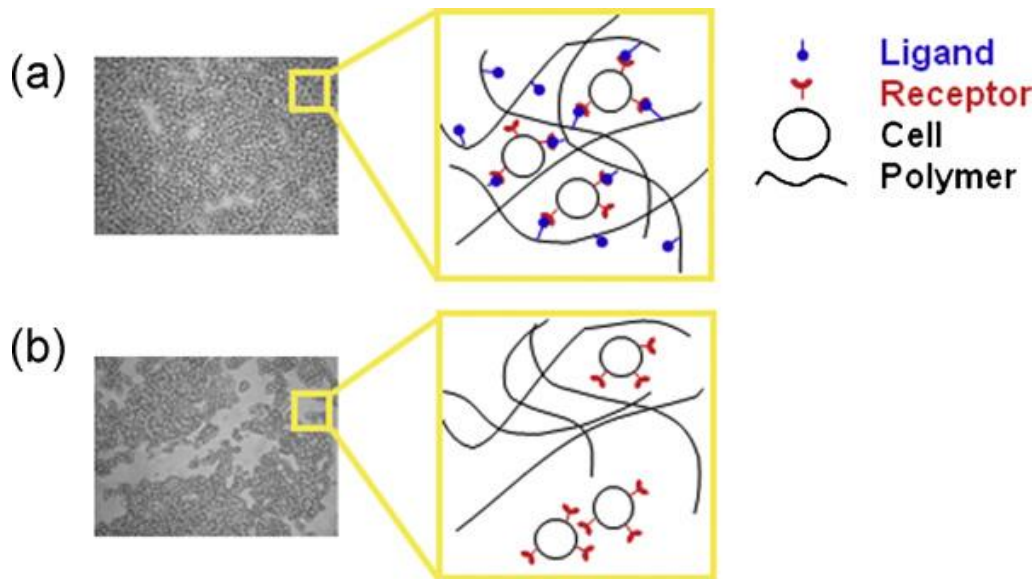


Figura 1.7. Representación del entrecruzamiento celular en: a) Solución de alginato modificado con ligando de adhesión celular y b) Solución de alginato no modificado (Lee, 2012).

Esta estructura no uniforme es el resultado del predominio de las interacciones célula-célula y no receptor-ligando. Una vez se rompe la estructura del gel por una fuerza de cizalla, las estructuras de entrecruzamiento se recuperan en pocos minutos. El sistema se puede aplicar a la liberación de células en ingeniería de tejidos, ya que el gel podría estar en estado líquido durante la inyección al paciente y solidificar al entrar en contacto con las células del organismo (Alban, 2002; Lee, 2012). La reticulación celular de alginato constituye un reto en biomedicina con numerosas potenciales aplicaciones.

### 1.1.3. Aplicaciones farmacéuticas y biomédicas del alginato

El interés por nuevas formas de dosificación en las que la liberación del fármaco pueda ser controlada, se ha incrementado de manera constante durante los últimos años. En la mayoría de los casos, el objetivo es conseguir un medicamento que mantenga un efecto terapéutico prolongado con una frecuencia de dosificación reducida (Aulton, 2003). La cantidad de fármaco que llega al lugar de acción dependerá de la dosis y de la velocidad y grado de absorción y distribución en el organismo. Para conseguirlo, el

principio activo ha de llegar al lugar de acción en una concentración suficientemente elevada como para iniciar una respuesta farmacológica (Banker, 2002). Una forma de dosificación generalmente consta de uno o más principios activos junto con un número variable de excipientes que se han añadido a la formulación para facilitar la preparación y la administración, promover la liberación y la biodisponibilidad del fármaco y protegerlo de la degradación. Los excipientes se consideran componentes inertes, que no ejercen ninguna acción terapéutica o biológica. Sin embargo, los excipientes pueden influir en la velocidad y el grado de absorción de un fármaco y las propiedades biofarmacéuticas de un medicamento dependen en gran manera de la adecuada selección de los excipientes (Aulton, 2003).

Numerosos polímeros se utilizan como excipientes en la formulación de sistemas de liberación controlada de fármacos. Los polímeros de alginato son de gran interés en la formulación de medicamentos debido a sus características: son inertes, dan lugar a la formación de matrices hidrófilas e hidrogeles, presentan una elevada porosidad permitiendo la difusión de macromoléculas, se disuelven y se degradan en condiciones fisiológicas, etc. (Gombotz, 2012). Las propiedades de los alginatos permiten considerarlos como excipientes idóneos para nuevas aplicaciones farmacéuticas y biomédicas (Tonnesen, 2002; Kristiansen, 2009). A continuación se describen brevemente algunas aplicaciones de los alginatos en formas farmacéuticas convencionales y en nuevas formas de dosificación.

### **Alginato en formas farmacéuticas convencionales**

Los alginatos se utilizan en varias formas farmacéuticas, tanto por vía tópica como por vía oral (Khan, 1972; Bennett, 1974; Sjöblom, 2001; Tonnesen, 2002). Se utilizan como espesantes y agentes de suspensión en pastas, cremas y geles, a concentraciones que oscilan entre el 1 y el 10%. En comprimidos y cápsulas, se utilizan el ácido algínico, el alginato cálcico y el alginato cálcico-sódico como aglutinantes y disgregantes en concentraciones que varían entre el 1 y el 10% p/p. El ácido algínico

también se utiliza como estabilizante en emulsiones de aceite en agua en concentraciones entre el 1 y el 3%.

Terapéuticamente, el ácido algínico se utiliza como antiácido, en formulaciones comercializadas como Gaviscon® y en el tratamiento del reflujo gastroesofágico en combinación con un antagonista de la histamina H<sub>2</sub> (Bennett, 1974).

### **Alginato en formas farmacéuticas de liberación controlada**

El alginato sódico se ha utilizado en formulaciones de liberación sostenida por vía oral. Su función es la de retardar la disolución del fármaco en comprimidos, cápsulas y suspensiones acuosas (Zatz, 1987; Veski, 1994; Azarmi, 2003; Raymond, 2009).

Las propiedades adhesivas de los geles de alginato sódico han permitido investigar la liberación de fármacos mediante comprimidos que se adhieren a la mucosa del tracto gastrointestinal, así como en geles bucales y comprimidos vaginales. La adhesión esofágica de las suspensiones de alginato, proporciona una barrera contra el reflujo gástrico y sirven para controlar la liberación del principio activo en un lugar específico. También se han descrito soluciones oftálmicas que forman un gel *in situ* al ser administradas, geles formados *in situ* que contienen paracetamol para la administración oral y sistemas de liberación nasal basados en microesferas bioadhesivas (Raymond, 2009). Asimismo se han investigado sistemas de liberación de proteínas y péptidos basados en alginatos (Gombotz, 1995).

El alginato sódico se ha utilizado para la microencapsulación acuosa de fármacos, como una alternativa a otras técnicas de microencapsulación que utilizan disolventes orgánicos (Bodmeier, 1993). Se han estudiado sistemas de dosificación flotantes constituidos por microcápsulas de alginato cálcico, con distintos principios activos, tales como amoxicilina (Whitehead, 2000), o furosemida (Iannuccelli, 2000). También se ha estudiado el alginato en sistemas de liberación controlada de diclofenac (Mirghani, 2000), insulina (Rasmussen, 2003) o ampicilina (Torre, 1998). Las

microcápsulas de alginato recubiertas con quitosano han demostrado ser eficaces para retardar la liberación de verapamilo (Pasparakis, 2006) y podrían resultar de utilidad para la liberación controlada de fármacos con estructura peptídica en el tracto gastrointestinal (Raymond, 2009). La impregnación de meloxicam en microcápsulas de alginato cálcico ha demostrado poder reducir el riesgo de ulceración y de inflamación de la mucosa bucal (Fathy, 2006).

Un ejemplo de la aplicación de la nanotecnología al desarrollo de sistemas de dosificación con alginato es el desarrollo de nanopartículas para la encapsulación de fármacos antituberculosos, tales como la isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol para ser administradas por vía oral (Ahmad, 2008). Tal como se observa en la Figura 1.8, el perfil plasmático de los cuatro antituberculosos administrados en ratones en forma de nanopartículas en comparación con los fármacos sin encapsular ofrece claras ventajas, que permiten plantear un cambio de posología debido a la liberación sostenida de los fármacos nanoencapsulados. La liberación sostenida de los fármacos puede explicarse por las propiedades bioadhesivas del alginato, que permite una adhesión prolongada de la formulación en la mucosa intestinal, aumentando el tiempo disponible para su absorción.

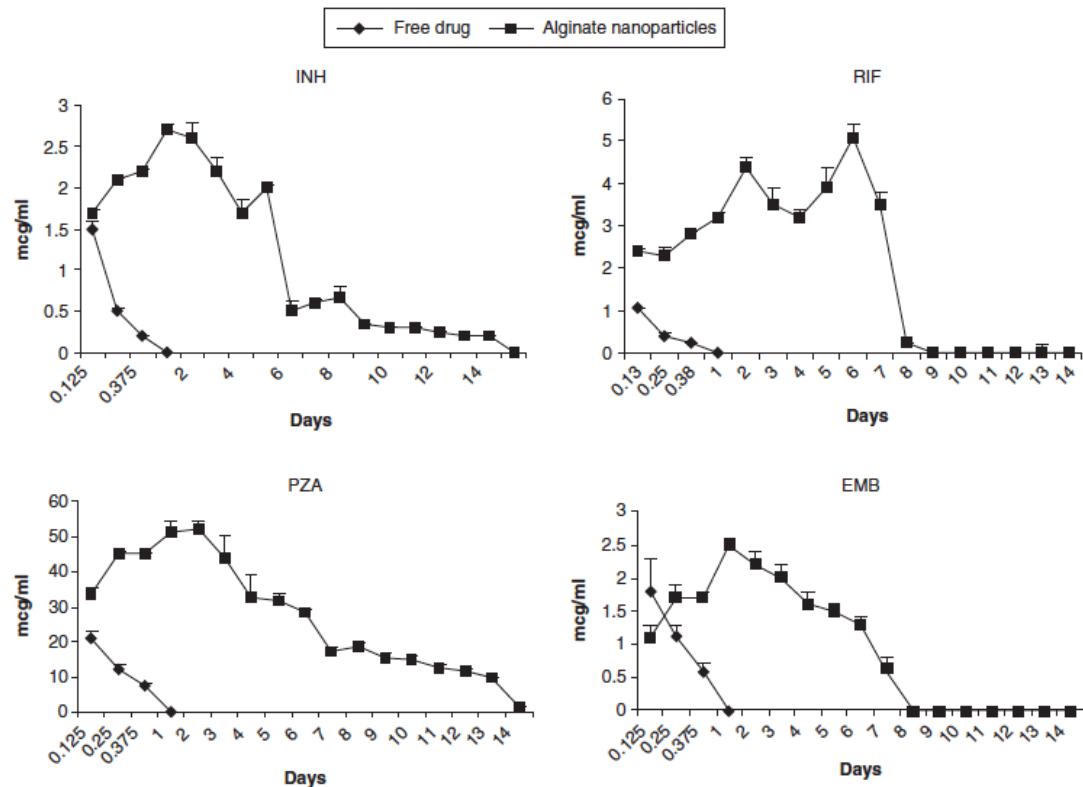


Figura 1.8. Perfiles plasmáticos después de una dosis oral de nanopartículas con antituberculosos en comparación con el fármaco libre (Ahmad, 2008).

En otros estudios se han utilizado nanocápsulas cargadas con doxorubicin y cubiertas con alginato las mismas que han demostrado buena eficiencia terapéutica contra *Leishmania* en hamsters (Kansal, 2014). Existen numerosos estudios publicados sobre encapsulación de antineoplásicos, hormonas, etc., en nanoagregados, nanocápsulas y nanoesferas de alginato (Rajaonarivony, 1993; Yu, 2008b; Liu and Zhang, 2010). En un estudio, Bhowmik y colaboradores prepararon y evaluaron nanocápsulas cargadas con testosterona las cuales mostraron un patrón de liberación sostenida (Bhowmik, 2006). Cabe destacar los estudios sobre formación de nanosistemas terapéuticos de alginato y quitosano para la encapsulación de insulina y diversos antineoplásicos (Sarmiento, 2007a y 2007b, Cafaggi, 2007). Los alginatos han demostrado efectos significativos en la inducción de formación de ácido deoxicólico en cáncer de la mucosa esofágica. El reflujo de ácidos biliares dentro del esófago están implicados en el llamado esófago de Barrett (el cual es una condición metaplástica y precursora del adenocarcinoma esofágico), los ácidos biliares a pH 4 inducen la expresión del gen c-myc. Los alginatos son capaces de prevenir la inducción de c-myc mediante acidificación con ácido deoxicólico *in vitro* (Dettmar, 2007).

También se han descrito nanopartículas de alginato sódico recubiertas con quitosano para la administración de vacunas a través de la mucosa (Borges, 2005). En los trabajos publicados se destacan los factores que afectan a la eficiencia de encapsulación y liberación de los fármacos, como son el pH del medio, la naturaleza y viscosidad del alginato, las propiedades físico-químicas del fármaco encapsulado, el agente de reticulación y el tamaño de partícula de los agregados. Estos factores son de gran importancia para el desarrollo de nuevos sistemas de dosificación.

### **Alginato en productos sanitarios**

El tratamiento de heridas agudas y crónicas es una necesidad clínica y quirúrgica y los apósitos de alginato ofrecen numerosas ventajas. Los apósitos de alginato no sólo ejercen una función barrera que evita la entrada de patógenos en la herida sino que proporcionan un entorno húmedo y facilitan la cicatrización (Lee, 2012). Los apósitos de alginato se fabrican por reticulación iónica de una solución de alginato con iones calcio para formar un gel, seguido de un proceso para formar láminas porosas liofilizadas. Los apósitos de alginato secos absorben los fluidos de la herida para regelificarse, y así pueden suministrar agua a una herida seca, manteniendo un microambiente húmedo y fisiológico que minimiza la posibilidad de infección bacteriana en el lugar de la herida. Estas funciones también permiten la epitelización rápida y la curación de la herida. Actualmente existen una gran variedad de apósitos de alginato comercializados y se está estudiando la incorporación de fármacos en los apósitos para ser liberados directamente a la herida y así aumentar la velocidad de cicatrización (Goh, 2012).

### **Alginato en medicina regenerativa**

Los alginatos son materiales de gran interés en ingeniería biomédica (Shapiro, 1997; Augst, 2006; Orive, 2006; Huang, 2012; Ruvinov, 2015). Una de las ventajas que



ofrecen es su capacidad para proporcionar un entorno físico-químicamente favorable para la inmovilización y el desarrollo de células vivas (Veski, 1994). Entre sus propiedades cabe destacar la biocompatibilidad, naturaleza no trombogénica, ausencia de inmunogeneidad y textura similar a la matriz extracelular (Shapiro, 1997). La capacidad de los alginatos para encapsular células se ha estudiado en los últimos años (Ruvinov, 2015). Los geles de alginato se han investigado como vehículos para liberar proteínas o células que puedan dirigir la regeneración de diversos tejidos y órganos en el organismo humano, tales como los vasos sanguíneos, los huesos o los cartílagos.

Los geles de alginato se han estudiado como promotores de la formación de vasos sanguíneos por su capacidad para lograr una liberación sostenida y localizada de factores de crecimiento tales como VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular). También se ha estudiado su potencial aplicación para la regeneración de los huesos mediante la liberación de factores osteoinductores o células formadoras de hueso (Venkatesan, 2015). Los geles de alginato poseen ventajas respecto a otros materiales en ingeniería de tejidos óseos, por su capacidad de ser introducidos en el organismo de forma poco invasiva, su capacidad para rellenar defectos de forma, por la posibilidad de ser modificados químicamente mediante ligandos de adhesión y de factores de inducción de tejido como el TFG- $\beta$ . En la reparación de cartílago dañado o degradado, los geles de alginato han demostrado su eficacia para el trasplante de células condrogénicas en modelos animales. Recientemente se han realizado ensayos clínicos para la utilización de implantes de alginato inyectables que inhiben los procesos de daño celular posteriores al infarto de miocardio (Ruvinov, 2015), facilitando la reparación y la reconstrucción del tejido cardíaco.

El profundo conocimiento de las propiedades del alginato permitirá desarrollar en un futuro próximo la producción de biomateriales estandarizados para trasplantes de órganos y tejidos así como los medios adecuados para la regeneración celular.

## **1.2. Emulsiones altamente concentradas**

### **1.2.1. Definición, clasificación y propiedades generales de emulsiones**

Las emulsiones son sistemas dispersos constituidos por dos o más fases líquidas inmiscibles. Una de las fases, denominada fase interna, dispersa o discontinua, está dispersada en forma de gotas en el seno de la otra fase, denominada fase externa, dispersante o continua (Becher, 1972; Sherman, 1968). Una definición más amplia de emulsiones contempla la dispersión de una fase líquida y/o una fase con estructura de cristal líquido en el seno de un líquido (IUPAC, 1971).

Las emulsiones se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios, tal como se indica a continuación.

Según la naturaleza de las fases, se distinguen dos tipos de emulsiones (Tadros, 1983):

- Emulsiones de agua en aceite (W/O), en las que la fase interna es acuosa y la fase externa oleosa.
- Emulsiones de aceite en agua (O/W), en las que la fase interna es oleosa y la fase externa es acuosa.

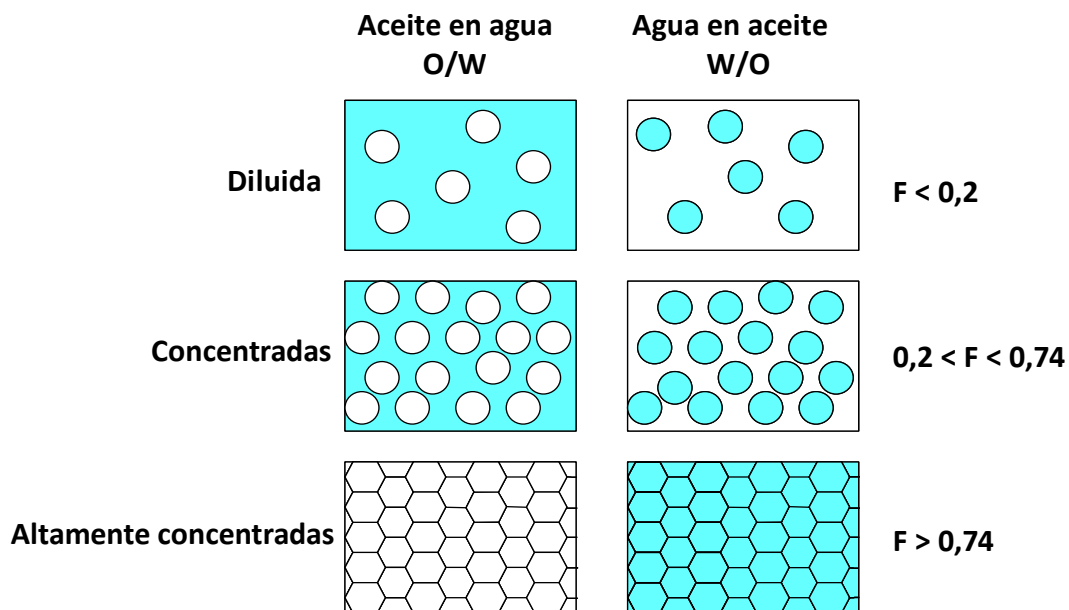
Se entiende por fase oleosa cualquier líquido inmiscible en la fase acuosa, independientemente de su naturaleza química, y por fase acuosa cualquier componente más polar que el componente oleoso e inmiscible con él.

Según el volumen relativo de las fases (Figura 1.9), las emulsiones se clasifican en (Lissant, 1974):

- Emulsiones diluidas, con una fracción en volumen de fase interna inferior a 0,2 aproximadamente.
- Emulsiones concentradas, con una fracción en volumen de fase interna entre aproximadamente 0,2 y 0,74.

- Emulsiones altamente concentradas, con una fracción en volumen de fase interna superior a 0,74.

La fracción en volumen de fase interna que distingue las emulsiones diluidas y las concentradas es aproximado y obedece a criterios reológicos, siendo emulsiones diluidas las que se comportan como fluidos newtonianos. En cambio, el límite para las emulsiones altamente concentradas corresponde exactamente al máximo empaquetamiento de esferas rígidas de igual radio (Lissant, 1966; Princen, 1987).



*Figura 1.9. Representación esquemática de emulsiones según la naturaleza y la fracción en volumen de la fase interna (F).*

Las emulsiones también se pueden clasificar según el tamaño de las gotas en dos grandes grupos:

- Macroemulsiones, cuando el tamaño de gota es igual o superior a 1  $\mu\text{m}$ , presentando un aspecto lechoso característico.
- Nano-emulsiones, también denominadas miniemulsiones, emulsiones submicrométricas o emulsiones ultrafinas, cuando el diámetro de gota es inferior a 1  $\mu\text{m}$ , aunque en aplicaciones farmacéuticas se suelen considerar nano-emulsiones cuando el tamaño de gota es inferior a 200 nm.

Según la estructura de la emulsión, se clasifican en:

- Emulsiones simples, que están constituidas por una fase interna y una fase externa.
- Emulsiones múltiples, constituidas por una emulsión simple dispersada en una fase externa (Seifriz, 1925; Matsumoto, 1976). Las emulsiones múltiples pueden ser de fase externa acuosa (W/O/W) o de fase externa oleosa (O/W/O).
- Emulsiones mixtas, constituídas por dos emulsiones simples del mismo tipo, que contienen gotas de fase interna de distinta composición. Pueden ser de fase externa acuosa (O1+O2/W) o de fase externa oleosa (W1+W2/O) (Audrey, 2009).

Las emulsiones también se pueden clasificar según la nanoestructura de la fase continua (Llinàs, 2010). Se han descrito emulsiones altamente concentradas con fases de microemulsión (Kunieda, 1987; Solans 1988; Pons, 1993) y de cristal líquido cúbico (Rodríguez, 2000; Kunieda, 2001; Uddin, 2001) en la fase externa. Según este criterio, las emulsiones de fase externa acuosa (O/W) podrían ser O/ME si tienen microemulsión en la fase externa o O/CL si tienen cristal líquido en la fase externa y las emulsiones de fase externa oleosa (W/O) podrían ser W/ME o W/CL. Los diferentes tipos de estructuras presentes en las emulsiones son importantes para su estabilidad, por las propiedades reológicas y además, pueden modular la cinética de liberación de principios activos (Hans, 1994).

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables y por ello requieren aporte de energía para su formación. El área total interfacial generada en el proceso de emulsificación es muy grande debido a la formación de gotas al dispersar uno de los líquidos en el seno del otro. La energía libre de formación de una emulsión vendrá dada por la expresión:

$$\Delta G = \gamma \Delta A - T \Delta S \quad (1)$$

donde  $\Delta G$  es el incremento de la energía libre del sistema,  $\gamma$  es la tensión superficial,

$\Delta A$  es el incremento de la superficie interfacial,  $T$  representa la temperatura, y  $\Delta S$  es el incremento de entropía del sistema (Becher, 1972).

Los métodos de formación de emulsiones se pueden clasificar en métodos de alta o de baja energía. Los métodos de alta energía o de dispersión, se basan en el aporte de energía externa al sistema, generalmente mecánica, y el tamaño de gota resultante depende de la magnitud de este aporte. Los métodos de baja energía o de condensación, son métodos en los que la energía proviene de la energía interna de los propios componentes de la emulsión. Dentro de estos métodos se encuentra el método de inversión de fases y los métodos de autoemulsificación o emulsificación “espontánea”. Generalmente, el tamaño de gota de las emulsiones que se obtienen con estos métodos suelen ser más pequeño y con menor polidispersidad (Shinoda, 1969; Forgiarini, 2001; Izquierdo, 2002; Solé, 2012). Para la formación de emulsiones por métodos mecánicos se pueden utilizar diferentes instrumentos, entre los que destacan el agitador sencillo, el molino coloidal y el homogeneizador de alta presión.

Como las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables, la incorporación de compuestos estabilizantes (emulgentes o emulsionantes), les puede conferir una cierta estabilidad cinética. Como estabilizantes se pueden utilizar, tensioactivos, polímeros, o partículas finamente divididas (Friberg, 1988). Independientemente del tipo de estabilizante utilizado, las emulsiones se desestabilizan siguiendo diferentes procesos que se pueden dar de forma simultánea o secuencialmente. Dichos procesos son: sedimentación directa o inversa (cremado), floculación, coalescencia, y maduración de Ostwald (Taylor, 1998). La Figura 1.10 muestra de manera esquemática estos procesos.

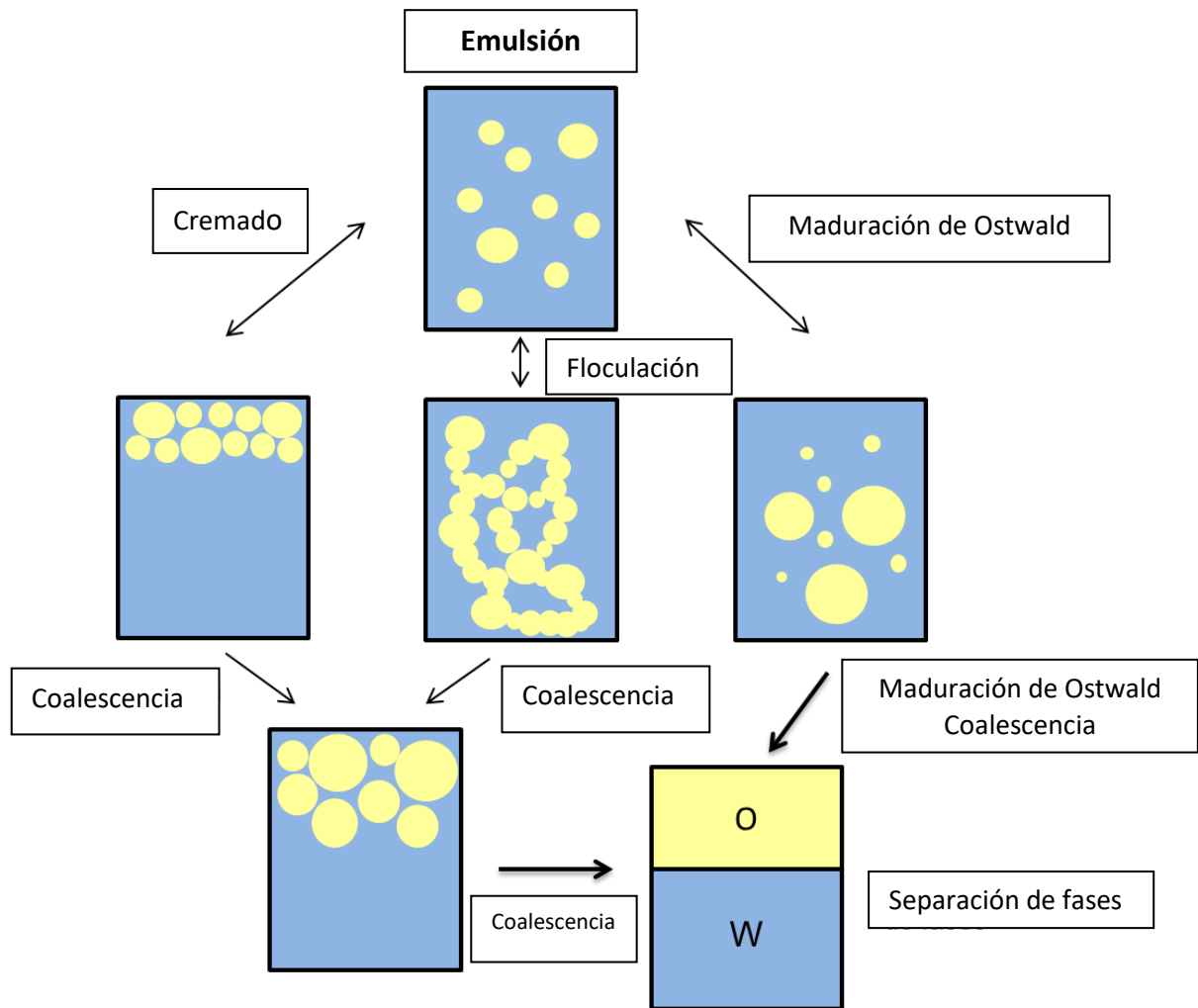


Figura 1.10. Representación esquemática de los procesos de inestabilidad de emulsiones.

**Sedimentación:** Se produce como resultado de la diferencia en la densidad existente entre la fase continua y la fase dispersa de una emulsión. Si la densidad de la fase dispersa es inferior a la de la fase continua, la fase dispersa se concentra en la parte superior de la emulsión y el proceso se denomina cremado o sedimentación inversa. En los procesos de sedimentación, el tamaño de gota no varía y es posible revertir el proceso mediante agitación. La velocidad de sedimentación, asumiendo que las gotas son esféricas y monodispersas, se puede expresar mediante la ley de Stokes:

$$v_s = \frac{2(\rho_c - \rho_d)gr^2}{9\eta} \quad (2)$$

donde  $v_s$  es la velocidad de sedimentación,  $\rho_c$  es la densidad de la fase continua,  $\rho_d$  es la densidad de la fase dispersa,  $g$  es la aceleración de la gravedad,  $r$  el radio de las gotas, y  $\eta$  representa la viscosidad de la fase continua. Por tanto, es posible reducir la velocidad de sedimentación reduciendo el tamaño de gota de las emulsiones, igualando las densidades de las dos fases o aumentando la viscosidad de la fase continua.

**Floculación:** Consiste en la agrupación de las gotas en forma de agregados. Las gotas agregadas no pierden su identidad ya que se encuentran separadas unas de las otras por la película interfacial y el proceso es reversible mediante agitación. La floculación es más importante para emulsiones diluidas que para las concentradas y aumenta con la polidispersidad de la emulsión.

**Coalescencia:** Consiste en la unión de dos o más gotas de emulsión para formar una gota mayor. Este fenómeno, a diferencia de los dos anteriores es un proceso irreversible y conlleva la ruptura de la emulsión (Tadros, 1983). La probabilidad de que se produzca coalescencia debido a los encuentros entre dos gotas como consecuencia del movimiento browniano es casi despreciable. La coalescencia se produce en una capa de cremado o en un estado floculado en que el tiempo de contacto entre las gotas es mucho mayor, de manera que se produce una ruptura de la película interfacial.

**Maduración de Ostwald:** Este fenómeno irreversible tiene lugar en emulsiones polidispersas y consiste en un aumento del tamaño de las gotas grandes en detrimento de las gotas pequeñas. Este fenómeno es debido a la diferente presión de Laplace entre las gotas grandes y las pequeñas, que provoca la rotura de las pequeñas y la difusión de su contenido hacia las gotas grandes que incrementan su tamaño.

Los tensioactivos son las moléculas más utilizadas en la formación y estabilización de emulsiones gracias a la habilidad que presentan para migrar y adsorberse en la interfase líquido-líquido reduciendo de esta manera la tensión interfacial. Los tensioactivos son moléculas formadas por dos partes bien diferenciadas, una parte lipófila y otra hidrófila, por lo que reciben el nombre de moléculas anfifílicas. En función del tipo de ion que forman en solución se pueden clasificar en: tensioactivos aniónicos, cuando la parte hidrófila se encuentra cargada negativamente; tensioactivos catiónicos, cuando la parte hidrófila se encuentra cargada positivamente; tensioactivos anfóteros, cuando la parte hidrófila está formada por un grupo aniónico y otro catiónico, que se ionizarán según el pH del medio; y tensioactivos no iónicos, cuando la parte hidrófila no se encuentra ionizada.

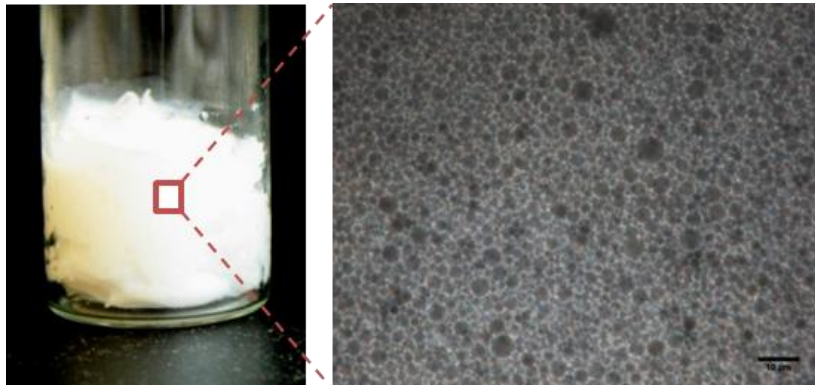
Los tensioactivos, aparte de tener actividad superficial, poseen la capacidad de autoagregarse en solución a partir de una cierta concentración. Así, a partir de una concentración que se conoce como concentración micelar crítica (CMC), propia de cada tensioactivo, forman agregados espontáneamente. La CMC se identifica por cambios detectables en las propiedades físicas de las soluciones de tensioactivos como la tensión superficial, presión osmótica, conductividad eléctrica, etc. El tipo de agregados que formarán los tensioactivos en solución se puede predecir mediante el número correspondiente al balance hidrófilo-lipófilo (HLB) y el parámetro de empaquetamiento crítico (CPP). El número HLB fue introducido por Griffin (Griffin, 1949) y consiste en una clasificación de los tensioactivos en función del peso molecular relativo de su parte hidrófila y lipófila. Así, propuso una escala arbitraria con unos valores comprendidos entre 1-40. Los tensioactivos más hidrófilos tienen valores elevados del HLB ( $> 11$ ) y podrían formar emulsiones O/W, mientras que los tensioactivos más lipófilos tienen un HLB comprendido entre 1 y 8 y podrían formar emulsiones W/O. Los tensioactivos con valores del HLB entre 8 y 11 denotan un equilibrio entre la parte hidrófila y lipófila. El parámetro de empaquetamiento crítico (CPP) (Israelachvili, 1976) permite predecir el tipo de agregado en función de la geometría del tensioactivo. La aplicación del número HLB y del CPP para predecir los tipos de agregados que se formarán en un sistema presentan algunas limitaciones ya



que ambos parámetros derivan directamente de las propiedades estructurales de la molécula de tensioactivo y no tienen en cuenta las interacciones con el medio que le rodea.

### 1.2.2. Formación, estabilidad y propiedades de las emulsiones altamente concentradas

Las emulsiones altamente concentradas también conocidas en la literatura como HIPREs (*high internal phase ratio emulsions*) (Princen, 1983), o emulsiones-gel (Solans, 1986), son emulsiones en las que la fracción de volumen de la fase dispersa es superior a 0,74, valor correspondiente al empaquetamiento máximo de esferas monodispersas. Un empaquetamiento superior a 0,74 se logra si las gotas son poliédricas y/o monodispersas. El aspecto típico de las emulsiones altamente concentradas ya sean del tipo O/W o del tipo W/O es muestra en la Figura 1.11.



*Figura 1.11. Aspecto visual e imagen de microscopía óptica de una emulsión altamente concentrada (Roig, 2016).*

Estas emulsiones presentan unas propiedades reológicas, estructurales y ópticas características debido a su alto contenido de fase dispersa. Tal y como se observa en la figura precedente, su estructura consiste en un empaquetamiento de gotas en forma poliédrica separadas por una fina capa de fase continua que puede tener, a la

vez, una estructura de microemulsión o de cristal líquido (Kunieda, 1987; Solans, 2004). Dependiendo de la fracción de volumen de la fase dispersa, temperatura, etc, su comportamiento reológico puede pasar de un comportamiento elástico a uno viscoelástico (Pons, 1993). En cuanto a su aspecto, éstas suelen ser opacas, aunque también pueden ser transparentes o translúcidas en función de la diferencia en el índice de refracción entre la fase interna y la externa (Rodríguez, 2000). Las emulsiones altamente concentradas presentan, generalmente, una elevada polidispersidad. Debido a sus propiedades, las emulsiones altamente concentradas son de interés en un gran número de aplicaciones entre las que destacan las aplicaciones alimentarias, cosméticas y farmacéuticas (Calderó, 2012), especialmente como sistemas de liberación controlada de principios activos. En los últimos años se ha descrito la utilización de emulsiones altamente concentradas como plantillas para la preparación de materiales porosos poliméricos (Ruckenstein, 1992; Williams, 1988).

Las emulsiones altamente concentradas se pueden preparar tanto con tensioactivos iónicos como no iónicos). Los más utilizados son los tensioactivos no iónicos etoxilados lineales del tipo  $C_mE_n$  (siendo  $m$  el número de carbonos en la cadena lipófila y  $n$ , el número de óxidos de etileno). Estos tensioactivos tienen distintos números HLB en función de los valores de  $m$  y  $n$ , y permiten la formación de emulsiones de fase externa acuosa (O/W) y de fase externa oleosa (W/O) (Kunieda, 1987; Solans, 1988; Kunieda, 1990). Otros tensioactivos no iónicos que también se utilizan con frecuencia son los ésteres de ácidos grasos y el sorbitano (SPAN®) (Chen, 1990), y también los tensioactivos poliméricos (Ganguly, 1992). Los componentes oleosos más utilizados son los hidrocarburos lineales o aromáticos, pero también los triglicéridos y los ésteres. En la formación de emulsiones altamente concentradas se consideran factores críticos la relación entre el tensioactivo y el componente oleoso y los métodos de preparación.

El método convencional para la formación de emulsiones altamente concentradas es el de las adiciones sucesivas. Este método consiste en la adición gota a gota de la fase dispersa sobre la fase continua bajo agitación (Lissant, 1966). En muchos casos es importante que esta adición se produzca en pequeñas cantidades para que la emulsión

no se desestabilice antes de llegar a la concentración de fase dispersa correspondiente a la de una emulsión altamente concentrada. El tamaño de las gotas y la polidispersidad de las emulsiones altamente concentradas que resultan de la aplicación de este método, dependen de la energía de agitación utilizada en su formación (Capdevila, 2010). Otra manera de preparar emulsiones altamente concentradas es mediante el método de emulsión múltiple, que consiste en pesar y mezclar todos los componentes de la emulsión, agitando enérgicamente la mezcla a temperatura controlada. Las emulsiones altamente concentradas se forman a partir de emulsiones múltiples O/W/O o W/O/W, en las que la fase externa pasa a ser la fase interna durante la emulsificación (Kunieda, 1987). Los métodos descritos se pueden considerar métodos de alta energía; no obstante, también se pueden obtener emulsiones altamente concentradas mediante el método PIT (Phase Inversion Temperature) (Shinoda, 1968), que es un método de baja energía. Este método se basa en el cambio de la solubilidad de los tensioactivos no iónicos etoxilados con la temperatura; de este modo, es posible obtener una emulsión altamente concentrada del tipo W/O de manera espontánea desde una solución micelar o microemulsión del tipo O/W mediante un aumento rápido de la temperatura (Pons, 1994; Kunieda, 1996). Una emulsión altamente concentrada del tipo O/W se obtendría de la misma manera pero partiendo de una microemulsión del tipo W/O mediante una disminución de la temperatura (Ozawa, 1997).

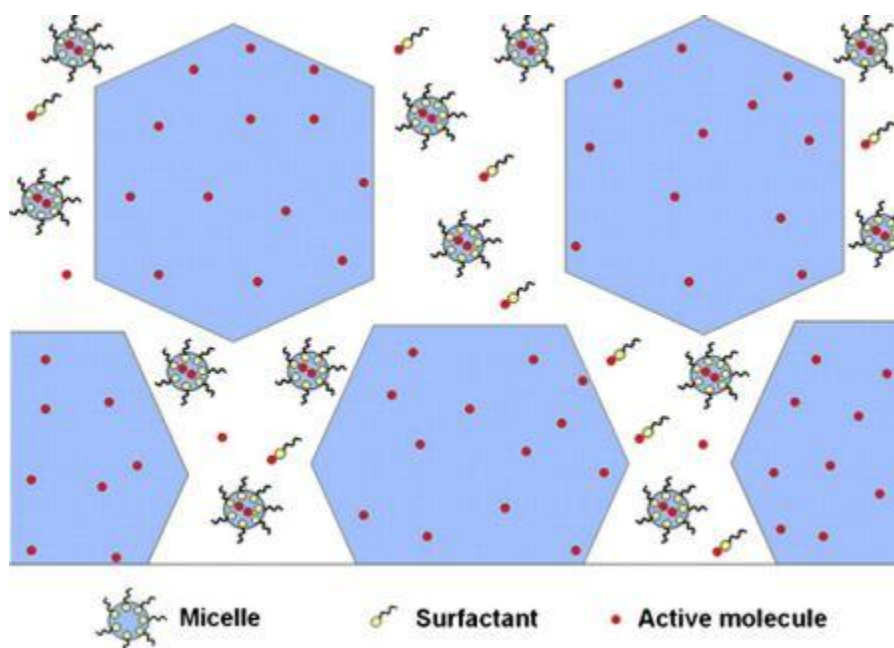
Las emulsiones altamente concentradas, como cualquier otro tipo de emulsiones, son sistemas termodinámicamente inestables y siempre se acabarán separando en las dos fases inmiscibles que las forman. De todos modos, estos sistemas pueden tener estabilidad cinética, cierta estabilidad a lo largo del tiempo, en función de su composición (Pons, 1994), la temperatura (Kunieda, 1987), o la fracción de volumen de la fase dispersa. Otro aspecto importante en referencia a la estabilidad de las emulsiones altamente concentradas es la naturaleza del aceite que constituye la fase oleosa. Así, cuanto mayor sea la energía libre interfacial entre la fase oleosa y la fase acuosa que constituyen la emulsión altamente concentrada mayor será su estabilidad cinética (Chen, 1990). También se ha estudiado el efecto de la presencia de electrolitos en la estabilidad de emulsiones W/O, ya que su presencia provoca un aumento en la

absorción de tensioactivo en la interfase agua/aceite de modo que se produce una disminución de la tensión interfacial aumentando la estabilidad (Aronson, 1993). Los electrolitos más eficaces en la estabilización de emulsiones altamente concentradas W/O son los que producen un mayor efecto “salting out”, es decir, los que disminuyen la solubilidad del tensioactivo deshidratando las cabezas polares de los tensioactivos no iónicos etoxilados (Kunieda, 1989).

### **1.2.3. Las emulsiones altamente concentradas como medios de difusión de principios activos**

Las características estructurales, reológicas y ópticas de las emulsiones altamente concentradas, tanto de tipo W/O como O/W, permiten considerarlas como vehículos adecuados para la liberación de fármacos. El conocimiento y el control de la difusión molecular en emulsiones altamente concentradas pueden proporcionar una información fundamental para el diseño y aplicación de nuevas formas de dosificación de principios activos (Calderó, 2000; Rocca, 1999; Calderó, 2010), en el diseño racional de materiales inteligentes blandos y duros (Esquena, 2003; Maekawa, 2003; Busby, 2002), para mejorar la estabilidad química y coloidal de las emulsiones altamente concentradas (Nielsen, 2004), en procesos de desemulsificación (Guimaraes, 2010) o incluso para el conocimiento de aspectos estructurales (Malmborg, 2003). Aunque la liberación de principios activos se ha estudiado ampliamente en sistemas coloidales como emulsiones múltiples, nanopartículas, nano-emulsiones, microemulsiones, hidrogeles, etc., la difusión en emulsiones altamente concentradas no se ha estudiado en profundidad, a pesar de sus características únicas en cuanto a la compartimentación en diferentes escalas de longitud, con dominios hidrófilos e hidrófobos, y la elevada proporción de fase interna. En este sentido, cabe destacar los estudios sistemáticos realizados con principios activos farmacéuticos o cosméticos incorporados en sistemas modelo que, aunque no son de aplicación práctica, proporcionan una valiosa información científica. En los últimos años, se han realizado estudios de difusión en emulsiones altamente concentradas con componentes apropiados para el campo de aplicación propuesto (Calderó, 2010). Se han estudiado aspectos relacionados con la composición química de las emulsiones, tales como la

influencia de la fracción de fase dispersa (Calderó, 1997), el tipo y la concentración de tensioactivo (Calderó, 1998; Babak, 2003), la fuerza iónica de la fase dispersa acuosa (Calderó, 1997), etc. Estos estudios demostraron el papel clave de la película interfacial, así como el coeficiente de reparto de la molécula que difunde entre la fase continua y la fase dispersa. Las investigaciones realizadas en los años noventa principalmente en emulsiones altamente concentradas W/O (Calderó 1997, 1998, 2000) han permitido proponer un mecanismo de liberación (Figura 1.12), que consta de dos etapas simultáneas: el paso de la molécula de difusión a través de la película interfacial de la fase dispersa, y la difusión en la fase continua.



*Figura 1.12 Representación esquemática de la localización de las moléculas activas durante el proceso de difusión en emulsiones altamente concentradas (Calderó, 2012).*

El paso a través de la película interfacial fue identificado como la etapa limitante. Cuanto mayor sea la concentración de la molécula que difunde en la fase continua, más rápida es la difusión. Además, el transporte de un fármaco modelo (ácido mandélico) en la fase continua se explicó en términos de transporte micelar, difusión de especies no ionizadas del fármaco en la fase continua y también transporte de fármaco unido a monómeros de tensioactivo (Calderó, 2000). Además, se han

propuesto modelos matemáticos para describir y predecir la liberación de activos desde emulsiones altamente concentradas (Pons, 1996; Rocca, 1999; Babak, 2003; Llinàs, 2013).

Todavía quedan aspectos importantes relacionados con la liberación de fármacos desde emulsiones altamente concentradas que merecen ser investigados, tales como el diseño de sistemas de liberación que respondan a estímulos, la absorción de activos para fines de desintoxicación o de descontaminación, etc. En los últimos años ha habido un creciente interés por el uso de emulsiones altamente concentradas para la preparación de materiales, pero poca atención se ha centrado en la difusión, lo que podría mejorar la calidad y el rendimiento de los materiales obtenidos. Cabe destacar que la difusión molecular desde emulsiones altamente concentradas O/W ha sido menos estudiada en comparación con las emulsiones W/O. Además, el efecto de la nanoestructura en la fase continua y en la fase dispersa en la difusión molecular no se ha explorado suficientemente todavía. Los resultados obtenidos hasta el momento impulsando la investigación en esta Tesis doctoral.

#### **1.2.4. Las emulsiones altamente concentradas como plantilla para la preparación de materiales porosos y nanopartículas**

Una de las aplicaciones más novedosas de las emulsiones altamente concentradas ha sido su utilización como plantilla para la obtención de materiales altamente porosos, también denominados espumas sólidas. Dichos materiales se obtienen generalmente mediante reacciones de polimerización (Ruckenstein, 1988 y 1992; Esquena, 2003) que tienen lugar en la fase continua y/o en la fase dispersa de las emulsiones y pueden utilizarse como moldes para la obtención de materiales con porosidad dual macro y mesoporosa (Maekawa, 2003). En la obtención de materiales porosos mediante sistemas coloidales, se genera el sistema bifásico y generalmente la polimerización tiene lugar en la fase continua (Cameron, 2011). Las entidades coloidales sirven para formar la porosidad en el material y al final del proceso son eliminadas del sistema. Dependiendo de la naturaleza del sistema coloidal (emulsiones, microemulsiones, etc.), el tamaño de los poros generados puede ser de nanómetros hasta cientos de

micras. Si la polimerización tiene lugar en la fase dispersa, el material obtenido son micro- o nanopartículas.

Los primeros estudios publicados sobre la obtención de materiales porosos a partir de emulsiones altamente concentradas (Bartl, 1962; Barby, 1982 y 1985) pusieron de manifiesto el gran potencial que presentaban este tipo de emulsiones. En la última década, las emulsiones altamente concentradas han sido ampliamente utilizadas para la obtención de materiales porosos con diferentes estructuras y se han preparado mediante una gran variedad de métodos. Una de las principales clasificaciones de estos tipos de materiales se basa en el tamaño de sus poros. Según la IUPAC (Sing, 1985), los materiales macroporosos presentan tamaños de poro superiores a 50 nm, los mesoporosos tamaños de poro comprendidos entre 2 y 50 nm, y los materiales microporosos tienen tamaños de poro inferiores a 2 nm. Las primeras investigaciones basadas en la obtención de materiales orgánicos macroporosos se centraron en el uso de polímeros orgánicos como el poliestireno y el divinilbenceno como agente entrecruzante (Esquena, 2003; Solans, 2003; Wong, 2013; Ceglia, 2014). A partir de estos resultados se utilizaron otros polímeros hidrófobos, como los acrilatos, para la obtención de materiales macroporosos a partir de emulsiones de tipo agua en aceite (W/O).

La incorporación de monómeros o polímeros hidrófilos en la fase continua de emulsiones altamente concentradas también se ha estudiado en profundidad. En este caso las emulsiones utilizadas son emulsiones del tipo aceite en agua (O/W), de modo que la polimerización o el entrecruzamiento se produce en la fase continua de las emulsiones (Ruckenstein, 1988). Estos sistemas permiten incorporar polímeros solubles en agua, de origen natural y/o biocompatibles, tales como el quitosano, alginato o gelatina (Barbetta, 2005; Miras, 2013 y 2013b; Zhou, 2012 y 2013).

En general, los procedimientos para la obtención de materiales porosos mediante emulsiones altamente concentradas tanto del tipo W/O como O/W se conocen como métodos de una etapa (Esquena, 2006), representados esquemáticamente en la Figura 1.13.

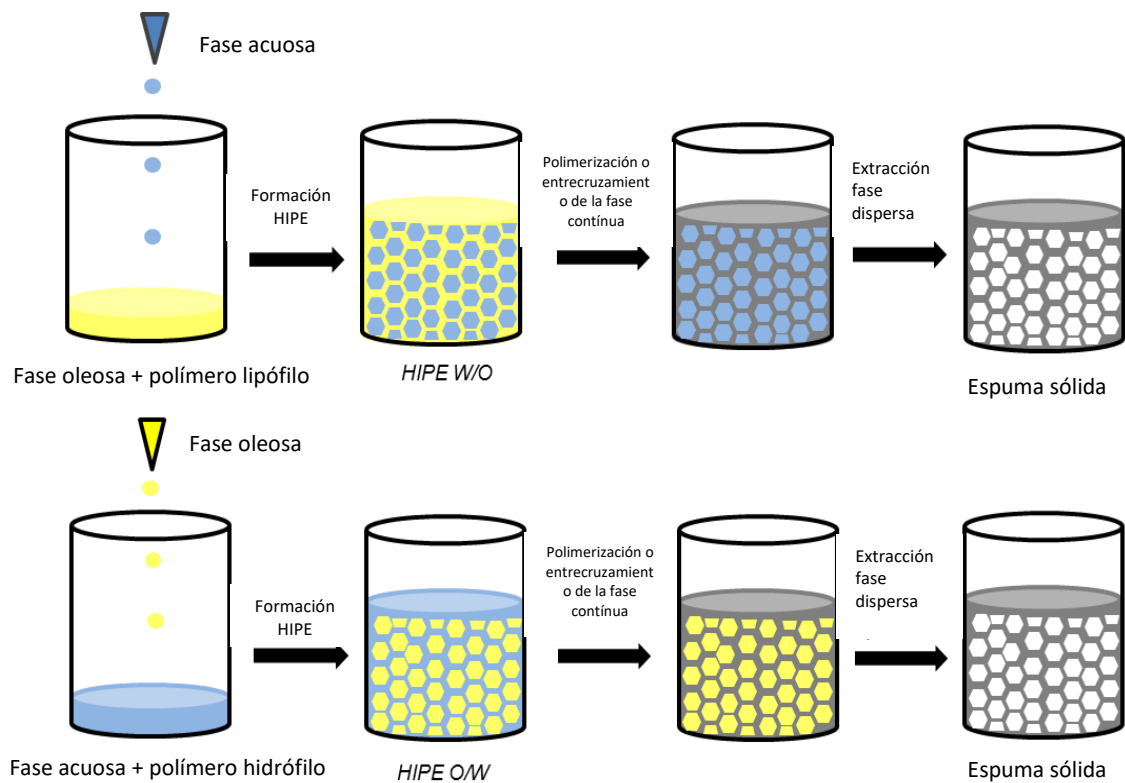


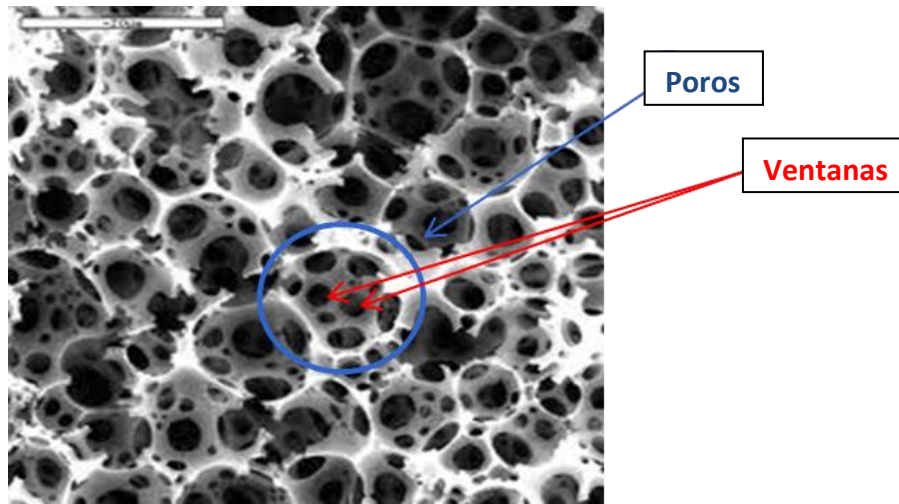
Figura 1.13. Esquema de la preparación de espumas sólidas a partir de emulsiones altamente concentradas (Roig, 2016).

En primer lugar, el monómero o el polímero pre-formado se disuelve en la fase continua y se va incorporando al sistema la fase dispersa bajo agitación. Una vez formada la emulsión altamente concentrada se procede a polimerizar el monómero o entrecruzar el polímero pre-formado que se encuentra en la fase continua. Finalmente, se extrae la fase dispersa de la emulsión y el material se seca obteniendo así una espuma sólida orgánica. Durante este proceso se producen pequeñas roturas en las paredes adyacentes que separan las gotas de la fase dispersa, creando una estructura bicontinua consistente en una porosidad interconectada dentro de un esqueleto de polímero que se encuentra en la fase continua (Silverstein, 2014).

Los materiales, que se obtienen después de la extracción de la fase dispersa (las gotas de la emulsión original) poseen una morfología compleja. Suelen tener un tamaño de



poro superior a 1 micra de diámetro y se encuentran interconectados por las denominadas ventanas (poros interconectados). En la Figura 1.14 se muestra una imagen de microscopía electrónica (SEM) en la que se puede observar la estructura característica de las espumas sólidas.



*Figura 1.14. Imagen de microscopía electrónica (SEM) de un material poroso de poliestireno obtenido a partir de una emulsión altamente concentrada (Barbetta, 2004).*

Las espumas sólidas se caracterizan por tener una densidad muy baja, normalmente inferior a  $0,1 \text{ g/cm}^3$  (Cameron, 1997), e incluso pueden llegar a densidades inferiores a  $0,01 \text{ g/cm}^3$  debido a una elevada interconectividad de poros (Richez, 2005). Generalmente, el tamaño de poro se encuentra entre  $5 \mu\text{m}$  y  $100 \mu\text{m}$ , mientras que el volumen total suele ser superior a  $10 \text{ cm}^3/\text{g}$ . Aunque la morfología de estos materiales presenta una elevada porosidad e interconectividad, el tamaño relativamente grande de los poros se traduce en una superficie específica no demasiado elevada, con valores comprendidos entre  $3\text{-}20 \text{ m}^2/\text{g}$  (Hainey, 1991), aunque también hay materiales con unos valores de superficie específica superiores a  $700 \text{ m}^2/\text{g}$  (Cameron, 2005).

Debido a las características únicas que presentan las espumas sólidas junto con su naturaleza altamente interconectada, hacen que estos materiales tengan un gran número de aplicaciones en el campo de la ciencia de materiales. Su gran

interconectividad permite una fácil difusión de fluido a través de su interior y al tratarse de materiales que presentan una elevada superficie específica también puedan utilizarse como medios de separación. En función de la afinidad de las moléculas con las paredes de la espuma sólida (funcionalizadas o no), éstas pueden quedar retenidas en su interior. La estructura porosa que presentan las espumas sólidas obtenidas a partir de emulsiones altamente concentradas es similar a la estructura interna del tejido óseo y se ha estudiado su uso en aplicaciones biológicas y biomédicas. Para ello deben estar constituidas por polímeros biocompatibles y biodegradables. Estos materiales se han utilizado en ingeniería de tejidos como injertos óseos (Moglia, 2011), y también como sustrato para la diferenciación y crecimiento celular: espumas sólidas constituidas de poliésteres tales como la poli ( $\epsilon$ -caprolactona) han demostrado su eficacia como sustrato para el crecimiento de fibroblastos (Busby, 2001). Otra utilidad de las espumas sólidas en aplicaciones biomédicas es como sistemas de liberación de fármacos, habiéndose investigado para la administración de fármacos de bajo peso molecular, lográndose una liberación sostenida (Canal, 2012).

### **1.3. Nano-emulsiones**

#### **1.3.1. Formación, estabilidad y propiedades de las nano-emulsiones**

Las nano-emulsiones son emulsiones con tamaño de gota en la escala nanométrica (normalmente entre 20 y 200 nm) (Solans, 2005). También se denominan miniemulsiones (El-Aasser, 2004), emulsiones ultrafinas (Nakajima, 1997) o emulsiones submicrométricas (Amselem, 1998). Debido a su tamaño característico, las nano-emulsiones tienen un aspecto transparente o translúcido a simple vista (Figura 1.15) y poseen estabilidad frente a la sedimentación o cremado. Estas propiedades hacen que las nano-emulsiones presenten un gran interés para investigaciones básicas y también para aplicaciones prácticas en el ámbito químico, farmacéutico, cosmético, etc. La investigación sobre nano-emulsiones de aceite en agua (O/W) se inició hace algunos años (Amselem, 1998; Solans, 2002; Antonietti, 2002; Asua, 2002; El-Aasser, 2004;

Tadros, 2004), especialmente como nanoreactores para la polimerización (El-Aasser, 1997; Antonietti, 2002; Asua, 2002). Las nano emulsiones de agua en aceite (W/O) se describieron por primera vez más recientemente (Landfester, 2000; Usón, 2004) y no han sido estudiadas en profundidad hasta el momento actual. Ambos tipos de nano-emulsiones han experimentado un notable desarrollo tal como se refleja en numerosas publicaciones y patentes.



*Figura 1.15. Aspecto de una nano-emulsión (izquierda) y una macro-emulsión (derecha), con diámetros de gota de 35 nm y 1  $\mu$ m, respectivamente (Solans, 2005).*

Las nano-emulsiones son estables a la sedimentación y al cremado, debido a que por su pequeño tamaño de gota el movimiento browniano supera a la fuerza de gravedad a la que están sometidas las gotas. Sin embargo, son sistemas termodinámicamente inestables y sufren desestabilización por floculación, coalescencia y/o maduración de Ostwald, siendo este último el principal proceso de inestabilidad de nano-emulsiones (Tadros, 2004). Como se ha indicado anteriormente, la maduración de Ostwald consiste en la difusión de las moléculas de la fase dispersa desde las gotas pequeñas a

las gotas grandes, a través de la fase continua, como consecuencia de su diferente presión Laplace. Sin embargo, con la selección apropiada de los componentes del sistema, la composición y el método de preparación, se pueden obtener nano-emulsiones con elevada estabilidad cinética (Solans, 2005). Las nano-emulsiones presentan algunas ventajas con respecto a las microemulsiones (que son sistemas termodinámicamente estables), ya que la concentración de tensioactivo necesario para la formación de nano-emulsiones es inferior (Solans, 2002).

Las nano-emulsiones, por ser sistemas termodinámicamente inestables, requieren un aporte de energía para su formación. Esta energía puede ser externa (métodos de formación por dispersión o de alta energía) o interna (métodos de formación por condensación o de baja energía). La preparación de nano-emulsiones por métodos de alta energía es bastante sencilla y como mayor es el aporte de energía, menor es el tamaño de gota obtenido. Sin embargo, para generar gotas de tamaño nanométrico se requiere la aplicación de una energía muy alta que sólo puede conseguirse mediante equipos específicos tales como sistemas de rotor-estator, homogeneizadores de alta presión o generadores de ultrasonidos. Recientemente se han desarrollado métodos de alta energía, basados en membranas o en microfluídica, que permiten obtener tamaños de gota monodispersos y con un consumo de energía menor (Joscelyne, 2000; Koroleva, 2012). Con los métodos de baja energía, se utiliza la energía intrínseca de los componentes de la emulsión que se libera durante el proceso de emulsificación (Solans, 2012). Estos métodos de baja energía tienen un gran interés en investigación y también industrial, ya que generalmente permiten lograr tamaños de gota más pequeños y homogéneos que los que se consiguen con métodos de alta energía y no se requieren equipos complejos. Además, los métodos de baja energía son más adecuados para fármacos y macromoléculas lábiles, tales como proteínas y ácidos nucleicos, ya que se pueden preparar emulsiones en condiciones suaves de temperatura.

Entre los métodos de emulsificación de baja energía (Solans, 2012), cabe destacar los denominados métodos de "inversión de fase" en los que se produce una inversión espontánea de la curvatura de la película de tensioactivo, pasando de curvatura

negativa a positiva o viceversa (para obtener emulsiones O/W o W/O, respectivamente). La inversión de fases puede ser activada por la temperatura, en el método de la temperatura de inversión de fase (PIT, Phase Inversion Temperature) (Shinoda, 1968), o por un cambio en la composición a temperatura constante, en el método de la inversión de fases por la composición (PIC, Phase Inversion Composition) (Forgiarini, 2001). Otros métodos de baja energía son los denominados métodos de “auto-emulsificación” o “emulsificación espontánea”, en los que la emulsificación se produce sin la inversión de fases y a temperatura constante (Miller, 1988). En dichos método tiene lugar una rápida difusión de tensioactivo y/o moléculas de disolvente de la fase dispersa a la fase continua.

El conocimiento del comportamiento físico de los sistemas tensioactivos es muy importante en los métodos de baja energía, ya que las fases que intervienen en el proceso de emulsificación desempeñan un papel clave para obtener nano-emulsiones con tamaño de gota mínimo y baja polidispersidad. En los métodos de inversión de fase, las transiciones a través de estructuras que tienen una película de tensioactivo con una curvatura cero (por ejemplo microemulsiones bicontinuas o fases cristalinas líquidas laminares) son los que determinan la formación de las nano-emulsiones (Morales, 2003; Izquierdo, 2004; Sadurní, 2005). Sin embargo, hay que señalar que la cinética del proceso de emulsificación pueden jugar también un papel en las propiedades de las nano-emulsiones resultantes especialmente cuando fases cristalinas líquidas hexagonales o cúbicas (de alta viscosidad) están presentes en algún paso del proceso de emulsificación (Solans, 2012).

### **1.3.2. Aplicaciones farmacéuticas de las nano-emulsiones**

Las nano-emulsiones presentan unas propiedades de gran interés para su aplicación en la industria farmacéutica, tales como el pequeño tamaño de gota, la transparencia óptica, la posibilidad de formarse con bajas concentraciones de tensioactivo en comparación con las microemulsiones, su estabilidad cinética y la posibilidad de controlar el tamaño de gota. Se han investigado como sistemas de liberación controlada de fármacos por distintas vías de administración: parenteral, oral, nasal,

oftálmica, cutánea y transdérmica (García-Celma, 2016). También se han utilizado como nuevos sistemas de liberación de fármacos para principios activos de origen biológico (Huang, 2009; Sikora, 2015) y materiales genéticos (Liu and Yu, 2010). El pequeño tamaño de las gotas de las nano-emulsiones puede favorecer una mejor absorción del fármaco y la vectorización. En comparación a las emulsiones convencionales pueden aumentar la biodisponibilidad de algunos fármacos, disminuyendo las dosis administradas y reduciendo de este modo los efectos adversos. Las ventajas de las nano-emulsiones incluyen una mayor solubilización del principio activo, baja toxicidad, mejor actividad farmacológica (por incremento de la absorción), mayor estabilidad y protección de la degradación física y química (DeCampos, 2012; Sutradhar, 2013). Actualmente se están llevando a cabo numerosos estudios y ensayos clínicos con nano-emulsiones (Jain, 2011).

En los últimos años se han desarrollado nano-emulsiones como plantillas para la preparación de nanopartículas para la administración de fármacos, especialmente nanopartículas de naturaleza polimérica (Antonietti, 2002; Morral-Ruíz, 2013) y lipídica (Anton, 2008). Ejemplos destacables de preparación de nanopartículas a partir de nano-emulsiones son las nanopartículas de un polímero preformado como el PLGA con el fármaco loperamida, adecuadas para ser administradas por vía intravenosa y capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Fornaguera, 2015). También se han obtenido nanopartículas de etilcelulosa a partir de nano-emulsiones para la vehiculación de dexametasona (Calderó 2016). Se prepararon nanopartículas de poliuretano y poliurea, convenientemente funcionalizadas con polietilenglicol o lisina a partir de nano-emulsiones O/W mediante un proceso de policondensación interfacial (Morral-Ruíz, 2012). En la Figura 1.16 se puede observar el proceso de formación de las nanopartículas de poliuretano y poliurea mediante polimerización interfacial de monómeros de diisocianato a partir de las nano-emulsiones. Dichas partículas permitieron la vectorización de fármacos antineoplásicos y plásmidos (Morral-Ruíz, 2013 y 2015).

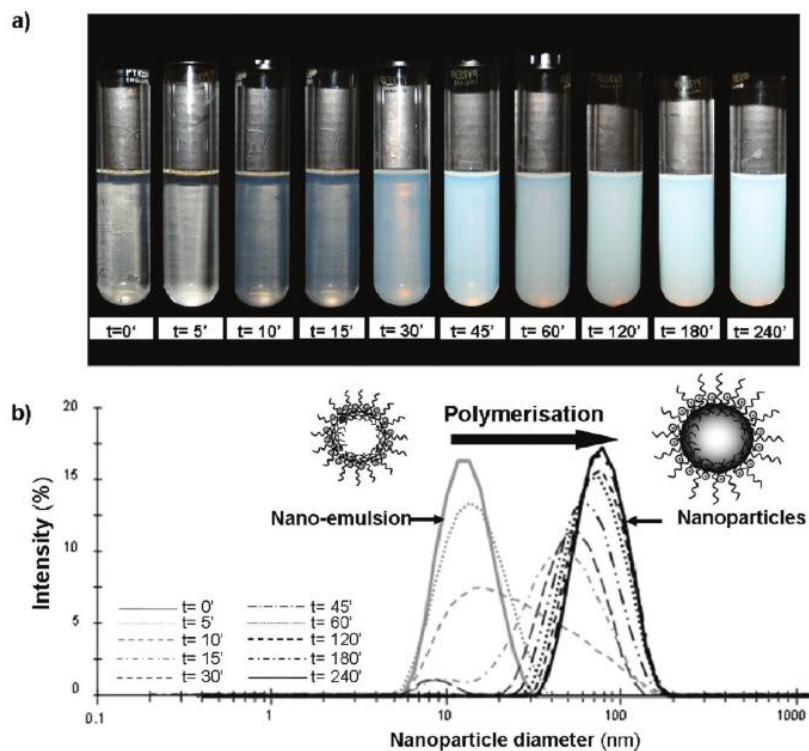


Figura 1.16. Aspecto visual (a) y distribución de tamaño de partícula en función del tiempo de una muestra del sistema agua/PEG 400/ polisorbato 80/ triglicérido de cadena media/diisocianato a 70°C durante 4 horas (Morrall-Ruíz, 2012).

También cabe destacar la preparación de nanocápsulas como nanotransportadores de un fotosensibilizador utilizado en terapia fotodinámica (Bazylińska, 2012). Estas nanocápsulas se prepararon por el método de adsorción LbL (layer-by-layer) de polielectrolitos de cargas opuestas usando como plantilla una nano-emulsión.

La formación de matrices poliméricas con componentes biocompatibles basadas en nano-emulsiones para la administración de fármacos y biomoléculas por vía tópica y sistémica ofrece grandes posibilidades para la industria farmacéutica. Las nanopartículas obtenidas a partir de nano-emulsiones permiten controlar el tamaño y la polidispersidad y se pueden considerar biomateriales adecuados para terapia y diagnóstico en medios biológicos complejos.





# **OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**



## 2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El alginato es un polímero aniónico ampliamente utilizado en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, tal como se ha descrito en la introducción de la Tesis Doctoral. En los últimos años se han investigado nuevas aplicaciones del alginato para la encapsulación de fármacos y moléculas bioactivas y para su liberación controlada, así como para el desarrollo de nuevas estructuras en ingeniería de tejidos basadas en este polímero. El creciente interés del alginato para aplicaciones farmacéuticas y biomédicas es consecuencia de sus propiedades características como la ausencia de toxicidad, biodegradabilidad, precio asequible y fácil disponibilidad, biocompatibilidad, propiedades mucoadhesivas, ausencia de inmunogenicidad y facilidad de gelificar en presencia de cationes (Paques, 2014). Entre las aplicaciones más destacadas en los últimos años destacan los estudios de formación de micro y nanopartículas de alginato sólo o en combinación con otros polímeros como el quitosano. La mayoría de las partículas de alginato descritas en la bibliografía han sido preparadas por métodos de complejación con policationes o por formación de emulsiones de fase externa oleosa con la gelificación de las gotas de alginato de la emulsión. Las ventajas de la preparación de nanopartículas de alginato son la posibilidad de formación en condiciones suaves y la utilización de medio acuoso, debido a la solubilidad del alginato en agua, en contraposición con otros polímeros biocompatibles ampliamente utilizados como el PLGA, que requieren la presencia de solventes orgánicos y su posterior eliminación para la formación de nanopartículas. Estas ventajas del alginato lo constituyen un polímero idóneo para la encapsulación de material sensible (fármacos, proteínas, células, etc.) y para su utilización en farmacia, biomedicina y también en alimentación. Sin embargo, algunos objetivos de la preparación de nanopartículas por métodos sostenibles que todavía no se han alcanzado son el control exhaustivo del tamaño de partícula, la estabilidad mecánica y química, la posibilidad de escalado industrial y la citotoxicidad de las partículas obtenidas en relación a sus posibles aplicaciones.

Los objetivos de esta Tesis Doctoral se han planteado con la finalidad de desarrollar nuevas formas de dosificación de fármacos basadas en alginato. Teniendo en cuenta las propiedades del alginato y los estudios publicados sobre gelificación y formación de nanopartículas, se ha pretendido utilizar sistemas tensioactivos nanoestructurados, tales como las emulsiones altamente concentradas (HIPRE) y las nano-emulsiones, como plantilla para la obtención de materiales porosos y nanopartículas de alginato, que permitan la incorporación y la liberación controlada de fármacos y que también puedan ser de utilidad en ingeniería biomédica. La utilización de las emulsiones como plantilla permitiría un mejor control del tamaño de partícula de los materiales formados. La correcta selección de los aceites y tensioactivos y la emulsificación por métodos de baja energía permitiría la obtención de materiales biocompatibles por métodos escalables industrialmente y sostenibles.

El **objetivo general** de la Tesis Doctoral es la formación y caracterización de nanosistemas terapéuticos que contienen alginato, con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos.

Este objetivo general se concreta en los siguientes **objetivos específicos**:

- Formación y caracterización de emulsiones altamente concentradas que contengan alginato cálcico y otros componentes biocompatibles.
- Formación y caracterización de nano-emulsiones que contengan alginato cálcico y otros componentes biocompatibles.
- Formación y caracterización de materiales porosos y nanopartículas, utilizando como plantilla emulsiones altamente concentradas y nano-emulsiones.
- Estudio de la incorporación y liberación de fármacos en los sistemas desarrollados.

El **plan de trabajo** que se ha desarrollado para alcanzar los objetivos planteados ha sido el siguiente:

- Búsqueda bibliográfica sobre sistemas tensioactivos nanoestructurados y propiedades y aplicaciones biomédicas del alginato.

- Selección de los sistemas tensioactivos nanoestructurados más adecuados para ser utilizados como plantilla para la obtención de nanosistemas de liberación de fármacos que contengan alginato.
- Selección de los componentes de las formulaciones de emulsiones altamente concentradas y nano-emulsiones, teniendo en cuenta su biocompatibilidad y las posibles vías de administración. Selección de principios activos modelo, según sus propiedades físico-químicas.
- Selección del método y la concentración de alginato sódico y cloruro cálcico más adecuados para lograr la reticulación iónica del alginato y posibilitar su posterior incorporación a emulsiones altamente concentradas y nano-emulsiones.
- Selección de sistemas tensioactivos que permitan la formación de emulsiones altamente concentradas y estudio de la incorporación de alginato. Caracterización de las emulsiones altamente concentradas por técnicas de microscopía óptica y electrónica. Estudio de propiedades reológicas y estabilidad de las emulsiones altamente concentradas.
- Selección de sistemas tensioactivos que permitan la formación de nano-emulsiones y estudio de la incorporación de alginato. Caracterización de los sistemas por técnicas de difusión dinámica de la luz láser (DLS) y microscopía electrónica y estudio de estabilidad.
- Formación de materiales porosos y nanopartículas a partir de emulsiones altamente concentradas y nano-emulsiones. Caracterización de los materiales obtenidos por microscopía óptica y electrónica, DLS, porosimetría, etc.
- Incorporación de fármacos modelo de lipofilia e hidrofilia (ketoprofeno y clorhidrato de clindamicina) a las formulaciones seleccionadas. Puesta a punto de métodos de determinación cuantitativa de los principios activos. Estudios de cinéticas liberación de los mismos a soluciones receptoras.
- Interpretación de los resultados obtenidos y elaboración de conclusiones.



# **PARTE EXPERIMENTAL**





## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiales

#### 3.1.1. Principios activos:

Se seleccionaron los principios activos ketoprofeno y clorhidrato de clindamicina para ser incorporados a emulsiones basadas en alginato. Las propiedades características de dichos principios activos se describen brevemente a continuación.

#### Ketoprofeno

(FAGRON) (CAS 22071-15-4)

El ketoprofeno [ácido (R, S) 2-(3- benzoilfenil) propiónico] (Figura 3.1.) es un principio activo que pertenece al grupo de los anti-inflamatorios no esteroidales (NSAIDs), ampliamente utilizado para el tratamiento de la inflamación, del dolor y reumatismo. Su peso molecular es  $254 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y se presenta como un polvo cristalino blanco o casi blanco, prácticamente insoluble en agua y fácilmente soluble en alcohol, acetona y diclorometano. Actúa inhibiendo la producción corporal de prostaglandina con la inhibición reversible del enzima COX-2, responsable de esta síntesis a partir del ácido araquidónico (Kantor, 1986).

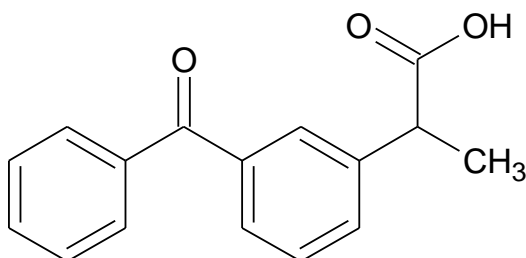


Figura 3.1. Estructura química de ketoprofeno.

El ketoprofeno, como muchos NSAIDs, produce efectos adversos como úlceras gastrointestinales, disminución del recuento de glóbulos rojos (resultado de hemorragia gastrointestinal) y, con menor frecuencia, dolor renal, pérdida de proteínas y trastornos hemorrágicos (Sweetman, 2011). Dichos efectos secundarios podrían minimizarse transformando las formas convencionales de dosificación en sistemas de liberación de fármacos capaces de mejorar la biodisponibilidad. La corta semivida biológica ( $t_{1/2} = 2,1$  h) y la alta frecuencia de dosificación (2-4 veces diarias) incrementan los riesgos por el uso prolongado en los tratamientos de enfermedades osteoarticulares (Arvidson, 1994). Por esta razón el ketoprofeno es un principio activo adecuado para desarrollar medicamentos de liberación controlada, capaces de ir liberando el fármaco de manera sostenida, disminuyendo la incidencia de determinados efectos adversos (Del Gaudio, 2009). El diseño de formas farmacéuticas que liberan el principio activo de manera sostenida o retardada ha demostrado una reducción de efectos secundarios de los NSAIDs con la consecuente mejora en el bienestar y la calidad de vida de los pacientes (Del Gaudio, 2009).

Entre los estudios realizados con formas de liberación controlada de ketoprofeno en los últimos años, cabe destacar las que se detallan a continuación. Podlogar y colaboradores estudiaron en 2005 la liberación de ketoprofeno como fármaco modelo desde microemulsiones en formulaciones en las cuales el porcentaje de tensioactivo y co-tensioactivo superaban el 80% y se llegó a demostrar que existía una fuerte interacción entre el fármaco y los componentes de la microemulsión (Podlogar, 2005). Otros estudios lograron establecer la mejora de la permeación del ketoprofeno en nano-emulsiones de ésteres de aceite de palma en presencia de 3% de limoneno a través de piel de rata sin mayores problemas de irritación cutánea (Sakeena, 2010). Se ha descrito la formación de perlas de alginato cargadas con ketoprofeno obtenido por boquilla vibratoria inyectando una suspensión de ketoprofeno-alginato a través de una boquilla de 400 micras de diámetro (Auriemma, 2011). Algunos autores han utilizado el catión  $Zn^{2+}$  como reticulante junto con el alginato en formulaciones con ketoprofeno en lugar del  $Ca^{2+}$  observándose una posible potenciación de las propiedades antiinflamatorias del fármaco en animales de experimentación atribuida a la presencia de antioxidantes en la formulación (Gawel, 2013; Abbas, 2014).

Las formas de dosificación de ketoprofeno comercializadas en España son cápsulas orales (50 mg/cápsula) y geles tópicos (2,5%), inyectables (50 mg/ml) y comprimidos de liberación modificada (200 mg/comprimido) ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es) Web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios).

En esta tesis doctoral se ha seleccionado ketoprofeno, como principio activo, por sus propiedades físico-químicas (peso molecular y solubilidad) y por sus posibilidades para desarrollar formas farmacéuticas de liberación controlada basadas en alginato para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares.

### **Clorhidrato de clindamicina**

(FAGRON) (CAS 21462-39-5)

La clindamicina (Figura 3.2.) es un antibiótico del grupo de las lincosaminas, de espectro bacteriano medio. Su mecanismo de acción se basa en que se une a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis proteica. Es un derivado semi-sintético de la lincomicina, de la que difiere estructuralmente por la sustitución de un átomo de cloro por un grupo hidroxilo y la inversión del carbono en la posición 7 involucrado (Sarfaraz, 2004). Posee actividad bacteriostática frente a microorganismos gram positivos aerobios y anaerobios y a elevadas concentraciones también tiene acción bactericida. La clindamicina es activa contra la mayoría de cocos gram positivos aeróbicos, incluidos estafilococos, estreptococos pneumoniae y también es eficaz contra microorganismos gram positivos y negativos aerobios como: actinomicas, Bacteroides fragilis, Clostridium perfringens, fusobacterium y algunas cepas de Haemophilus influenzae y Neisseria gonorrhoeae. Se utiliza para el tratamiento de infecciones de la piel y tejidos blandos así como en infecciones de pie diabético. Es más eficaz que lincomicina, se absorbe mejor (Cooperación Técnica Belga, 2008) y tiene un espectro antibacteriano similar ([www.med.javeriana.edu.co](http://www.med.javeriana.edu.co)). La clindamicina está considerado dentro de los medicamentos esenciales a nivel mundial según la lista de medicinas esenciales de abril del 2015 de la OMS es decir un medicamento dentro del cuidado básico de la salud (WHO, 2015).

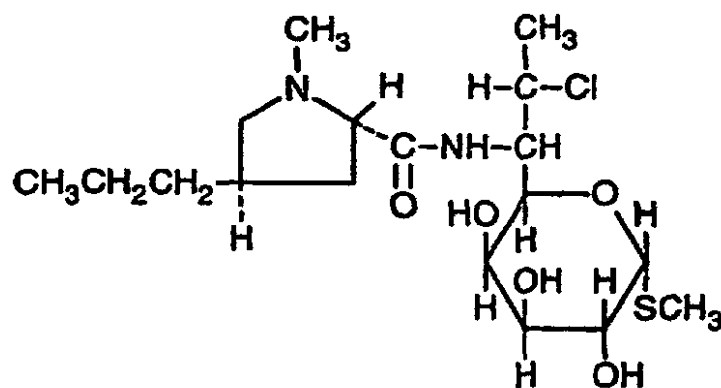


Figura 3.2. Estructura de clindamicina.

En preparaciones farmacéuticas se suele utilizar el fosfato y el clorhidrato de clindamicina. El clorhidrato de clindamicina,  $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S \cdot HCl$ , es un polvo cristalino blanco o casi blanco, con un peso molecular de  $461.44 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , muy soluble en agua, soluble en metanol y ligeramente soluble en etanol (Sweetman, 2011). Posee un pKa de 7,6 y presenta un máximo de absorción de la radiación ultravioleta de 210 nm (Harvey, 1980). Cuando se administra por vía oral, el 90% de la dosis se absorbe en el tubo digestivo, alcanzándose concentraciones de 2-3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el plazo de 1 hora después de la administración de una dosis de 150 mg. Se une a proteínas plasmáticas y se distribuye ampliamente en fluidos y tejidos corporales. En forma tópica se usa para tratar el acné vulgar. En España el clorhidrato de clindamicina está comercializado en forma de inyectable (150 mg/ml), cápsulas orales (150-300 mg/cápsula), óvulos vaginales (100 mg/óvulo) y soluciones, cremas y geles tópicos (1-2%) ([www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es) Web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios)

En esta tesis doctoral se ha seleccionado clorhidrato de clindamicina, como principio activo, por sus propiedades físico-químicas (peso molecular y solubilidad) y por sus posibilidades para desarrollar formas farmacéuticas de liberación controlada basadas en alginato para el tratamiento de infecciones tópicas y sistémicas.

### **3.1.2. Excipientes:**

Para preparar soluciones coloidales, hidrogeles, emulsiones altamente concentradas, nano-emulsiones, materiales porosos y nanopartículas, se utilizaron excipientes diversos (polímeros, tensioactivos, componentes oleosos, componentes acuosos, etc.), cuyas características técnicas se especifican a continuación.

#### **3.1.2.1. Biopolímero y agentes de reticulación y estabilización**

##### **Alginato de sodio**

(Sigma Aldrich) (CAS 9005-38-3)

Sal sódica de ácido algínico de viscosidad media (peso molecular: 80.000 – 120.000 g/mol, viscosidad  $\geq$  2000 cP), procedente de algas pardas. Contiene aproximadamente un 61% de ácido manurónico y un 39% de ácido gulurónico.

##### **Cloruro de calcio**

(Sigma Aldrich) (CAS 10043-52-4)

La solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 1M se utilizó como agente reticulante del alginato sódico.

##### **Hidrobromuro de poli-L-lisina**

(Sigma Aldrich) (CAS 25988-63-0)

Se utilizó como sustancia policatiónica para estabilizar partículas de alginato, según el método propuesto por Rajaonarivony (Rajaonarivony, 1993).

### 3.1.2.2. Tensioactivos

#### **Cremophor EL**

(BASF) (CAS 61791-12-6)

Tensioactivo no iónico, producto de la reacción entre un mol de aceite de ricino y 35 moles de óxido de etileno. INCI name (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos): PEG-35 Castor Oil.

Es un líquido oleoso, de color amarillo claro, transparente a temperaturas superiores a 26°C y con un olor característico (Rowe, 2012). Es soluble en agua y en etanol, dando lugar a soluciones transparentes. Su solubilidad en agua disminuye con la temperatura, dando lugar a soluciones acuosas turbias. También es soluble en solventes orgánicos como cloroformo y acetato de etilo. Presenta un HLB comprendido entre 12 y 14 y una concentración micelar crítica aproximadamente del 0,02%. Se utiliza frecuentemente en la industria farmacéutica en formulaciones orales, tópicas y parenterales, como emulgente y solubilizante. Se considera no tóxico ni irritante, pero a concentraciones elevadas puede dar lugar a reacciones de hipersensibilidad (BASF, 2006).

#### **Cremophor RH455**

(BASF) (CAS 61788-85-0, 57-55-6)

Tensioactivo no iónico con la siguiente composición: 90% de Cremophor RH40 (producto de la reacción entre un mol de glicérido y 40-45 moles de óxido de etileno), 5% de 1,2-propilenglicol y 5% de agua. INCI name (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos): PEG-40 Hydrogenated Castor Oil (and) Propylene Glycol.

Es un líquido viscoso y ligeramente turbio. En solución acuosa presenta un débil olor característico de estos productos. Se disuelve en agua, etanol, isopropanol y n-propanol. Su número HLB es 14 y se utiliza para la solubilización de aceites esenciales y sustancias con olor en soluciones hidroalcohólicas y acuosas y también como emulsionante. Es estable en soluciones hidroalcohólicas. También es estable en

soluciones acuosas. La presencia de ácidos o bases fuertes puede dar lugar a la saponificación de los ésteres (BASF, 2006).

### **Cremophor WO7**

(BASF) (CAS 61788-85-0)

Es un tensioactivo iónico resultante de la reacción entre el aceite de ricino hidrogenado y el óxido de etileno (7 moles). INCI name (Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos): PEG-7 Hydrogenated Castor Oil.

Es un líquido viscoso, turbio y ligeramente amarillento. Es insoluble en agua y dispersable en aceite de parafina. Su número HLB es  $5\pm 1$  y tiene una tensión superficial de 34,2mN/m. Se utiliza para preparar emulsiones W/O para aplicación por vía tópica, como disolvente de principios activos lipófilos y como humectante. No es irritante de piel y mucosas. Se aconseja conservarlo protegido de la luz (BASF, 2006).

### **3.1.2.3. Componentes oleosos**

#### **Parafina líquida**

(FAGRON) (CAS 8042-47-5)

La parafina líquida es una mezcla purificada de hidrocarburos saturados líquidos obtenidos a partir del petróleo.

Es un líquido oleoso, incoloro y límpido. Es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en etanol y miscible en hidrocarburos. Tiene una densidad de 0.83-0.89 g·mL<sup>-1</sup> a 20°C y una viscosidad de 0.11-0.23 Pa·s a 20°C. Es necesario conservarla en envases cerrados y protegidos de la luz.

Por vía tópica presenta propiedades emolientes. Se utiliza en la formulación de pomadas y emulsiones. Por vía oral se utiliza como laxante, evitando la deshidratación y lubricando la mucosa intestinal. También se utiliza para mantener en suspensión

principios activos insolubles en agua. La parafina líquida esterilizada se utiliza como material de cura aséptica y como lubricante de catéteres e instrumentos quirúrgicos (Rowe, 2012).

## **Miglyol 812**

(FAGRON) (CAS 73398-61-5)

Miglyol 812 es una mezcla de triglicéridos de cadena media obtenido de la extracción del endosperma de la planta *Cocos nucifera L.* o del endosperma de la planta *Elaeis guineensis Jacq.* Como mínimo el 95% de los ácidos grasos que constituyen los triglicéridos son saturados, principalmente el ácido caprílico y el ácido cáprico (Figura 3.3).

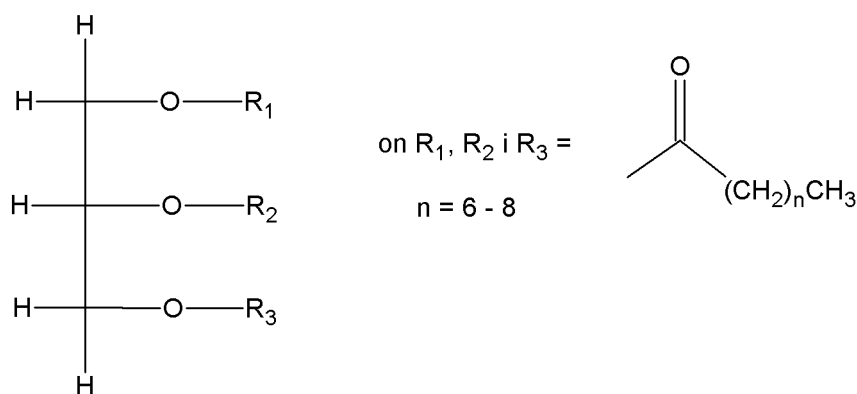


Figura 3.3. Estructura química del Miglyol 812.

Es un líquido oleoso transparente, inodoro e insípido, con una densidad de 0,94-0,95 g·mL<sup>-1</sup> a 20°C y una viscosidad de 0,027-0,033 Pa·s a 20°C. Es soluble a 20°C en los siguientes disolventes orgánicos: hexano, tolueno, éter dietílico, acetato de etilo, acetona, isopropanol y etanol 96%. Es miscible en todas las proporciones en hidrocarburos de parafina y en aceites naturales. Para evitar su oxidación se recomienda conservarlo en recipientes herméticamente cerrados a temperatura inferior a 25°C y protegido de la luz.

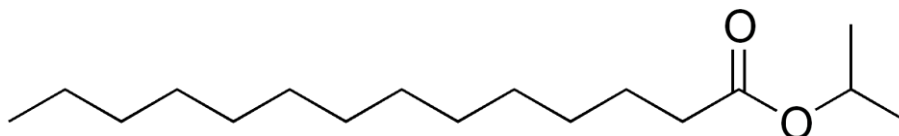


Los triglicéridos de cadena media se utilizan en una gran variedad de formulaciones farmacéuticas. Se utilizan para preparar emulsiones, microemulsiones, soluciones o suspensiones orales de principios activos que son inestables o insolubles en medio acuoso. En formulaciones parenterales, los triglicéridos de cadena media se utilizan en la preparación de emulsiones, soluciones o suspensiones para administración intravenosa. En formulaciones rectales, se utilizan en la preparación de supositorios que contienen materias lábiles. En cosmética y en preparados farmacéuticos de administración por vía tópica, se utilizan en ungüentos, cremas y emulsiones líquidas. Terapéuticamente se utilizan como agentes nutricionales. Los triglicéridos de cadena media no son irritantes ni tóxicos por vía tópica ni por vía ocular (Rowe, 2012).

### **Miristato de isopropilo**

(SIGMA-ALDRICH) (CAS 110-27-0)

Es el éster del ácido mirístico y el alcohol isopropílico. Su estructura química se muestra en la figura 3.4.



*Figura 3.4. Estructura química del miristato de isopropilo*

Es un líquido oleoso e incoloro, que tiene una densidad entre 0,850 y 0,855 g.mL<sup>-1</sup> y una viscosidad entre 5-6 cP. Es insoluble en agua, glicerina y propilenglicol y miscible en hidrocarburos y aceites. Se utiliza como componente oleoso en preparaciones tópicas farmacéuticas porque es muy buen solvente de principios activos sólidos lipófilos. Su grado de irritación después de su aplicación tópica es muy bajo y posee mejor tolerancia que el aceite de oliva o de sésamo; sin embargo, a elevadas concentraciones puede ser comedogénico (Fulton, 1989).

### **3.1.2.4. Componentes acuosos**

#### **Agua desionizada**

(MILLIPORE) (CAS 7732-18-5)

Se ha obtenido con un sistema Milli-Q<sup>®</sup>. Se trata de un proceso de purificación con etapas sucesivas de filtración y desionización para conseguir una pureza caracterizada por una resistividad de 18.2 MΩ·cm a 25°C.

### **3.1.3. Reactivos analíticos:**

#### **Dihidrogeno fosfato de potasio**

(FAGRON) (CAS 7778-77-0)

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ , utilizado para preparar la solución reguladora de fosfatos (PBS) a pH 7,4.

#### **Hidrogeno fosfato de disodio**

(PROBUS S.A.) (CAS 7558-79-4)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , utilizado para preparar la solución reguladora de fosfatos (PBS) a pH 7,4.

#### **Cloruro de sodio**

(ACOFARMA<sup>®</sup>) (CAS 7647-14-5)

$\text{NaCl}$ , utilizado para preparar la solución reguladora de fosfatos (PBS) a pH 7,4.

#### **Ácido fosfórico**

(ACOFARMA<sup>®</sup>) (CAS 7664-38-2)

$\text{H}_3\text{PO}_4$ , utilizado para ajustar el pH de la solución reguladora de fosfatos.

## **Hidróxido potásico**

(ACOFARMA<sup>®</sup>) (CAS 1310-58-3)

KOH, Solución 8N utilizada como regulador de pH.

## **Acetonitrilo**

(CARLO EBRA REAGENTS) (CAS 75-05-8)

Disolvente orgánico de polaridad media. Miscible en agua. Se ha utilizado acetonitrilo de calidad cromatográfica, con una pureza del 99%.

## **Etanol**

(PANREAC) (CAS 64-17-5)

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Disolvente miscible en agua. Se ha utilizado etanol con una pureza superior al 95%.

## **n-Butanol**

(PANREAC) (CAS 71-36-3)

C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>O. Disolvente muy soluble en acetona y miscible en etanol y éter etílico.

### **3.1.4. Otros materiales:**

- Tubos de vidrio de borosilicato con tapón rosca de 10x2 cm
- Pipetas Pasteur de vidrio y polietileno
- Membrana hidrófila de acetato de celulosa Cellu Sep T3 (Orange Scientific) , MWCO (Molecular Weight Cut Off): 12 000-14 000 Da

## **3.2. Equipos e instrumentos**

### **3.2.1. Espectrofotómetro UV/visible**

Se ha utilizado un espectrofotómetro UV/visible, modelo Helios  $\beta$  v 4.60, para la cuantificación de los principios activos en los ensayos de liberación.

### **3.2.2. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC)**

El sistema cromatográfico utilizado ha sido un equipo HPLC, de Shimadzu, completamente automático, equipado con una columna de fase reversa Waters® Spherisorb 5 $\mu$ m ODS2 de 4,6x150 mm, con detector UV/vis. Los datos se han analizado y procesado mediante el software LC Solution.

### **3.2.3. Espectrómetros de correlación de fotones (DLS)**

Los estudios de dispersión dinámica de la luz (Dynamic Light Scattering, DLS) se han realizado con un equipo Zetasizer Nano ZS (Malvern), con un rango de medida de 0,5 nm hasta 10  $\mu$ m. Está equipado con una fuente de luz láser de He-Ne con una longitud de onda de 633 nm. La temperatura se ha regulado con un elemento Peltier con una precisión de  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ .

La caracterización de algunas nano-emulsiones se ha realizado con el equipo DLS Vasco2 (Cordouan). Se trata de un analizador de tamaño de partícula con un rango de 2 a 6000 nm. Permite el análisis de muestras con un volumen mínimo de 50  $\mu\text{L}$ , con una precisión de  $\pm 10\%$  según el fabricante.

### **3.2.4. Espectrómetro de difusión múltiple de luz (TurbiscanLab).**

Para estudiar de forma cuantitativa la estabilidad de las nano-emulsiones se ha utilizado un equipo TurbiscanLab (Formulaction) que mide la retrodifusión de la luz que atraviesa la muestra a distintas alturas en función del tiempo (light backscattering).

### **3.2.5. Microscopio óptico**

El microscopio óptico utilizado ha sido un microscopio invertido Leica DMIL LED, que dispone de diversos objetivos. Tiene acoplada una cámara digital que permite la captación de imágenes instantáneas.

### **3.2.6. Microscopios electrónicos**

Se han utilizado los siguientes microscopios electrónicos, disponibles en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiT-UB) y en la Plataforma NANBIOSIS (grupo QCI, CIBER-BBN, IQAC-CSIC):

(a) Microscopio *Field Emission Scanning* (FE-SEM), HITACHI S4100: Posee una alta resolución para análisis topográfico a escala nanométrica.

(b) Microscopio *Field Emission Scanning* (FE-SEM), JEOL JSM 7100F: Posee un voltaje de 15 kV, con espectrómetro de catodoluminiscencia GATAN MONO-CL4, detector EDS y detector electrones retrodispersados

(c) Microscopio electrónico de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) HITACHI TM-1000 Tabletop: Posee un voltaje de 15 kV y alcanza hasta 10.000 aumentos. Permite la observación de la morfología de muestras sólidas de un tamaño máximo de 7 cm de diámetro.

(d) Cryo-SEM Microscope, JEOL J-6510: Posee un detector de electrones retrodispersado y una unidad de congelación, GATAN ALTO-1000. Posee una

cámara digitalizadora de alta resolución y un mecanismo de inclinación de muestras (+60°/-60°) para reconstrucciones tridimensionales.

### **3.2.7. Reómetros**

Las determinaciones de viscosidad dinámica se han realizado con un reómetro de esfuerzo controlado, modelo AR-G2, de TA Instruments, disponible en la Plataforma NANBIOSIS (grupo QCI, CIBER-BBN), que permite realizar medidas de esfuerzo controlado y de cizalla controlada. Dicho reómetro es adecuado para muestras líquidas y semisólidas con un amplio rango de viscosidad.

Algunas determinaciones se han realizado con el reómetro Haake RheoStress, de Thermo Scientific, provisto de un rotor C60/2 Ti, un diámetro de cono de 60 mm y un ángulo de 2°.

### **3.2.8 Porosímetro**

Para determinar la porosidad y la densidad de superficie se ha utilizado un equipo Quantachrome Autosorb-IQ que utiliza nitrógeno.

### **3.2.9. Potenciómetro**

Para la determinación de pH se ha utilizado un potenciómetro Crison micro pH 2000.

### **3.2.10. Equipo de diálisis para estudios de liberación**

El equipo utilizado para estudiar la difusión de los principios activos desde la formulaciones hasta soluciones receptoras adecuadas ha consistido en tres vasos de vidrio de borosilicato Vidrafoc provistos de camisa calefactora, con una capacidad de

150 mL, y conectados en serie sobre una placa de agitación magnética Multipoint Magnetic Stirrer SDS de tres posiciones.

### **3.2.11. Homogeneizador de alta velocidad**

Para la preparación de las emulsiones altamente concentradas se ha utilizado un homogeneizador ULTRA-TURRAX® T10 de IKA, con un rango de velocidades de  $8 \cdot 10^3$  -  $24 \cdot 10^3$  rpm con una potencia de 350 w.

### **3.2.12. Centrífuga**

Se ha utilizado una centrífuga Centronic BL de alta frecuencia, hasta 13500 rpm, de Selecta.

### **3.2.13. Agitadores**

Se ha utilizado un agitador vibrador vórtex, Heidolph Reax 2000, con un rango de velocidades de 200 a 2400 rpm, que permite agitación en continuo.

También se han utilizado dos placas agitadoras extrafinas para múltiples muestras Multipoint Magnetic Stirrer SBS (ANM-10103).

### **3.2.14. Balanzas**

Se han utilizado las siguientes balanzas:

Balanza analítica Mettler-Toledo, modelo AB- 104, con una precisión de  $\pm 10^{-4}$  g y capacidad de 101 g.

Balanza semi-microanalítica Ohaus Discovery, con una precisión de  $\pm 10^{-5}$  g y una capacidad máxima de 200 g.

### **3.2.15. Baño termostático**

Cubeta de metacrilato de 15 L de capacidad con termostato de inmersión. La temperatura del baño se ha controlado con un termostato de inmersión Tectron Bio, con un rango de temperaturas entre 0°C y 100°C y un criostato Haake EK20.

### **3.2.16. Baño de ultrasonidos**

Baño de ultrasonidos Transonic Digital S, con una capacidad de 2,75 L y una frecuencia de ultrasonidos de 40 kHz. Consta de un sistema calefactor que permite calentar las muestras hasta 80°C.

### **3.2.17. Estufa de secado**

Estufa de secado de sobremesa, Selecta. Secado por circulación de aire. Temperaturas: 40-170°C.

### **3.2.18. Micropipetas**

Micropipetas Nichipet EX de volúmenes: 1-10 mL, 1000-5000 µL, 100-1000 µL.

Micropipetas Gilson de volúmenes 2-20 µL.



### **3.3. Métodos experimentales**

#### **3.3.1 Preparación y caracterización de dispersiones de alginato de sodio y cloruro de calcio.**

Se prepararon y caracterizaron varias mezclas de alginato de sodio y cloruro de calcio con la finalidad de seleccionar la concentración más adecuada para ser incorporada como fase acuosa a las emulsiones altamente concentradas o a las nano-emulsiones.

Para la preparación de las mezclas se siguió el siguiente procedimiento:

Se prepararon soluciones de alginato de sodio en agua, a distintas concentraciones.

Se prepararon soluciones de  $\text{CaCl}_2$ , a distintas concentraciones.

Se mezclaron volúmenes iguales de solución de alginato sódico y de  $\text{CaCl}_2$  para obtener 50 mL de mezcla, utilizando un homogeneizador Ultratúrrax a 8000 durante 30 segundos.

Se observó el aspecto macroscópico de las mezclas a 25°C y se determinó la viscosidad y el pH.

Para la caracterización de las diferentes mezclas de soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio se realizaron mediciones de viscosidad y pH.

Para realizar la determinación de la viscosidad se colocó alrededor de 1 gramo en el plato del reómetro Haake Rheo Stress y se inició el proceso de oscilación bajo las siguientes condiciones:

- Temperatura 25°C
- Tiempo de medición 300 s
- Flujo continuo en rampa

### **3.3.2. Preparación y caracterización de emulsiones altamente concentradas (HIPREs).**

#### **3.3.2.1. Preparación de emulsiones altamente concentradas.**

Para la preparación de HIPREs se ha utilizado el método de las adiciones sucesivas a 25°C. Este método consiste en la preparación de una mezcla binaria (tensioactivo y otro componente, que puede ser acuoso u oleoso) y adicionar el tercer componente (oleoso o acuoso) en pequeñas cantidades hasta la obtención de la emulsión. Después de cada adición del tercer componente, la mezcla se homogeniza con un agitador de tubos (tipo vórtex) a 2400 rpm. Para la preparación de las HIPREs W/O se añade componente acuoso a la mezcla binaria constituida por tensioactivo y componente oleoso mientras que para la preparación HIPREs O/W se añade componente oleoso a la mezcla binaria constituida por tensioactivo y componente acuoso. De cada tipo de emulsión (W/O y O/W) se prepararon cuatro tipos de formulaciones que difieren en la composición de la fase acuosa. Dicha fase acuosa puede estar constituida por:

- Agua,
- Solución de alginato de sodio,
- Solución de cloruro de calcio y
- Mezcla a partes iguales de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio.

A continuación se describe con más detalle la preparación de HIPREs W/O y de HIPREs O/W.

#### **Preparación de emulsiones altamente concentradas W/O**

La preparación de este tipo de emulsiones sigue el esquema general presentado en la figura 3.5.a. Este método de preparación se utiliza cuando la fase acuosa es agua, solución de alginato de sodio o solución de cloruro de calcio. La fase acuosa se incorpora gota a gota a la mezcla de tensioactivo (Cremophor WO7) y componente

oleoso (parafina líquida), agitando constantemente mediante vórtex a 2400 rpm. En la figura 3.5.b. se describe el método de preparación cuando la fase acuosa está constituida por una mezcla a partes iguales de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio. En este caso, la solución de alginato de sodio se incorpora a la mezcla de tensioactivo (Cremophor WO7) y componente oleoso (parafina líquida) y, manteniendo una agitación constante a 2400 rpm, se añade gota a gota la solución de cloruro de calcio. En la preparación de algunas emulsiones se ha invertido el orden de incorporación de los componentes acusos, adicionándose en primer lugar la solución de cloruro de calcio y luego la solución de alginato. En otras emulsiones se ha incorporado la mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio preparado previamente.

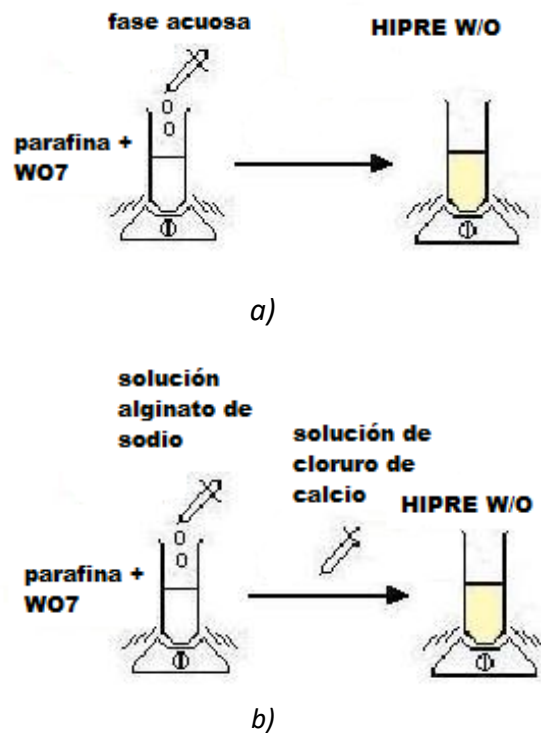
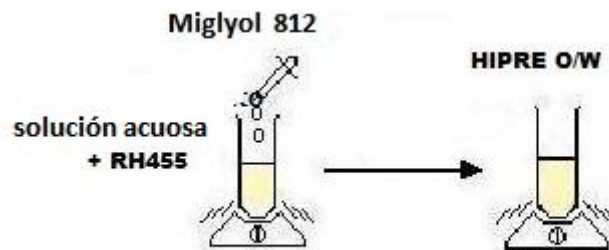


Figura 3.5. Esquema del método de preparación de HIPREs W/O: a) Cuando la fase acuosa es agua, o solución de alginato de sodio o solución de cloruro de calcio y b) Cuando la fase acuosa es una mezcla a partes iguales de solución de alginato de sodio y de solución de cloruro de calcio.

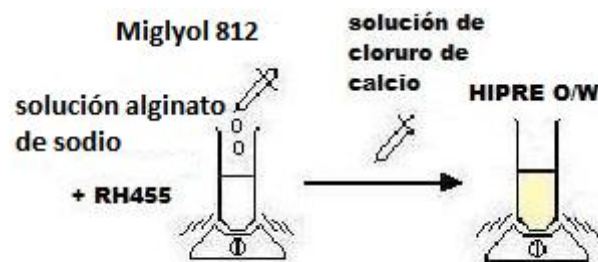
### **Preparación de emulsiones altamente concentradas O/W**

La preparación de este tipo de emulsiones sigue el esquema general presentado en la figura 3.6.a. Este método de preparación se utiliza cuando la fase acuosa es agua, solución de alginato de sodio o solución de cloruro de calcio. El componente oleoso

(Miglyol 812) se incorpora gota a gota a la mezcla de tensioactivo (Cremophor RH455) y componente acuoso, agitando constantemente mediante vórtex a 2400 rpm. En la figura 3.6.b. se describe el método de preparación cuando la fase acuosa está constituida por una mezcla a partes iguales de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio. En este caso, el componente oleoso (Miglyol 812) se incorpora a la mezcla de tensioactivo (Cremophor RH455) y componente acuoso (solución de alginato de sodio) y, manteniendo una agitación constante a 2400 rpm, se añade gota a gota la solución de cloruro de calcio. En la preparación de algunas emulsiones, se mezcló el tensioactivo con la solución de alginato de sodio y cloruro de calcio preparada previamente y se añadió gota a gota el componente oleoso.



a)



b)

Figura 3.6. Esquema del método de preparación de HIPREs O/W: a) Cuando la fase acuosa es agua, o solución de alginato de sodio o solución de cloruro de calcio y b) Cuando la fase acuosa es una mezcla a partes iguales de solución de alginato de sodio y de solución de cloruro de calcio.

## **Incorporación de fármacos a emulsiones altamente concentradas W/O y O/W**

Se ha incorporado ketoprofeno e hidroclicloruro de clindamicina a HIPREs W/O y O/W, para estudiar posteriormente su cinética de liberación desde distintos tipos de HIPREs en función de su estructura y composición.

El ketoprofeno, que es un fármaco lipófilo, se ha incorporado en la mezcla de componente oleoso y tensioactivo en las emulsiones W/O, previamente a la incorporación de componente acuoso y en cambio, en las emulsiones O/W se ha disuelto en el componente oleoso, incorporándose la solución gota a gota a la mezcla de componente acuoso y tensioactivo.

El hidroclicloruro de clindamicina, que es un fármaco hidrosoluble, se ha disuelto en la solución acuosa en las emulsiones W/O y se ha incorporado gota a gota a la mezcla de componente oleoso y tensioactivo y en cambio, en las emulsiones O/W se ha mezclado con el componente acuoso y el tensioactivo, previamente a la incorporación del componente oleoso.

### **3.3.2.2. Caracterización de emulsiones altamente concentradas.**

Para caracterizar las HIPREs se determinaron las dimensiones de gota de la fase interna y las propiedades reológicas mediante las técnicas que se describen a continuación.

## **Caracterización de emulsiones altamente concentradas mediante microscopía**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) es una metodología muy versátil para la caracterización bidimensional y tridimensional de los materiales. La caracterización de las HIPREs W/O se realizó mediante microscopía electrónica SEM con técnica de criofractura, ya que las dimensiones de las gotas de las emulsiones eran del orden nanométrico.

Se utilizó el microscopio JEOL J 6510, equipado con una cámara digital de alta definición. La muestra de emulsión se situó en una rejilla del microscopio formando una capa muy fina y se sumergió en el medio refrigerante para conseguir una rápida vitrificación de la película de emulsión sin cristalización. A continuación, la rejilla se transfirió al microscopio para su observación.

La caracterización de las HIPREs O/W se realizó mediante microscopía óptica a 20 aumentos, ya que los diámetros de las gotas eran de orden micrométrico. Para medir el diámetro de gotas obtenidas en las microfotografías se utilizó el programa de software libre *image J* mediante el que se puede medir los diámetros directamente sobre la fotografía. Se midieron alrededor de 100 gotas de cada muestra y luego se realizó el tratamiento básico estadístico para determinar tamaño promedio y desviación estándar.

## **Caracterización de emulsiones altamente concentradas mediante reología**

Las propiedades reológicas de las HIPREs se cuantificaron en función del módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ). Para el análisis reológico se utiliza 1 gramo aproximadamente de muestra que se debe colocar entre los platos paralelos del

reómetro AR-G2, que tienen un diámetro de 20 mm y una separación de 2,5 mm. Se realiza un barrido de frecuencias entre 0,05 y 10 Hz a una temperatura de 25°C. Una vez establecida la frecuencia de trabajo óptima se procede a determinar el módulo elástico  $G'$  y el módulo viscoso  $G''$  en función de la frecuencia. Las determinaciones se realizan por triplicado.

### **3.3.3. Preparación y caracterización de nano-emulsiones**

#### **3.3.3.1. Preparación de nano-emulsiones**

Se han preparado nano-emulsiones W/O para ser utilizadas como plantilla en la preparación de nanopartículas.

La preparación de las nano-emulsiones W/O se ha realizado a temperatura elevada, 70°C, y mediante adiciones sucesivas de componente acuoso u oleoso (miristato de isopropilo) a la mezcla constituida por los tensioactivos (Cremophor EL y Cremophor WO7) y el otro componente (oleoso u acuoso), bajo agitación constante mediante vórtex a 2400 rpm. Se ha estudiado el orden de incorporación de los componentes en las características de las nano-emulsiones obtenidas.

#### **3.3.3.2. Caracterización de nano-emulsiones.**

#### **Caracterización de nano-emulsiones mediante espectroscopía de correlación de fotones (*Dynamic Light Scattering, DLS*)**

La determinación del tamaño de partícula de las nano-emulsiones y de las nanopartículas y su distribución se ha realizado mediante espectroscopía de correlación de fotones (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), también denominada

difusión dinámica de la luz (Dynamic Light Scattering, DLS). Las técnicas de dispersión de la luz se utilizan para la caracterización de sistemas coloidales y se basan en la determinación del movimiento browniano de los coloides mediante la iluminación de las partículas con luz láser y el análisis de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada en un ángulo constante en función del tiempo. Existe una relación entre el movimiento browniano y el tamaño de las partículas, ya que las partículas más pequeñas se desplazan más rápidamente que las de tamaño más grande. La técnica DLS permite determinar el diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) de partículas en una solución coloidal, conociendo la viscosidad del medio y la temperatura. El diámetro hidrodinámico ( $D_H$ ) se calcula a partir de la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D_H = \frac{kT}{3\pi \cdot \eta \cdot D} \quad (3)$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  la temperatura en escala absoluta,  $\eta$  la viscosidad del medio y  $D$  el coeficiente de difusión, estimado a partir de la función de autocorrelación.

Se utilizaron dos equipos para la determinación del tamaño de partícula: Zetasizer Nano-ZS (Malvern), con un ángulo de medida de 173° y Vasco2 (Cordouan), con un ángulo de medida de 135°. Los análisis de tamaño de partícula se han realizado a partir de la función de autocorrelación (ACF), utilizando dos aproximaciones matemáticas: el modelo de cumulantes, para muestras monodispersas y el modelo de Pade-Laplace para muestras polidispersas.

## **Caracterización de nano-emulsiones mediante microscopía electrónica**

La caracterización de las nano-emulsiones se realizó mediante microscopía electrónica SEM. Se utilizó el microscopio JEOL J 6510 equipado con cámara digital de alta resolución, que permitieron determinar el tamaño y la morfología de las partículas.



## **Estudio de estabilidad de nano-emulsiones mediante retrodispersión de la luz (*Light backscattering*)**

La estabilidad de las nano-emulsiones se evaluó mediante un equipo TurbiscanLab (Formulation). La muestra a analizar (15 g) se introduce en una célula de medida que es un vaso de vidrio cilíndrico cerrado. El TurbiscanLab es un instrumento óptico con una fuente de luz LED (880 nm, infrarrojo cercano) y dos sensores ópticos que reciben respectivamente la luz transmitida a través de la muestra (0° desde la radiación incidente, sensor de transmisión) y la luz retro dispersada por la muestra (135° desde la radiación incidente, detector de backscattering). El cabezal óptico de lectura escanea la muestra en toda su longitud (hasta 55 mm) y registra la luz transmitida y retrodispersada cada 40 µm. La luz retrodispersada depende del tamaño de las partículas. Cada muestra se escanea 5 veces cada 5 minutos a 25°C. Se representa una curva con el flujo de luz transmitida y retrodispersada en función de la altura de la muestra (en mm). Los perfiles obtenidos a diferentes tiempos con una misma muestra proporcionan información sobre la estabilidad de la misma.

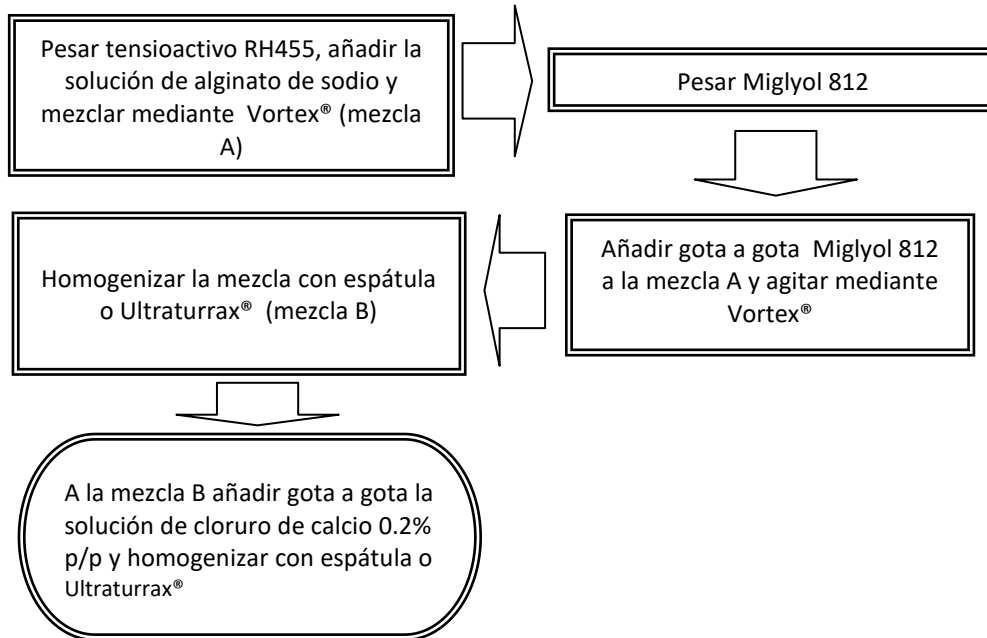
### **3.3.4. Preparación y caracterización de materiales porosos.**

#### **3.3.4.1. Preparación de materiales porosos.**

En la preparación de materiales porosos de alginato (también denominados espumas sólidas) se utiliza una emulsión altamente concentrada (HIPRE O/W) como plantilla. La preparación se realiza en dos etapas: 1) Preparación de una emulsión altamente concentrada (Figura 3.7.) y 2) Lavado y extracción del componente oleoso y tensioactivo (Figura 3.8.).

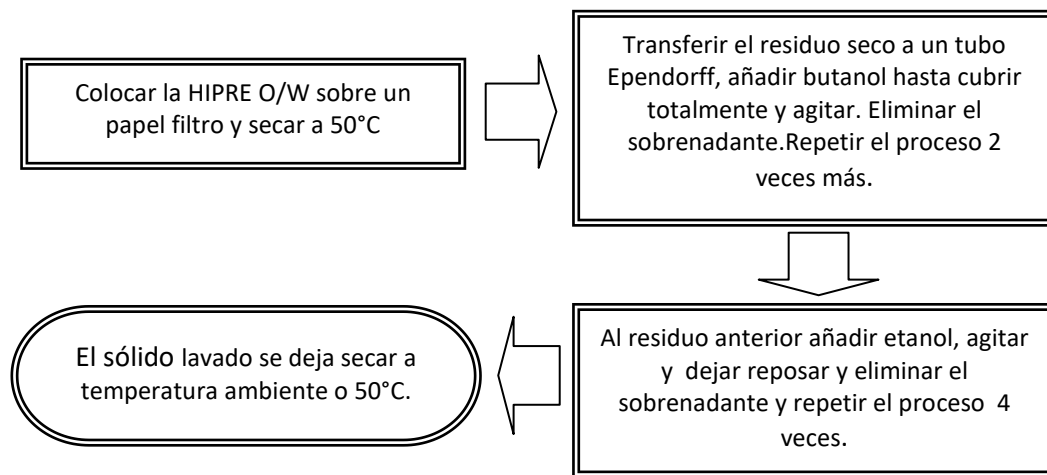
En la etapa 1 tiene lugar la preparación de una emulsión altamente concentrada (HIPRE O/W) mediante adiciones sucesivas del componente oleoso (Miglyol 812) a la mezcla binaria (mezcla A) constituida por tensioactivo (Cremophor RH455) y la mitad del componente acuoso (solución acuosa de alginato de sodio). Finalizada la incorporación del componente oleoso (mezcla B) se incorpora mediante adiciones

sucesivas la otra mitad del componente acuoso (solución de cloruro de calcio). Durante todo el proceso se mantiene agitación constante con vórtex a 2400 rpm y se homogeneiza con ultraturrax a 8000 rpm después de la incorporación del componente oleoso y después de la incorporación de la solución de cloruro de calcio.



*Figura 3.7. Representación esquemática de la preparación de una HIPRE O/W para la formación de materiales porosos (etapa 1).*

En la etapa 2, una vez formada la HIPRE O/W se debe eliminar el componente oleoso y el tensioactivo para obtener el material poroso, tal como se esquematiza en la figura 3.8. En primer lugar se sitúa la HIPRE O/W sobre papel de filtro y se introduce en estufa a 50°C hasta peso constante. A continuación, al residuo seco se introduce en un tubo Eppendorf y se le añade butanol o etanol (97%), se agita en vórtex a 2400 rpm durante 5 minutos y se centrifuga a 10.000 rpm durante 10 minutos. Se separa el sobrenadante y se repite la operación seis veces más. El residuo se deja en reposo a temperatura ambiente o se introduce en estufa a 50°C hasta peso constante.



*Figura 3.8. Representación esquemática del proceso de eliminación de componente oleoso y tensioactivo para la obtención de materiales porosos de alginato a partir de HIPREs O/W (etapa 2).*

### **3.3.4.2. Caracterización de materiales porosos.**

#### **Caracterización de materiales porosos mediante microscopía electrónica**

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite la observación y caracterización de materiales orgánicos e inorgánicos en escalas nanométricas y micrométricas; además de tener la capacidad de obtener imágenes tridimensionales de superficies en un amplio rango de materiales, utilizando las interacciones electrón-material. La técnica SEM permite obtener imágenes topográficas a muy altas magnificaciones y consiste en hacer incidir un haz de electrones sobre la muestra. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales, tales como electrones Auger, electrones secundarios, electrones retrodispersados, rayos X, etc. Los electrones secundarios son los que proporcionan la imagen de la morfología superficial de la muestra (Inkson, 2016). Para conseguir las mejores condiciones de imagen en SEM es necesario que las muestras sean conductoras. Para ello se recubre la muestra con una fina capa de oro o de carbono. Posteriormente, se barre la superficie con electrones

acelerados que viajan a través del cañón. Un detector formado por lentes basadas en electroimanes, mide la cantidad e intensidad de los electrones que devuelve la muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones mediante imagen digital.

En la caracterización de materiales porosos, el material poroso seco se recubrió de polvo de grafito y se tomaron microfotografías con el microscopio de barrido electrónico a un máximo de 15kVA para determinar la morfología. El proceso dura dos horas y se ha realizado en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

## **Caracterización de materiales porosos mediante porosimetría**

Para determinar la superficie específica y la porosidad de los materiales de alginato se utilizó un aparato de sorción de gases que permite obtener las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno de los materiales porosos.

De acuerdo con la teoría Brunauer-Emmett-Teller, BET, (Brunauer, 1938) que amplía la teoría de Langmuir mediante las suposiciones de adsorción en multicapa y condensación capilar, se obtiene para la situación de equilibrio la siguiente ecuación, que describe la adsorción de un gas en función de su presión parcial relativa:

$$\frac{1}{v \cdot [(P_0/P) - 1]} = \frac{C - 1}{v_m \cdot C} \left( \frac{P}{P_0} \right) + \frac{1}{v_m \cdot C} \quad (4)$$

donde  $P_0$  es la de la presión de saturación del vapor,  $v_m$  representa el volumen de gas adsorbida cuando toda la superficie de la muestra está cubierta por el calor de adsorción de la primera capa y el calor de adsorción de las multicapas.  $C$  es la constante entre  $0.05 < P/P_0 < 0.35$ , normalmente la constante BET que relaciona, el modelo BET es válido en el rango de presiones de una monocapa y el valor de la pendiente y el valor de la ordenada en el origen permiten calcular el volumen

adsorbida por la monocapa y determinar la constante BET, tal como se muestra en la Figura 3.9.

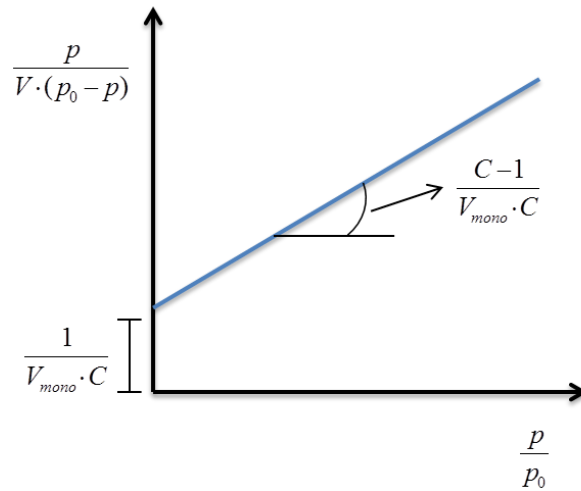


Figura 3.9. Representación lineal de la isoterma de adsorción del gas en la región lineal, según el modelo teórico BET.

Con el valor del volúmen adsorbido por la monocapa,  $v_m$ , se calcula la cantidad de adsorbato que se deposita en una monocapa,  $X_m$ . Así, se determina la superficie específica del material mediante la siguiente relación (Fargelund, 1973):

$$A = \frac{X_m}{M} U_0 N_A \quad (5)$$

donde  $M$  es el peso molecular del adsorbato (generalmente nitrógeno) y  $U_0$  es el valor del área molecular de la sección transversal del adsorbato ( $16.2 \text{ \AA}^2$  para nitrógeno).

También es posible determinar el tipo de porosidad de la muestra examinando el ciclo de histéresis entre la isoterma de adsorción y la isoterma de desorción de nitrógeno, debido a que la presencia de poros provoca una condensación capilar del adsorbato que produce una diferencia (ciclo de histéresis) entre las presiones de adsorción y desorción (Mason, 1988).

Para caracterizar los materiales porosos de alginato se determinó el tamaño de poro y capacidad de adsorción de nitrógeno mediante la adsorción de gas e interpretación

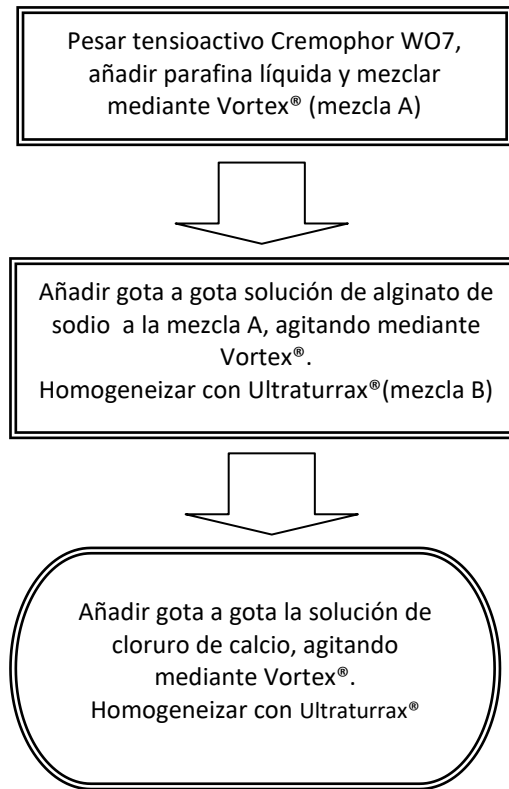
posterior de las isothermas de adsorción. Para ello se desgasificó alrededor de 0.1 gramos de muestra porosa a 55°C durante 12 horas. Los datos de cambio de presión y tamaño de poro de las isothermas de adsorción y desorción se obtuvieron con el porosímetro Quantachrome Autosorb-iQ. Para calcular el área específica desde los datos de adsorción se utilizó el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Se realizó el análisis por duplicado y se calculó el rango de área de superficie.

### **3.3.5. Preparación y caracterización de nanopartículas**

#### **3.3.5.1. Preparación de nanopartículas a partir de emulsiones altamente concentradas**

En la preparación de nanopartículas de alginato se utilizó una emulsión altamente concentrada (HIPRE W/O) como plantilla. Igual como en el caso de los materiales porosos, la preparación se realizó en dos etapas: 1) Preparación de una emulsión altamente concentrada (Figura 3.10.) y 2) Lavado y extracción del componente oleoso y tensioactivo (Figura 3.11.).

En la etapa 1 tiene lugar la preparación de una emulsión altamente concentrada (HIPRE W/O) mediante adiciones sucesivas de la solución de alginato de sodio (es la mitad del componente acuoso) a la mezcla binaria (mezcla A) constituida por tensioactivo (Cremophor WO7) y componente oleoso (parafina líquida). Finalizada la incorporación de la solución de alginato (mezcla B) se incorpora mediante adiciones sucesivas la otra mitad del componente acuoso (solución de cloruro de calcio). Durante todo el proceso se mantiene agitación constante con vórtex a 2400 rpm y se homogeneiza con ultraturrax a 8000 rpm después de la incorporación de la solución de alginato de sodio y después de la incorporación de la solución de cloruro de calcio.



*Figura 3.10. Representación esquemática de la preparación de una HIPRE W/O para la formación de nanopartículas (etapa 1).*

En la etapa 2, una vez formada la HIPRE W/O se debe eliminar el componente oleoso y el tensioactivo para obtener nanopartículas, tal como se esquematiza en la figura 3.11. El proceso de lavado es similar al realizado en las HIPREs O/W es decir en primer lugar se coloca sobre un papel filtro alrededor de 5 g de HIPRE W/O y se seca en estufa a 50°C. A continuación el residuo seco se transfiere a un tubo Ependdorff con 1,5 mL de butanol y la mezcla se mantiene en agitación a temperatura ambiente. El sobrenadante se separa y el sedimento, que presenta un aspecto gelatinoso, se filtra y se lava con butanol o etanol dos veces. Se deja sumergido en etanol durante 12 horas, se filtra y se seca a 25°C hasta peso constante.

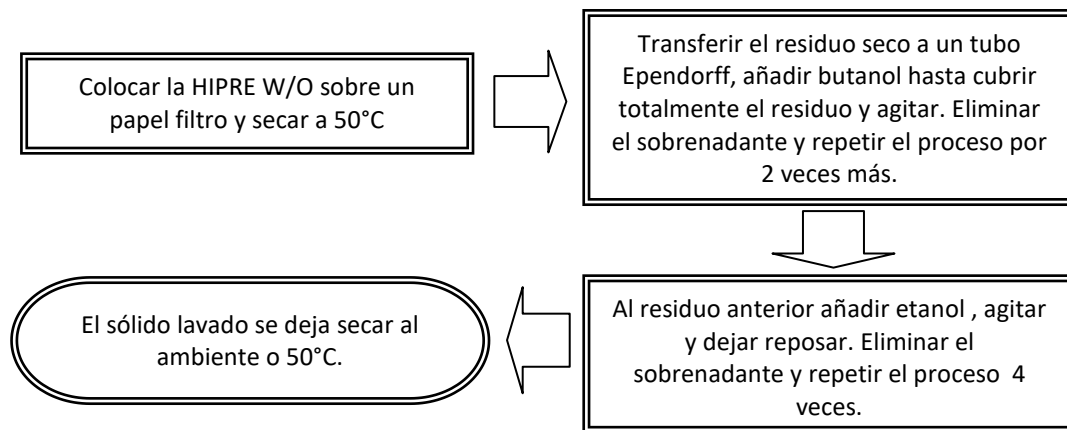


Figura 3.11. Representación esquemática del proceso de eliminación de componente oleoso y tensioactivo para la obtención de nanopartículas de alginato a partir de HIPREs W/O (etapa 2).

### 3.3.5.2. Preparación de nanopartículas a partir de nano-emulsiones

Se prepararon nano-emulsiones W/O según el método descrito en el apartado 3.3.3.1 y se incorporó solución de alginato de sodio y de cloruro de calcio en distintas proporciones y en distintas etapas del proceso de preparación de las nano-emulsiones con la finalidad de obtener nanopartículas de alginato de sodio utilizando como plantilla las gotas de fase interna de la nano-emulsión. La elaboración tuvo lugar mediante adiciones sucesivas de componente acuoso u oleoso a la mezcla constituida por los tensioactivos y el otro componente (oleoso u acuoso), bajo agitación constante mediante vórtex a 2400 rpm.

### 3.3.5.3. Preparación de nanopartículas de alginato a partir de soluciones

Se prepararon partículas de alginato según el método propuesto por Rajaonarivony (Rajaonarivony, 1993). El método (Figura 3.12) consistió en añadir 4,5 mL de agua a 5 mL de una solución de alginato al 0,12%. A continuación, se añadió gota a gota 0,5 mL



de solución de cloruro de calcio al 0,2% (18 mM). Dos minutos más tarde se añadieron gota a gota 2 mL de una solución de poli-lisina al 0,05%. La mezcla se agitó a 2400 rpm durante 5 minutos.

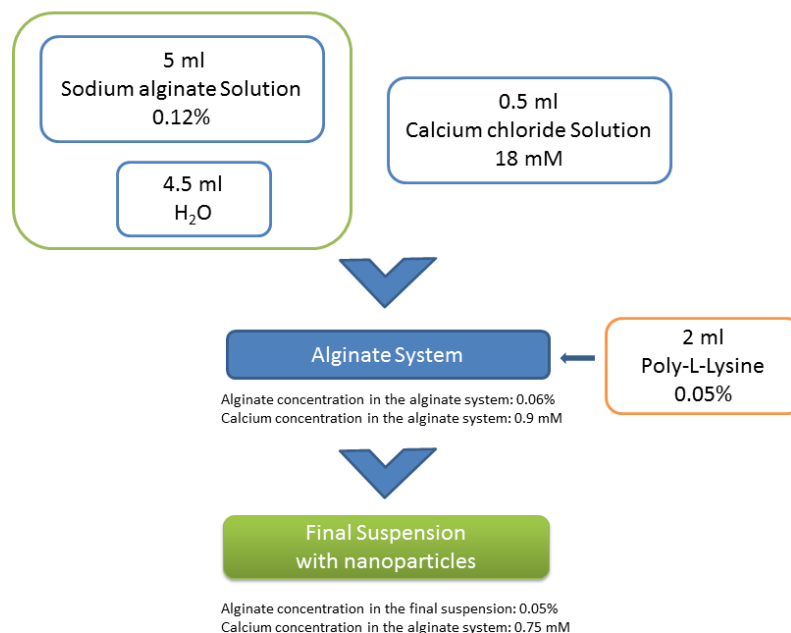


Figura 3.12. Representación esquemática del proceso de preparación de partículas de alginato a partir de soluciones (Rajaonarivony, 1993).

#### 3.3.5.4. Caracterización de nanopartículas

El material nanoparticulado se caracterizó mediante Dynamic Light Scattering, Light back scattering, microscopía electrónica y reología.

El material nanoparticulado seco obtenido a partir de HIPREs, de nano-emulsiones y de soluciones se cubrió de polvo de grafito y se tomaron microfotografías con el microscopio electrónico (SEM) según el método descrito en el apartado 3.3.4.2 para determinar la morfología y el tamaño de las nanopartículas.

El material nanoparticulado obtenido a partir de HIPREs W/O, antes de ser lavado para eliminar el componente oleoso y los tensioactivos, presenta un aspecto de gel, por lo

tanto se realizó un ensayo reológico para determinar las propiedades visco-elásticas de este sistema. Se realizó un escaneo reológico de barrido de frecuencia entre 0.1 a 20 Hz a 25°C con geometría plato-plato de 40 mm. Se utilizó alrededor de 1 gramo y se determinó el parámetro de viscosidad  $G''$  y de elasticidad  $G'$ . El equipo utilizado fue el reómetro AR-G2.

### 3.3.6. Ensayos de liberación de fármacos a partir de emulsiones altamente concentradas

Los estudios de liberación de ketoprofeno y hidrocloreuro de clindamicina desde HIPREs se han llevado a cabo mediante un sistema de difusión que consiste en bolsas de diálisis sumergidas en un medio receptor a temperatura constante, tal como se esquematiza en la figura 3.13.

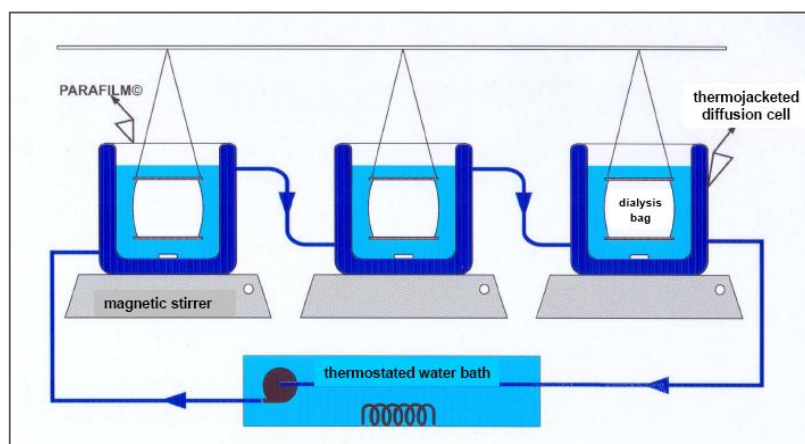


Figura 3.13. Esquema experimental para ensayos de liberación (Llinàs, 2010).

En las bolsas de diálisis se introduce alrededor de 1 gramo de muestra (HIPRE) que contiene un principio activo (ketoprofeno o hidrocloreuro de clindamicina) y se mantiene una misma área superficial de contacto con la membrana y la solución receptora. La solución receptora es una solución reguladora de fosfatos (PBS) y se prepara pesando 0,19 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,38 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 8 g de NaCl, luego se añade agua hasta un litro y se ajusta a pH 7.4 ya sea con la solución de KOH si la solución tiene un pH menor a 7.4 o con  $\text{H}_3\text{PO}_4$  si es mayor.

Un volumen determinado de solución receptora (180 mL) se introduce en cada uno de los vasos de vidrio de doble pared Vidrafoc que están conectados a un baño de agua termostataado a 37°C. Los vasos de vidrio son de color topacio para evitar la posible fotodegradación del principio activo. El saco de diálisis está constituido por una membrana tubular de celulosa regenerada Cellu-Sep® T3 (Orange Scientific) con un grosor de pared de 20 µm y un tamaño de poro de 12000-14000 Da (Molecular Weight Cut Off, MWCO).

A diferentes intervalos de tiempo y durante 24 horas se extraen 1000 µL de solución receptora para ser analizados y se reemplazan por 1000 µL de PBS a pH 7,4 calentado previamente a 37°C. Los intervalos de tiempo de extracción de muestra han sido: 5 minutos después del inicio del ensayo, cada 15 minutos hasta la primera hora, cada 30 minutos hasta la segunda hora, cada hora hasta la octava hora y las últimas muestras se han obtenido transcurridas 22 horas del inicio del ensayo a intervalos de una hora hasta las 24 horas aproximadamente. La solución receptora se mantiene en agitación constante hasta la finalización del ensayo para favorecer la correcta difusión del principio activo a través de la membrana de celulosa. Para mantener la agitación se han utilizado placas de agitación magnética SBS, regulando la velocidad de agitación a 250 rpm.

La determinación de la concentración de las muestras se ha realizado mediante HPLC o espectrofotometría UV-visible.

### 3.3.7. Determinación cuantitativa de fármacos

#### 3.3.7.1. Análisis cuantitativo de ketoprofeno

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica utilizada para la separación de componentes de una mezcla, basada en diferentes tipos de interacciones químicas y físicas entre los analitos y la columna cromatográfica. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria.

Se ha utilizado el régimen de elución isocrático que consiste en la separación de un disolvente de composición constante a lo largo del tiempo. La muestra a analizar pasa a través de una columna cromatográfica que constituye la fase estacionaria mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. Los diferentes componentes de la muestra se eluyen de manera diferente según las interacciones químicas y físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan a través de la columna. El grado de retención de los componentes depende de su naturaleza, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil. El tiempo necesario para que un componente se eluya de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad característica de identificación de un componente en una fase móvil y estacionaria determinadas.

La determinación de la cantidad de principio activo se ha determinado a partir de rectas de calibrado preparadas con un mínimo de seis soluciones a diferentes concentraciones del principio activo que se desea cuantificar. La representación gráfica del valor de las áreas bajo la curva de los picos obtenidos para cada una de las concentraciones de las soluciones patrón permite obtener la recta de los mínimos cuadrados o de regresión del tipo

$$y = A + Bx \quad (6)$$

donde  $y$  es el valor del área cromatográfica,  $A$  es la ordenada en el origen,  $B$  es la pendiente de la recta y  $x$  es la concentración. La concentración del principio activo en la solución problema se determina por interpolación del área cromatográfica obtenida a partir de la recta de calibrado.

El sistema cromatográfico utilizado para analizar ketoprofeno ha sido un equipo Shimadzu con una columna de fase reversa Kromasil® 100-5C18 y un detector UV a una longitud de onda de 233 nm. La elución de ketoprofeno ha tenido lugar a temperatura ambiente utilizando una fase móvil compuesta por una mezcla de 55% de acetonitrilo como fase orgánica y 45% de fase acuosa a pH 3,0. El flujo ha sido de 1 mL/min y el volumen de inyección 20  $\mu$ L. El tiempo de elución para el ketoprofeno ha sido de 7 minutos. El método fue validado previamente.

Algunas determinaciones de ketoprofeno se realizaron mediante espectrofotometría UV-visible, con el equipo Helios  $\beta$  v 4.60.

### **3.3.7.2. Análisis cuantitativo de hidrocloreuro de clindamicina**

Siguiendo el método propuesto por la Farmacopea de Estados Unidos (USP), las condiciones experimentales para el análisis del hidrocloreuro de clindamicina mediante HPLC han sido las siguientes: Columna Spherisorb ODS 2 (150 x 4.6mm, 5 $\mu$ m), utilizando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo: solución de dihidrogenofosfato de potasio a pH 7,5 (ajustado con una solución de hidróxido de potasio 8N) (550:450) en volumen. El flujo se fijó en 1mL/min y la longitud de onda del detector correspondiente al máximo de absorción del hidrocloreuro de clindamicina fue de 210nm. El volumen inyectado fue de 50  $\mu$ L. El tiempo de retención del hidrocloreuro de clindamicina en estas condiciones experimentales fue aproximadamente de 6 minutos.



# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **4.1. Preparación y caracterización de dispersiones de alginato de sodio y cloruro de calcio**

Entre los métodos descritos en la bibliografía para la reticulación del alginato se escogió el método de gelificación externa convenientemente modificado (Paques, 2014). La reticulación del alginato tiene lugar por el intercambio de iones sodio del ácido gulurónico (bloques G del alginato sódico) con cationes calcio, para formar la estructura característica según el modelo de caja de huevos (Grant, 1973). El método de gelificación externa del alginato se basa en la incorporación de gotas de una solución de alginato sódico a una solución de cloruro cálcico; de este modo, los cationes calcio difunden desde la fase continua hacia el interior de las gotas de alginato, dando lugar a la formación de una matriz de alginato. El método de gelificación externa se caracteriza por una rápida gelificación pero también por la obtención de un gel poco homogéneo, con diferencia entre la superficie y el interior del gel (Paques, 2014). Para lograr una gelificación más homogénea se modificó el método: se prepararon por separado las soluciones de alginato sódico y cloruro cálcico y se mezclaron volúmenes iguales de ambas soluciones utilizando un homogeneizador de alta velocidad.

Se seleccionó alginato sódico de viscosidad media entre 80000 y 120000 de peso molecular. Para la preparación de las soluciones de cloruro cálcico se partió de una solución 1M para evitar la hidratación del cloruro cálcico sólido debido a su higroscopicidad. Se prepararon varias mezclas de alginato sódico y cloruro cálcico con la finalidad de seleccionar la concentración más adecuada para ser incorporada como fase acuosa a las emulsiones altamente concentradas o a las nano-emulsiones. El objetivo era seleccionar una composición lo suficientemente fluida que permitiera la incorporación de la fase acuosa por pesada directa o gota a gota. Las mezclas de las

soluciones de alginato sódico se realizaron por varios procedimientos: a) incorporación de la solución de alginato sódico a la solución de cloruro cálcico con agitador tipo Vórtex® y homogeneizador Ultraturrax®, b) incorporación de la solución de cloruro cálcico a la solución de alginato sódico con agitador tipo Vórtex® y homogeneizador Ultraturrax® y c) pesada directa de ambas soluciones y mezcla inmediata con homogeneizador Ultraturrax®. El último método resultó más reproducible y fue el seleccionado, ya que permitía obtener valores de viscosidad con una baja variabilidad y la formación de geles más homogéneos. En la tabla 4.1. se detalla la composición de soluciones de alginato de sodio y cloruro de calcio estudiadas, así como la viscosidad determinada y su aspecto macroscópico. En la Figura 4.1. se muestra la representación gráfica de las viscosidades, donde se observa claramente en las mezclas que contienen un 1% de alginato de sodio (línea azul) el aumento de la viscosidad producido por la gelificación, cuando aumenta el porcentaje de cloruro de calcio.

*Tabla 4.1. Viscosidad y aspecto macroscópico de mezclas de alginato de sodio y cloruro de calcio preparadas por mezcla inmediata de una solución de alginato de sodio y una solución de cloruro de calcio y homogeneización con ultraturrax a 8000 rpm durante 30 segundos, a 25°C.*

Composición de las muestras		Viscosidad (mPa.s)	Aspecto macroscópico
Alginato de sodio (%)	CaCl <sub>2</sub> (%)		
1	0	20,92 ± 1,60	Solución coloidal
2	0	85,29 ± 0,59	Gel
0,06	0,1	2,62 ± 0,08	Solución coloidal
0,25	0,1	9,97 ± 0,18	Solución coloidal
0,50	0,1	77,49 ± 1,09	Gel
0,75	0,1	141,25 ± 2,33	Gel
1	0,005	20,56 ± 0,03	Solución coloidal
	0,015	19,55 ± 0,20	Solución coloidal
	0,025	19,55 ± 0,08	Solución coloidal
	0,03	18,86 ± 0,04	Solución coloidal
	0,035	18,02 ± 0,15	Solución coloidal
	0,05	47,57 ± 1,50	Gel
	0,075	202,40 ± 0,71	Gel
	0,1	330,35 ± 7,85	Gel

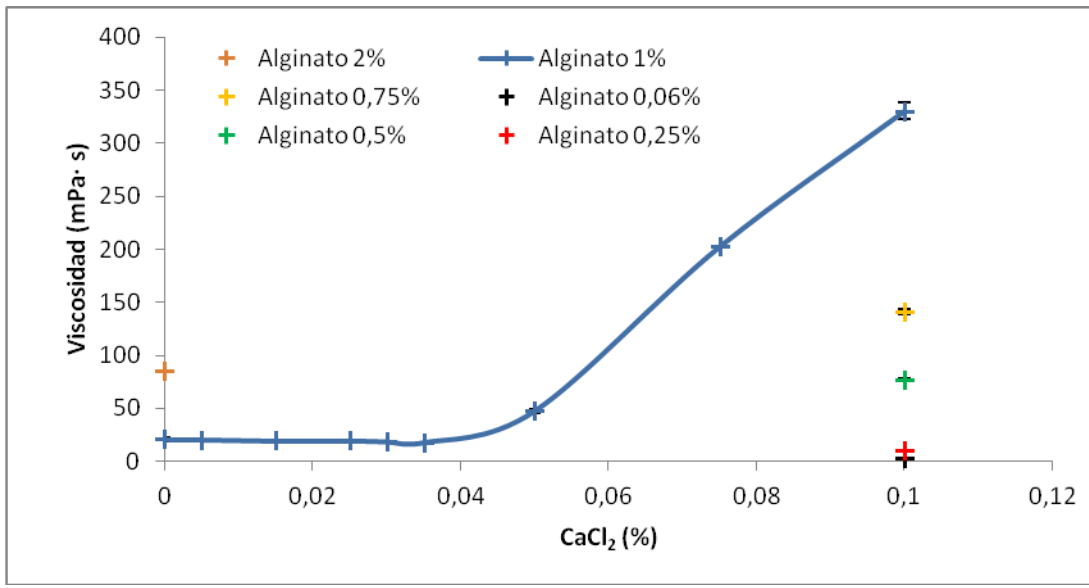
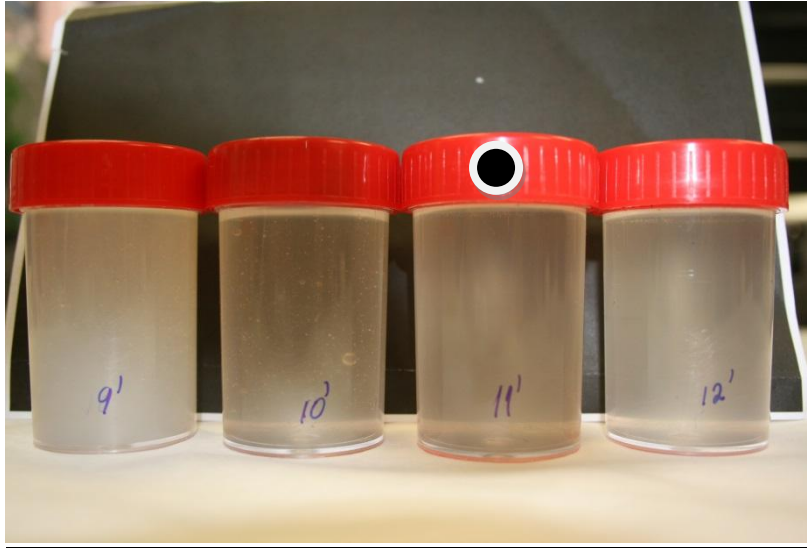


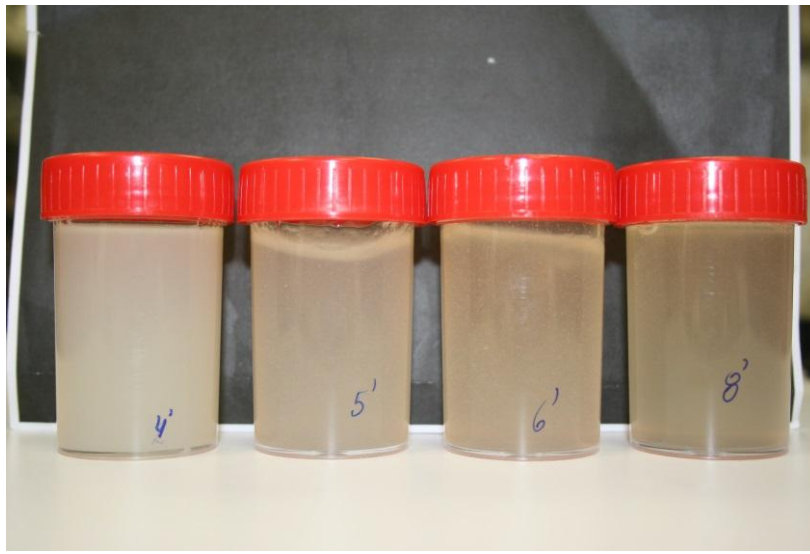
Figura 4.1. Representación gráfica de las viscosidades de mezclas de soluciones de alginato de sodio en función de la concentración de cloruro de calcio, a 25°C.

Se observó una clara influencia de la concentración de cloruro cálcico en la viscosidad y el aspecto de las mezclas. Las mezclas que contenían una concentración de alginato superior al 2% se desestimaron, debido al notable aumento de viscosidad que se observaba al incorporar una mínima concentración de cloruro cálcico. Entre las mezclas que contenían un 1% de alginato sódico, concentraciones superiores al 0,05% de cloruro de calcio daban lugar a una notable gelificación y se consideraron inadecuadas para los objetivos de la investigación. Se seleccionó la mezcla con un 1% de alginato y un 0.015% de cloruro cálcico por encontrarse claramente dentro de la zona de soluciones coloidales y permitir su incorporación posterior a las emulsiones altamente concentradas. Se consideraron concentraciones de alginato inferiores al 1% para la preparación de nanopartículas de alginato a partir de nano-emulsiones W/O debido a la baja proporción de componente acuoso en estas formulaciones. Se consideraron concentraciones de alginato superiores al 1% para la preparación de materiales porosos y nanopartículas a partir de emulsiones altamente concentradas, ya que la preparación de materiales porosos requiere una mínima concentración de alginato. En la Figura 4.2. se muestra el aspecto visual de algunas soluciones coloidales y geles de alginato sódico y cloruro cálcico así como la mezcla seleccionada para la

preparación de emulsiones altamente concentradas como sistemas de liberación de fármacos.



a) Soluciones coloidales



b) Geles

*Figura 4.2. Aspecto macroscópico de: a) soluciones coloidales y b) geles de alginato de sodio y cloruro de calcio. La muestra marcada con un punto negro es la mezcla seleccionada para la preparación de emulsiones altamente concentradas como sistemas de liberación de fármacos.*

Se estudió la preparación de la mezcla seleccionada para la preparación de emulsiones altamente concentradas como sistemas de liberación de fármacos por otros métodos, tal como la incorporación gota a gota de la solución de cloruro

cálcico a la solución de alginato y viceversa y la viscosidad permaneció dentro de la correspondiente a las soluciones coloidales sin gelificar con ninguno de los métodos ensayados. El pH de estas mezclas se mantuvo en el rango de 6,6 a 6,9.

## **4.2. Preparación y caracterización de emulsiones altamente concentradas basadas en alginato y estudios de incorporación y liberación de fármacos**

Las emulsiones altamente concentradas (HIPREs) han sido estudiadas por nuestro grupo de investigación como sistemas de liberación controlada de fármacos (Calderó, 2010 y 2012; Llinàs, 2013) y como medios de compartimentalizados de reacción para la obtención de materiales porosos (Esquena 2003; Miras, 2013a; Gosh, 2011; Roig, 2016). La reticulación de alginato de sodio con cloruro de calcio obteniendo mezclas de baja viscosidad, tal como se ha detallado en el apartado anterior, ofrece la posibilidad de añadir dicho polímero en emulsiones altamente concentradas y estudiar la influencia de los métodos de incorporación de alginato y de cloruro de calcio en las cinéticas de liberación de un fármaco modelo desde dichas emulsiones para lograr nuevos sistemas de liberación controlada con una elevada biocompatibilidad. El método de gelificación externa de alginato, también conocido como método de difusión, consiste añadir gota a gota una solución de alginato a una solución de cloruro cálcico (Paques, 2014). De este modo, los cationes calcio difunden desde la fase continua al interior de las gotas de alginato y forman una matriz de alginato gelificado. El método de gelificación externa o difusión se caracteriza por una rápida gelificación que generalmente da lugar a geles poco homogéneos, más gelificados en la parte externa y menos en el centro de las gotas de alginato (Skjak-Braek, 1989). La aplicación del método de gelificación externa de alginato en un medio altamente compartimentalizado como son las emulsiones altamente concentradas ofrece nuevas posibilidades para la obtención de materiales que permitan la liberación controlada de fármacos.

### 4.2.1. Preparación de emulsiones altamente concentradas

Para estudiar la incorporación de alginato de sodio y cloruro de calcio en emulsiones altamente concentradas se seleccionaron sistemas agua/tensioactivo/componente oleoso adecuados para uso farmacéutico que dieran lugar a HIPREs W/O y O/W a temperatura ambiente. Partiendo de estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación se escogieron sistemas con una amplia zona de formación de HIPREs. Los sistemas seleccionados fueron agua/ Cremophor WO7/parafina líquida para las HIPREs W/O (Calderó, 2010) y agua/Cremophor RH455/Miglyol 812 para las HIPREs O/W (Roig, 2016). En la selección de los sistemas se tuvo en consideración la biocompatibilidad de los componentes y la posibilidad de eliminar el tensioactivo y el componente oleoso con disolventes aceptables para uso farmacéutico, fácilmente eliminables y de baja toxicidad. Esta última propiedad es especialmente importante en la preparación de materiales porosos a partir de HIPREs. En las Figuras 4.3. y 4.4. se muestran los sistemas seleccionados y las zonas de formación de HIPREs W/O y O/W.

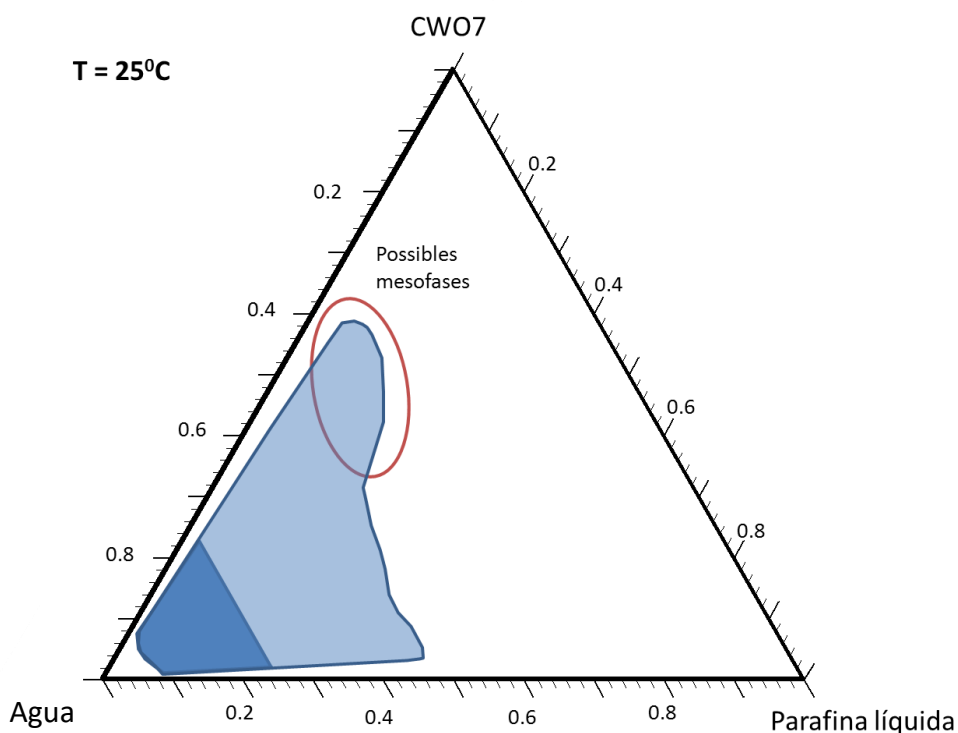
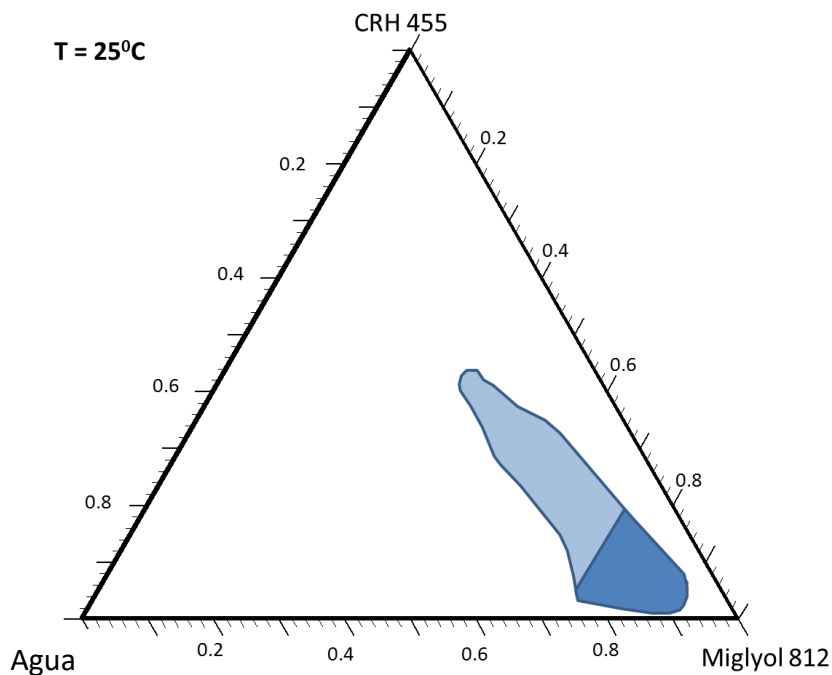


Figura 4.3. Zona de formación de emulsiones no fluidas de tipo W/O en el sistema agua/Cremophor WO7/parafina líquida a 25°C. La región señalada con color más intenso corresponde a la zona de formación de HIPREs (fase dispersa >74%) (Roig, 2016).



*Figura 4.4. Zona de formación de emulsiones no fluidas de tipo O/W en el sistema agua/Cremophor RH455/Miglyol 812 a 25°C. La región señalada con color más intenso corresponde a la zona de formación de HIPREs (fase dispersa >74%) (Roig, 2016).*

Se estudió la solubilidad del alginato sódico en los componentes oleosos, parafina líquida y Miglyol 812, y se comprobó que el alginato es prácticamente insoluble en ambos excipientes, mostrando una solubilidad preferencial por el agua.

#### **4.2.1.1. Preparación de HIPREs W/O e incorporación de fármacos**

Se han preparado emulsiones altamente concentradas del sistema agua/Cremophor WO7/parafina líquida a 25°C, siguiendo el método de las adiciones sucesivas descrito en el apartado 3.3.2.1. En la tabla 4.2 se indica la composición de las HIPREs W/O estudiadas. Las composiciones indicadas en la tabla 4.2. corresponden a las utilizadas en la preparación de las HIPREs, sin embargo la concentración final de agua, alginato de sodio y cloruro de calcio en la HIPRE final es ligeramente inferior a la indicada ya que el componente acuoso es el 83% del total de la HIPRE; por tanto, un 1% de solución de alginato de sodio utilizado en la preparación de la HIPRE representa aproximadamente un 0,83% en la formulación final y una solución al 0,015% de cloruro

de calcio representa un aproximadamente un 0,01245% de cloruro de calcio en la formulación final. La concentración de los principios activos indicada en la tabla es exactamente la concentración final en la HIPRE. En primer lugar se prepararon HIPRES con distintas proporciones de agua (90% y 83%) para varias relaciones componente oleoso (O) /tensioactivo (S) (parafina líquida/Cremophor WO7). Se estudió la estabilidad de las mismas por observación visual directa durante tres meses a 25°C y por microscopía óptica. La fluidez de las muestras o la separación de fases son indicativas de pérdida de estabilidad. De este modo se constató que las HIPRES que contenían un 90% de agua para todas las relaciones O/S estudiadas (HIPRES HWO1 y HWO2) y un 83% de agua para relaciones O/S 10/90, 30/70 y 90/10 (HIPRES HWO3, HWO4 y HWO5) se fluidificaban en un periodo de tiempo inferior a tres meses desde su preparación. La HIPRE HWO6, con un 83% de agua y una relación O/S 70/30 resultó ser la más estable y se seleccionó para estudios posteriores. En la figura 4.5 se muestra el aspecto visual de la HIPRE HWO6 y su localización en el diagrama ternario.

*Tabla 4.2. Composición de las HIPRES W/O estudiadas\**

HIPRE W/O	O/S Relación en peso	Componente acuoso			Principios activos		Observaciones
		Agua %	Alginato sódico %	CaCl <sub>2</sub> %	Keto %	Clinda %	
HWO1	30/70	90					Baja estabilidad
HWO2	70/30	90					Baja estabilidad
HWO3	10/90	83					Baja estabilidad
HWO4	30/70	83					Baja estabilidad
HWO5	90/10	83					Baja estabilidad
HWO6	70/30	83					Alta estabilidad
HWO6A	70/30	83	1				
HWO6C	70/30	83		0,015			
HWO6CA	70/30	83	1	0,015			1º CaCl <sub>2</sub>
HWO6AC	70/30	83	1	0,015			1º alginato
HWO6ac	70/30	83	1	0,015			Sol. AlginatoCa
HWO6K	70/30	83			0,25		
HWO6AK	70/30	83	1		0,25		
HWO6acK	70/30	83	1	0,015	0,25		Sol. AlginatoCa
HWO6Clin	70/30	83				0,25	
HWO6AClin	70/30	83	1			0,25	
HWO6acClin	70/30	83	1	0,015		0,25	Sol. AlginatoCa

\*Todos los porcentajes indicados son peso/peso



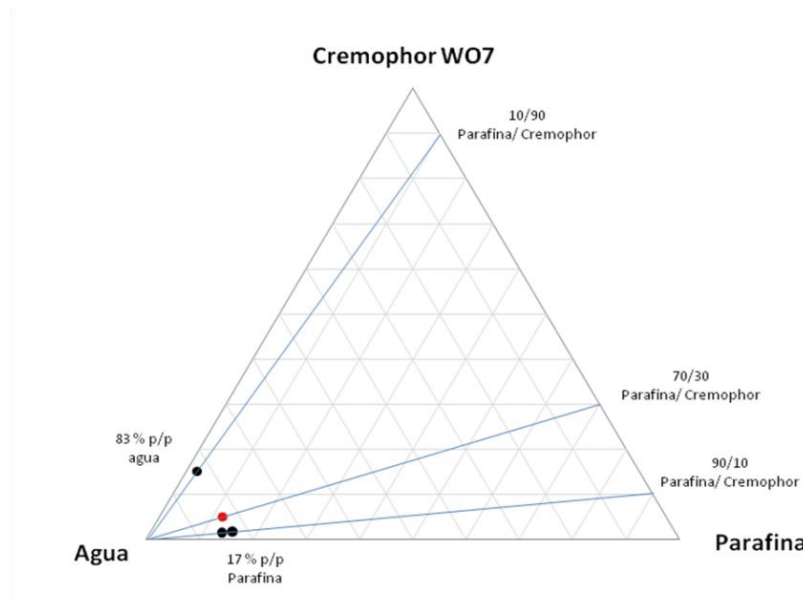


Figura 4.5. Aspecto macroscópico de la HIPRE HWO6 a 25°C y su localización en el diagrama ternario (punto rojo).

Después de seleccionar la composición con un 83% de agua y una relación O/S 70/30 en peso, se estudió la sustitución del agua por diversos componentes acuosos: solución acuosa de alginato de sodio al 1% (HIPRE HWO6A), solución de cloruro de calcio al 0,015% (HIPRE HWO6C) y la mezcla de estos dos componentes, incorporados de distintas maneras. En la HIPRE HWO6CA se adicionó a la mezcla de tensioactivo y componente oleoso una solución de cloruro de calcio gota a gota y bajo agitación constante y, a continuación, una solución de alginato de sodio. En la HIPRE HWO6AC se adicionó a la mezcla de tensioactivo y componente oleoso una solución de alginato de sodio gota a gota y bajo agitación constante y, a continuación, una solución de cloruro de calcio. En la HIPRE HWO6ac se adicionó a la mezcla de tensioactivo y componente oleoso una mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio preparado previamente, siempre gota a gota y bajo agitación constante. La incorporación de solución de cloruro de calcio como componente acuoso causó una fluidificación de las emulsiones, por lo que las HIPREs que contenían dicho componente acuoso se descartaron para estudios posteriores. Sin embargo, la presencia de alginato de sodio o la mezcla de alginato y cloruro de calcio no supuso ningún tipo de desestabilización en las HIPREs obtenidas, que conservaron su aspecto macroscópico y viscosidad

característica, sin indicios de separación de fases o fluidificación durante más de 5 meses.

De acuerdo con estos resultados se incorporó un fármaco lipófilo, ketoprofeno, en un 0,25% y un fármaco hidrófilo, hidroclicloruro de clindamicina, también en un 0,25%, a las emulsiones que contenían como componente acuoso agua (HIPREs HWO6K y HWO6Clin), alginato (HIPREs HWO6AK y HWO6AClin) y a las que contenían la mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio (HIPREs HWO6CAK, HWOACK, HWO6acK y HWO6acClin), con la finalidad de estudiar los perfiles de liberación de dichos principios activos a soluciones receptoras y poder así evaluar la influencia del alginato libre o reticulado en la difusión molecular de los fármacos. El ketoprofeno se disolvió en la mezcla de componente oleoso y tensioactivo antes de preparar la emulsión y el hidroclicloruro de clindamicina se disolvió en el componente acuoso: agua, solución acuosa de alginato o mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio, y se incorporó gota a gota a la mezcla de componente oleoso y tensioactivo. La incorporación de ketoprofeno o hidroclicloruro de clindamicina no supuso ninguna alteración macroscópica en la estabilidad de las HIPREs y no se observó ni fluidificación ni separación de fases durante más de 5 meses de estudio.

#### **4.2.1.2. Preparación de HIPREs O/W e incorporación de fármacos**

Se han preparado emulsiones altamente concentradas del sistema agua/Cremophor RH455/Miglyol 812 a 25°C, siguiendo el método de las adiciones sucesivas descrito en el apartado 3.3.2.1. Con la finalidad de comparar las HIPREs O/W con las W/O descritas en el apartado anterior, se fijó la concentración de fase interna (en este caso Miglyol 812) en un 83%. En la tabla 4.3 se indica la composición de las HIPREs O/W estudiadas. Las composiciones indicadas en la tabla 4.3. corresponden a las utilizadas en la preparación de las HIPREs, sin embargo la concentración final de agua, alginato de sodio y cloruro de calcio en la HIPRE final es inferior a la indicada ya que el componente acuoso es el 13,6% del total de la HIPRE, por tanto, un 1% de solución de alginato de sodio utilizado en la preparación de la HIPRE representa aproximadamente

un 0,136% en la formulación final y una solución al 0,015% de cloruro de calcio representa aproximadamente un 0,00204% de cloruro de calcio en la formulación final. La concentración de los principios activos indicada en la tabla es exactamente la concentración final en la HIPRE.

En primer lugar se prepararon HIPREs con un 83% de Miglyol 812 para varias relaciones componente acuoso/tensioactivo (agua/Cremophor RH455). Se estudió la estabilidad de las mismas por observación visual directa durante tres meses a 25°C y por microscopía óptica. La fluidez de las muestras o la separación de fases son indicativas de pérdida de estabilidad. De este modo se constató que las HIPREs que contenían un 83% con componente oleoso para algunas de las relaciones W/S estudiadas (HIPREs HOW1 y HOW3) se fluidificaban en un periodo de tiempo inferior a tres meses desde su preparación. La HIPRE HOW2, con un 83% de componente oleoso y una relación W/S 80/20 resultó ser la más estable y se seleccionó para estudios posteriores. En la figura 4.6. se muestra el aspecto visual de la HIPRE HOW2 y su localización en el diagrama ternario.

*Tabla 4.3. Composición de las HIPREs O/W estudiadas.*

HIPRE O/W	W/S Relación en peso	Componente acuoso			Principios activos		Observaciones
		Agua %	Alginato sódico %	CaCl <sub>2</sub> %	Keto %	Clinda %	
HOW1	95/5	16,15					Baja estabilidad
HOW2	80/20	13,60					Alta estabilidad
HOW3	67/33	11,39					Baja estabilidad
HOW2A	80/20	13,60	1				
HOW2C	80/20	13,60		0,015			
HOW2AC	80/20	13,60	1	0,015			1º alginato
HOW2ac	80/20	13,60	1	0,015			Sol. alginatoCa
HOW2K	80/20	13,60			1,5		
HOW2ACK	80/20	13,60	1	0,015	1,5		1º alginato
HOW2acK	80/20	13,60	1	0,015	1,5		Sol. alginatoCa
HOW2Clin	80/20	13,60				1,5	
HOW2AClin	80/20	13,60	1			1,5	
HOW2ACClin	80/20	13,60	1	0,015		1,5	1º alginato
HOW2acClin	80/20	13,60	1	0,015		1,5	Sol. alginatoCa

\*Todos los porcentajes indicados son peso/peso

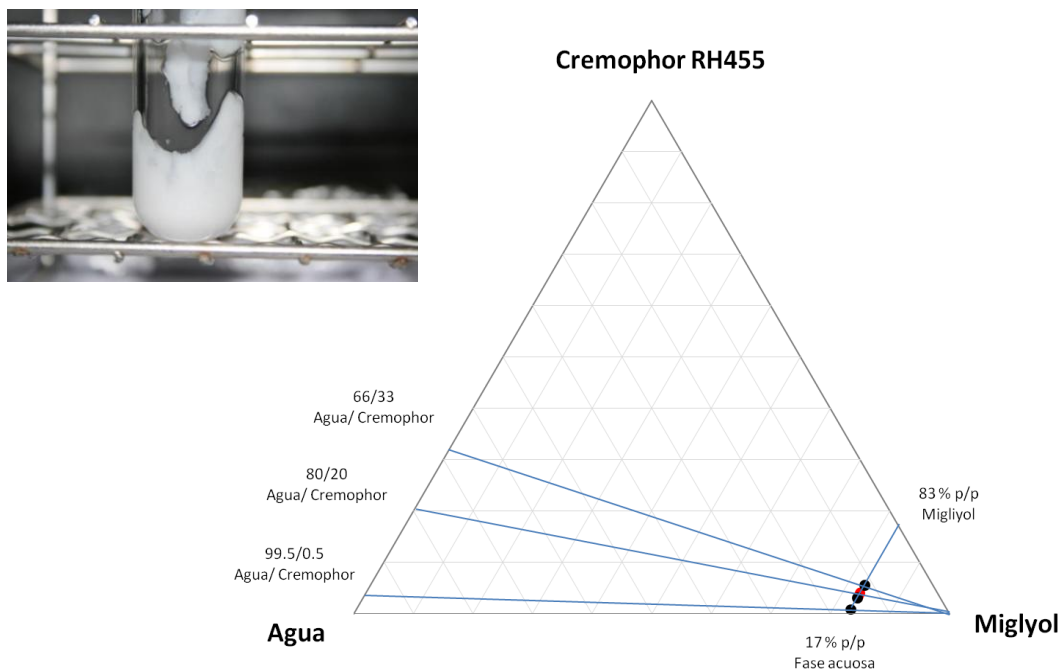


Figura 4.6. Aspecto macroscópico de la HIPRE HOW2 a 25°C y su localización en el diagrama ternario (punto rojo).

Después de seleccionar la composición con un 83% de Miglyol 812 y una relación W/S 80/20 en peso, se estudió la sustitución del agua por diversos componentes acuosos: solución acuosa de alginato de sodio al 1% (HIPRE HOW2A), solución de cloruro de calcio al 0,015% (HIPRE HOW2C) y la mezcla de estos dos componentes, incorporados de distintas maneras. En la HIPRE HOW2A se adicionó Miglyol, gota a gota y bajo agitación constante, a la mezcla de tensioactivo y solución de alginato de sodio. En la HIPRE HOW2C se adicionó Miglyol, gota a gota y bajo agitación constante, a la mezcla de tensioactivo y solución de cloruro de calcio. En la HIPRE HOW2AC se adicionó Miglyol, gota a gota y bajo agitación constante, a la mezcla de tensioactivo y solución de alginato (50% de la fase acuosa) y una vez incorporado el Miglyol se añadió gota a gota y bajo agitación constante la solución de cloruro de calcio (el 50% restante de fase acuosa). En la HIPRE HOW2ac se adicionó Miglyol gota a gota y bajo agitación constante a la mezcla constituida por tensioactivo y la mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio preparada previamente. La presencia de alginato de sodio o la mezcla de ambos componentes no produjo desestabilización en las HIPREs obtenidas, que conservaron su aspecto macroscópico y viscosidad característica, sin indicios de separación de fases o fluidificación durante más de 5 meses.

De acuerdo con estos resultados se incorporó un fármaco lipófilo, ketoprofeno, en un 1,5% y un fármaco hidrófilo, hidroclicloruro de clindamicina, también en un 1,5%, a las emulsiones que contenían como componente acuoso agua (HIPREs HOW2K y HOW2Clin), alginato (HIPREs HOW2AK y HOW2AClin) y a las que contenían la mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio (HIPREs HOW2acK y HOW2acClin), con la finalidad de estudiar los perfiles de liberación de dichos principios activos a soluciones receptoras y poder así evaluar la influencia del alginato libre o reticulado en la difusión molecular de los fármacos. El ketoprofeno se disolvió en el componente oleoso antes de preparar la emulsión y el hidroclicloruro de clindamicina se disolvió en el componente acuoso: agua, solución acuosa de alginato o en la mezcla de alginato y cloruro de calcio. La incorporación de ketoprofeno o hidroclicloruro de clindamicina no supuso ninguna alteración macroscópica en la estabilidad de las HIPREs y no se observó ni fluidificación ni separación de fases durante más de 3 meses de estudio.

#### **4.2.2. Caracterización de emulsiones altamente concentradas**

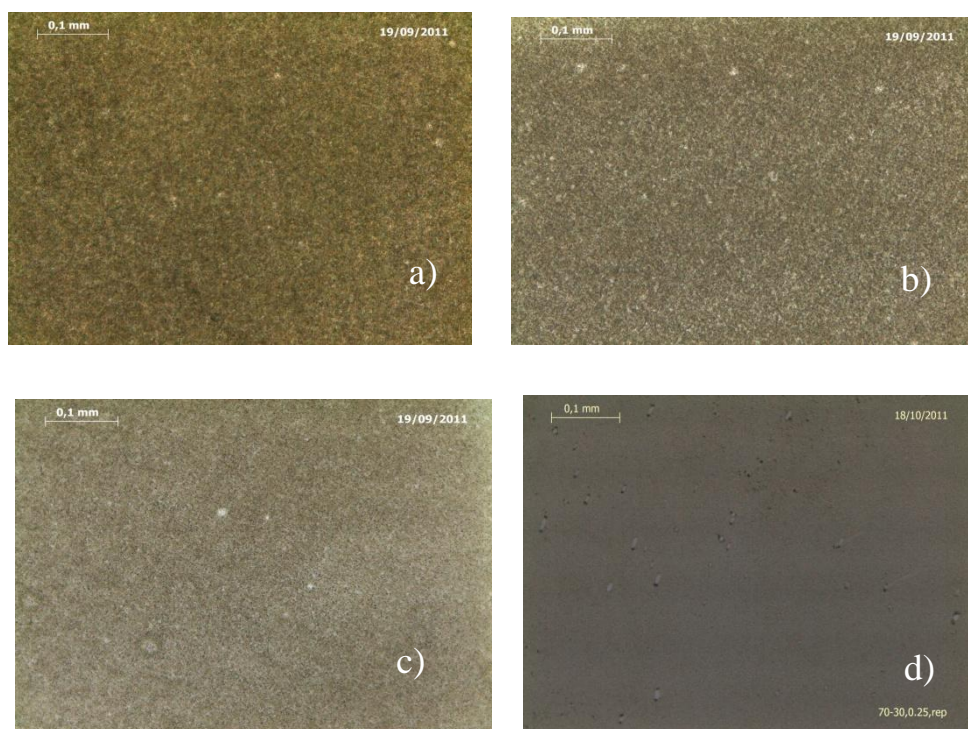
Las emulsiones preparadas se caracterizaron mediante microscopía óptica y electrónica y se estudió su comportamiento reológico. A continuación se detallan los resultados obtenidos con las emulsiones altamente concentradas W/O y O/W.

##### **4.2.2.1. Caracterización de HIPREs W/O**

##### **Caracterización microscópica de HIPREs W/O**

Se ha intentado determinar el tamaño de gotas de HIPREs W/O mediante microscopía óptica. En la Figura 4.7. se observan microfotografías de las emulsiones con una relación O/S 70/30 en peso y un 83% de componente acuoso. En dicha figura se muestran las microfotografías de las HIPREs que contienen agua como componente acuoso (HIPRE HWO6) (a), solución de alginato de sodio al 1% en peso como componente acuoso (HIPRE HWO6A) (b), mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HWO6ac) (c) y mezcla de solución de alginato

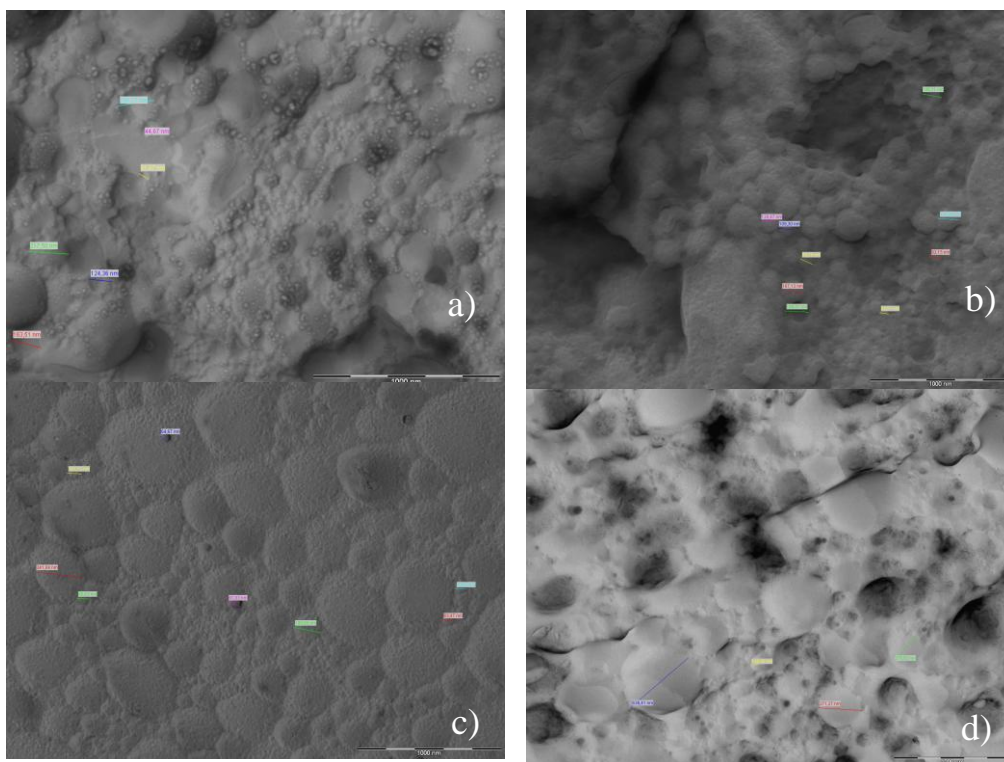
de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso y un 0,25% de ketoprofeno (HIPRE HWO6acK) (d).



*Figura 4.7. Microfotografías de HIPREs W/O que contienen: a) agua como componente acuoso (HIPRE HWO6), b) solución de alginato de sodio al 1% en peso como componente acuoso (HIPRE HWO6A), c) mezcla solución de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HWO6ac) y d) solución de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso y ketoprofeno 0.25% en peso (HIPRE HWO6acK).*

Debido al pequeño tamaño de las gotas de estas emulsiones es difícil su caracterización por microscopía óptica, por lo que se procedió a su caracterización mediante microscopía electrónica, concretamente mediante la técnica de criofractura (crio-SEM). En la Figura 4.8 se observan microfotografías de las mismas emulsiones anteriormente estudiadas mediante microscopía óptica, con una relación O/S 70/30 en peso y un 83% de componente acuoso. En dicha figura se muestran las microfotografías de las HIPREs que contienen agua como componente acuoso (HIPRE HWO6) (a), solución de alginato de sodio al 1% en peso como componente acuoso (HIPRE HWO6A) (b), mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HWO6ac) (c) y mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de

calcio como componente acuoso y un 0,25% de ketoprofeno (HIPRE HWO6acK) (d). En todos los casos se puede observar la estructura de las emulsiones altamente concentradas que se caracteriza por gotas poliédricas polidispersas separadas por una fina capa de fase continua. Las zonas grises que aparecen se deben a los restos de componente oleoso sobre la rejilla del microscopio. Sobre las microfotografías se han indicado los tamaños de algunas gotas, que permiten constatar la elevada polidispersidad característica de dichas emulsiones. La presencia de alginato provoca un cambio en el aspecto microscópico de las emulsiones, pudiéndose observar una suave capa cubriendo las gotas, que disminuye la nitidez de las mismas. En todos los casos los tamaños de gota son inferiores a la micra, oscilando entre decenas de nanómetros hasta más de 600 nm.



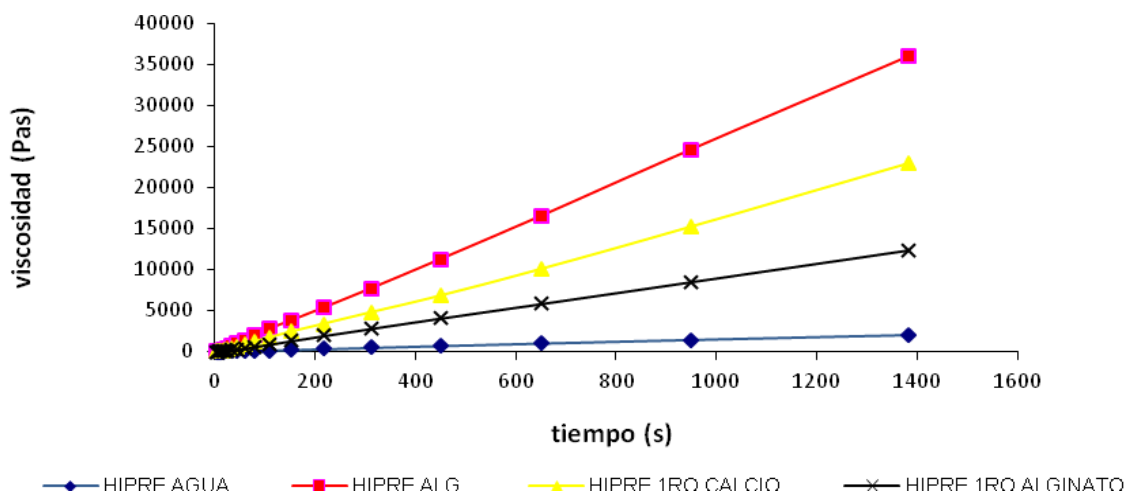
*Figura 4.8. Microfotografías SEM de HIPREs W/O que contienen: a) agua como componente acuoso (HIPRE HWO6), b) solución de alginato de sodio al 1% en peso como componente acuoso (HIPRE HWO6A), c) mezcla solución de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HWO6ac) y d) solución de alginato de sodio y cloruro de calcio como componente acuoso y ketoprofeno 0.25% en peso (HIPRE HWO6acK).*

## Caracterización reológica de HIPREs W/O

Conocer las propiedades reológicas de las emulsiones altamente concentradas es importante para la posterior aplicación de las mismas, pero, además permite interpretar el proceso de reticulación del alginato con cloruro de calcio y la influencia de los componentes en las características físicas de las formulaciones. Las distintas HIPREs preparadas tienen aspecto de gel y se determinó su viscosidad en función del tiempo, para evaluar el efecto que tiene la incorporación de alginato de sodio en la fase acuosa, así como la reticulación del alginato de sodio y cloruro de calcio en diferente orden de adición y así poder relacionarlo posteriormente con los procesos de incorporación y liberación de principios activos. Se estudió el cambio de viscosidad con el tiempo cuando el componente acuoso es una solución de alginato al 1% (HIPRE HWO6A), o una mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio. En este último caso se estudió la influencia en la viscosidad de la HIPRE resultante cuando se cambia el orden de adición del componente acuoso a la mezcla de componente oleoso y tensioactivo: primero se añade la solución de cloruro de calcio y después la solución de alginato de sodio (HIPRE HWO6CA) y al revés (HIPRE HWO6AC). En la Figura 4.9. se muestran las curvas de viscosidad obtenidas en función del tiempo. Los valores de viscosidad más bajos se obtienen para las HIPREs que sólo contienen agua (HIPRE HWO6) en la fase acuosa (línea azul) y los valores más elevados se obtienen con las HIPREs que contienen la solución de alginato al 1% como componente acuoso (línea roja). Las HIPREs con valores intermedios de viscosidad son las que contienen como componente acuoso alginato de sodio y cloruro de calcio, observándose valores de viscosidad más altos cuando se añade primero la solución de cloruro de calcio y a continuación la solución de alginato (línea amarilla) que cuando se incorpora primero la solución de alginato y después la de cloruro de calcio (línea negra). Estos valores indican en primer lugar que el alginato aumenta la viscosidad de las HIPREs, situándose preferentemente en la fase interna debido a su solubilidad. Sin embargo la reticulación del alginato de sodio con cloruro de calcio disminuye los valores de viscosidad con respecto al alginato no reticulado y además el orden de incorporación de los componentes influye en las características del producto final, siendo mayor la



disminución de la viscosidad cuando se añade primero el alginato que el cloruro cálcico, lo que hace suponer que la facilidad de difusión de los iones calcio cuando éstos se incorporan al final del proceso es distinta cuando el orden de incorporación del alginato varía, produciendo diferencias en la homogeneidad de la gelificación.



*Figura 4.9. Cambios de viscosidad en función del tiempo de HIPREs W/O con distintos componentes acuosos y variando el orden de incorporación de la solución de alginato de sodio y de cloruro de calcio.*

Para interpretar mejor los resultados de viscosidad obtenidos con las diferentes HIPREs se determinó el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ). El módulo elástico  $G'$  está relacionado con el cambio de forma que experimenta un material bajo la acción de esfuerzos de cizalla y permite cuantificar el comportamiento reológico de las emulsiones y geles (Ferry, 1980). En la Figura 4.10. se muestran los valores obtenidos para cada HIPRE en función de la frecuencia. Los procesos anteriormente descritos en la Figura 4.9. se consolidan al analizar los módulos elásticos ( $G'$ ) y los módulos viscosos ( $G''$ ) que se presentan en la figura 4.10.

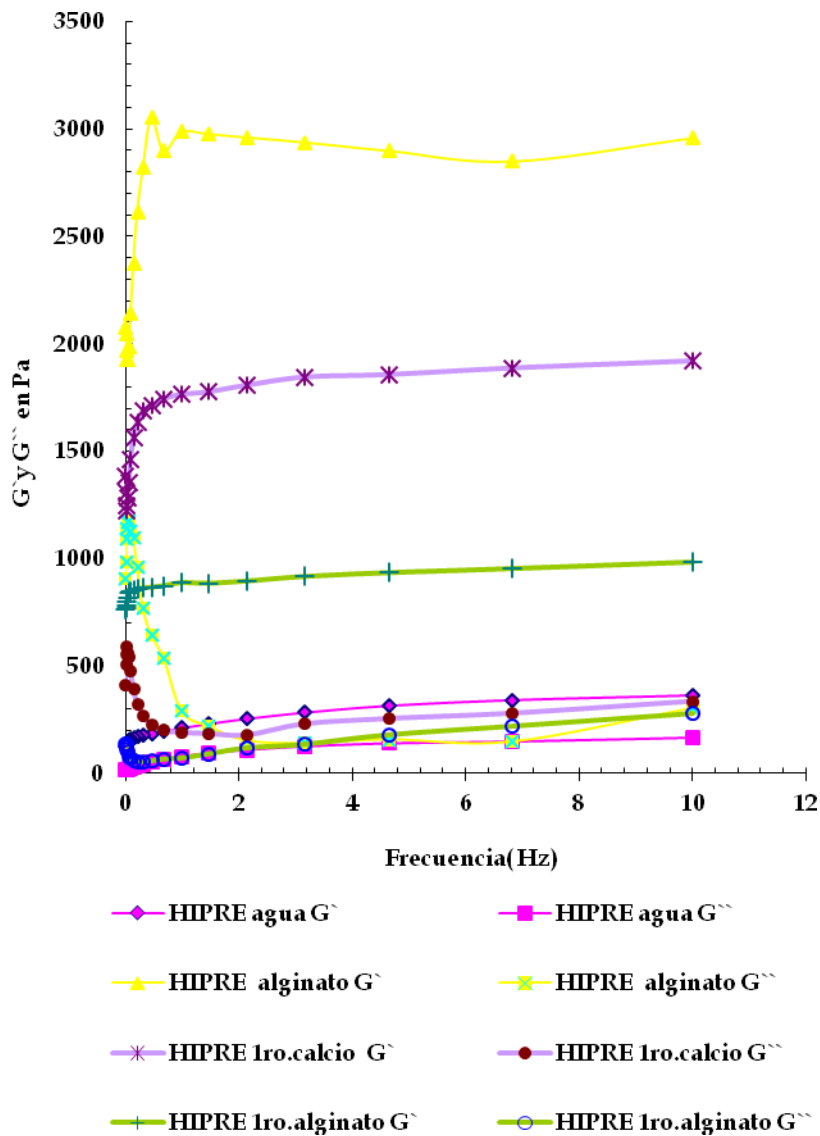


Figura 4.10. Representación del módulo elástico  $G'$  (Pa) y del módulo viscoso  $G''$  (Pa) en función de la frecuencia para HIPREs W/O con distintos componentes acuosos y variando el orden de incorporación de la solución de alginato de sodio y de cloruro de calcio.

En todos los casos el módulo elástico ( $G'$ ) es superior al módulo viscoso ( $G''$ ), observándose una zona de viscoelasticidad lineal similar. Cabe destacar que los valores del módulo viscoso ( $G''$ ) son similares para las cuatro HIPREs (inferiores a 500 Pa), sin observarse diferencias importantes en función de la composición del medio acuoso o del orden de incorporación del alginato de sodio y del cloruro de calcio. Sin embargo, se observan grandes diferencias en el módulo elástico ( $G'$ ), siendo los

valores más bajos para la HIPRE cuyo componente acuoso es agua (HIPRE HWO6) (línea rosa), los valores más elevados (alrededor de 3000 Pa) para la HIPRE cuyo componente acuoso es la solución de alginato al 1% (HIPRE HWO6A) (línea amarilla) y obteniéndose valores intermedios cuando el componente acuoso está constituido por una mezcla de solución de alginato y de cloruro de calcio, observándose los valores más elevados (alrededor de 2000 Pa) cuando se incorpora primero el cloruro de calcio (HIPRE HWO6CA) (línea violeta) que cuando se incorpora primero el alginato (alrededor de 1000 Pa) (HIPRE HWO6AC) (línea verde). Este comportamiento indica que la presencia del cloruro de calcio fluidifica al sistema, en comparación con las HIPREs que contienen sólo alginato, pues las propiedades elásticas propias de los sólidos disminuyen y aumenta ligeramente las propiedades viscosas una característica de los fluidos en general. Por otra parte, una mayor reticulación debería traducirse en un aumento del módulo elástico, tal como se observa con otros polímeros descritos en la bibliografía (Roig, 2013). De ello se deduce que la reticulación es mayor cuando se incorpora primero el cloruro de calcio y después el alginato (valores superiores de  $G'$ ) y la disminución de la viscosidad en relación a las HIPREs que contienen sólo alginato podría atribuirse a un fenómeno de desestabilización de la emulsión provocado por el cloruro de calcio, tal y como se ha podido constatar macroscópicamente en las HIPREs que contenían solución de cloruro de calcio como componente acuoso.

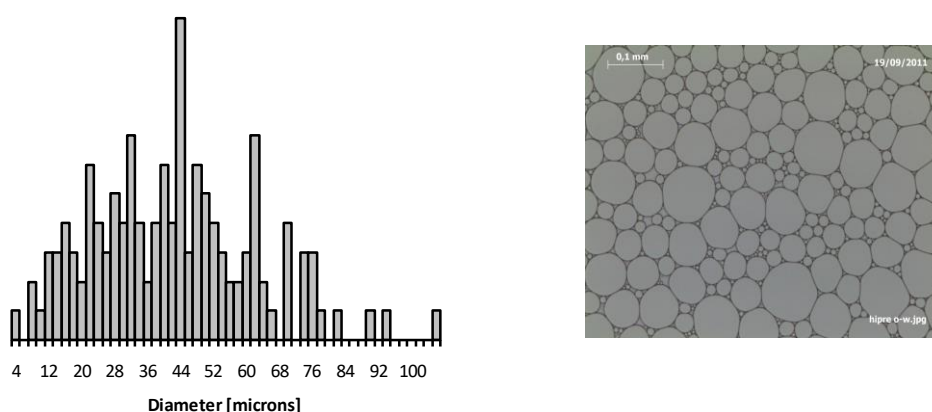
#### **4.2.2.2. Caracterización de HIPREs O/W**

##### **Caracterización microscópica de HIPREs O/W**

Se ha determinado el tamaño de gotas de HIPREs O/W mediante microscopía óptica. El tamaño microscópico de las gotas de dichas emulsiones ha permitido caracterizarlas por microscopía óptica y realizar un estudio de distribución de tamaños de las gotas a partir de las imágenes obtenidas. Cabe destacar que el tamaño de estas HIPREs es considerablemente mayor que el tamaño de las HIPREs W/O descritas en los apartados anteriores, lo que se puede relacionar con una concentración de tensioactivo inferior en las HIPREs O/W (3,4%) con respecto a las HIPREs W/O (5,1%). A continuación se

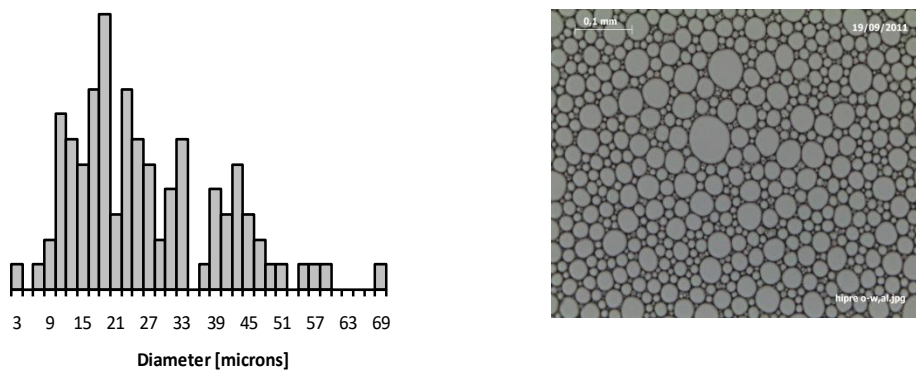
muestran las microfotografías de HIPREs O/W con una relación W/S 80/20 en peso y un 83% de componente oleoso (Miglyol 812), así como los gráficos de distribución de tamaños de gotas. Igual como se ha realizado con las HIPREs W/O se ha variado la composición del componente acuoso, que en las HIPREs O/W constituye la fase externa. En la Figura 4.11. se muestran los resultados de la HIPRE cuyo componente acuoso es agua (HIPRE HOW2), en la Figura 4.12. se muestran los resultados de la HIPRE cuyo componente acuoso es una solución de alginato al 1% en peso (HIPRE HOW2A), la Figura 4.13. corresponde a la HIPRE con un componente acuoso constituido por una solución de cloruro de calcio (HIPRE HOW2C), en la Figura 4.14. se muestran los resultados de una HIPRE cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio (HIPRE HOW2ac) y finalmente, la Figura 4.15. corresponde a una HIPRE con un componente acuoso constituido por la mezcla de alginato y cloruro de sodio a la que se ha incorporado un 1,5% de ketoprofeno en la fase interna (HIPRE HOW2ack).

En la Figura 4.11. se observa la estructura poliédrica característica de las gotas de las HIPREs y una gran polidispersidad. El tamaño medio de las gotas es de 40  $\mu\text{m}$ , observándose gotas de 4  $\mu\text{m}$  y alguna superior a 100  $\mu\text{m}$ , lo que se puede atribuir a la baja concentración de tensioactivo (3,4%) y al método de preparación. El tamaño de gota de esta HIPRE es grande en comparación con otras HIPREs del mismo sistema descritas en la bibliografía (Roig, 2016), que poseen una mayor concentración de tensioactivo (7,5-12,5%).



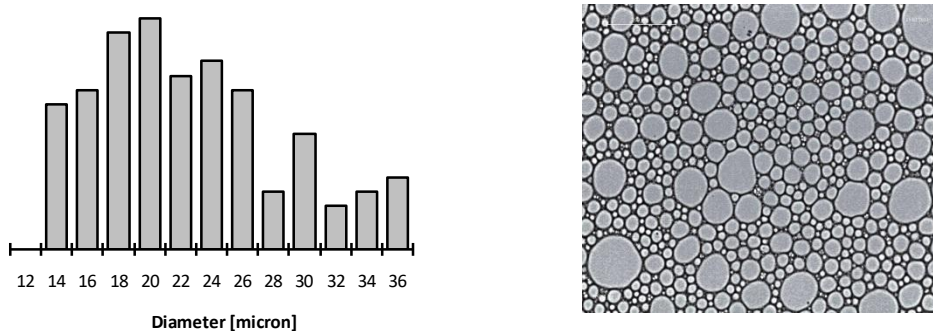
*Figura 4.11. Distribución de tamaños de gota y microfotografía de HIPRE O/W que contiene agua como componente acuoso (HIPRE HOW2). El tamaño de gota promedio es  $40 \pm 12 \mu\text{m}$ .*

La incorporación de una solución de alginato al 1% como fase acuosa se traduce en una disminución del tamaño de gota de la emulsión formada, tal como se observa al analizar la microfotografía de la figura 4.12. siendo el tamaño medio 24  $\mu\text{m}$  y pudiéndose observar gotas pequeñas, de 3  $\mu\text{m}$ , y las gotas más grandes inferiores a 70  $\mu\text{m}$ . Este efecto de disminución de tamaño de gota con respecto a la HIPRE que contiene sólo agua podría atribuirse al aumento de viscosidad producido por el alginato que aumenta la cizalla aun aplicando la misma velocidad y tiempo de agitación.



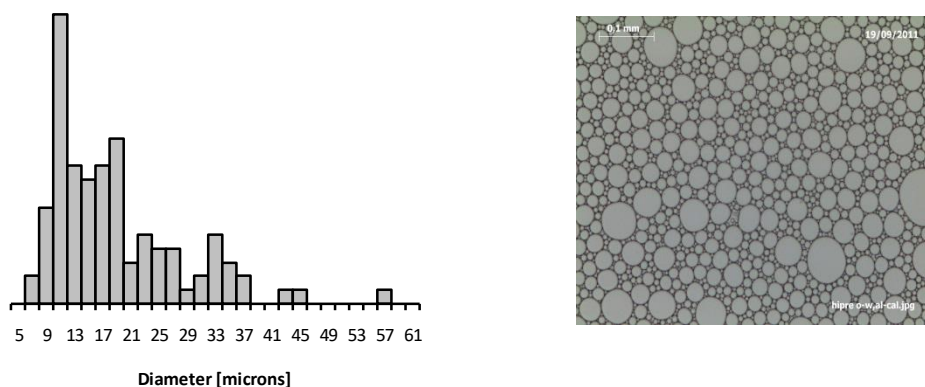
*Figura 4.12. Distribución de tamaños de gota y microfotografía de HIPRE O/W que contiene una solución de alginato de sodio al 1% en peso como componente acuoso (HIPRE HOW2A). El tamaño de gota promedio es  $24 \pm 9 \mu\text{m}$ .*

La incorporación de una solución de cloruro de calcio como componente acuoso también supone una disminución del tamaño de gota con respecto a la HIPRE que contenía sólo agua, tal como se muestra en la Figura 4.13. El tamaño promedio de las gotas de la HIPRE es 22  $\mu\text{m}$  y disminuye ligeramente la polidispersidad, pudiéndose observar gotas de un tamaño que oscila entre las 12 y las 36 micras.



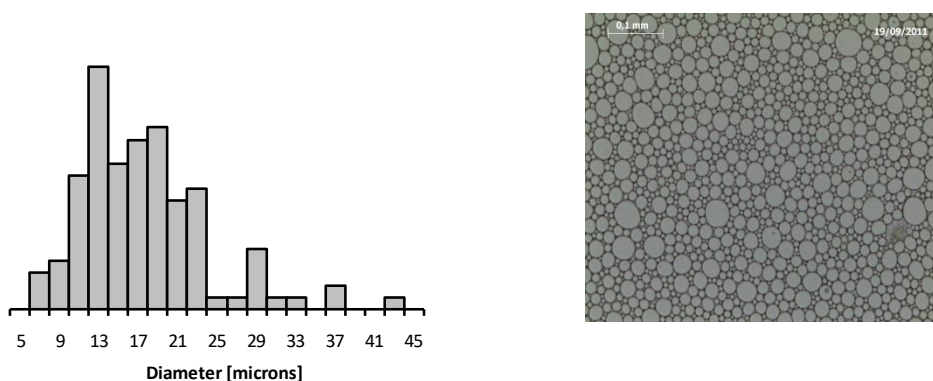
*Figura 4.13. Distribución de tamaños de gota y microfotografía de HIPRE O/W que contiene una solución de cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HOW2C). El tamaño de gota promedio es  $22 \pm 6 \mu\text{m}$ .*

La reticulación de la fase externa producida por la mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio supone una mayor disminución del tamaño de las gotas probablemente por un aumento de la estabilidad. En la Figura 4.14. se observa la distribución de los tamaños de gota y el aspecto microscópico de la HIPRE. El tamaño medio es de 15  $\mu\text{m}$ , con gotas desde 5 hasta 50  $\mu\text{m}$  aproximadamente.



*Figura 4.14. Distribución de tamaños de gota y microfotografía de HIPRE O/W que contiene una mezcla de solución de alginato de sodio y de cloruro de calcio como componente acuoso (HIPRE HOW2ac). El tamaño de gota promedio es  $15\pm 5\mu\text{m}$ .*

Por último, la incorporación de un principio activo lipófilo como el ketoprofeno en la fase interna de la HIPRE anterior no supone ninguna variación significativa en el tamaño de las gotas, tal y como se observa en la Figura 4.15. El valor de tamaño promedio es de 15  $\mu\text{m}$ , con diámetros que oscilan entre 5 y 45  $\mu\text{m}$ .



*Figura 4.15. Distribución de tamaños de gota y microfotografía de HIPRE O/W que contiene una mezcla de solución de alginato de sodio y de cloruro de calcio como componente acuoso y un 1,5% de ketoprofeno (HIPRE HOW2ack). El tamaño de gota promedio es  $16\pm 4\mu\text{m}$ .*

## **Caracterización reológica de HIPREs O/W**

Se realizó un estudio reológico de las HIPREs O/W para poder interpretar la influencia de los componentes de la fase externa. En la figura 4.16. se indican los valores de viscosidad en función del tiempo de una HIPRE cuyo componente acuoso es agua y otra HIPRE cuyo componente acuoso es la mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio. No se efectuaron estudios sobre el orden de incorporación de los componentes acuosos debido a la baja proporción de los mismos. Las diferencias de viscosidad entre ambas emulsiones son mínimas (líneas rojas en la Figura 4.16) en comparación con las grandes diferencias observadas en las HIPREs W/O, donde la incorporación de alginato o de las mezclas de alginato de sodio y cloruro de calcio suponía un incremento en la viscosidad. La concentración de dichos componentes (muy inferior en las HIPREs O/W que en las HIPREs W/O) y la localización de los mismos en la fase interna (HIPREs W/O) o en la fase externa (HIPREs O/W) parece determinante para explicar su comportamiento reológico. También cabe destacar que la viscosidad de las HIPREs O/W es muy inferior a la de las HIPREs W/O como se puede ver en la figura 4.16, en la cual se observa que los valores de viscosidad de las ambos tipos de emulsiones cuando solo contiene agua no difieren mucho y están en alrededor de 150 a 250 Pa.s pero cuando se añade alginato de sodio en solución y se mezcla con solución de cloruro de calcio, la viscosidad de las emulsiones W/O aumenta considerablemente de valores que van de los 250 Pa.s para las HIPREs W/O que solo contienen agua hasta alrededor de los 1300 a los 2400 para aquellas HIPREs W/O con mezcla de alginato de sodio y cloruro de calcio en solución.

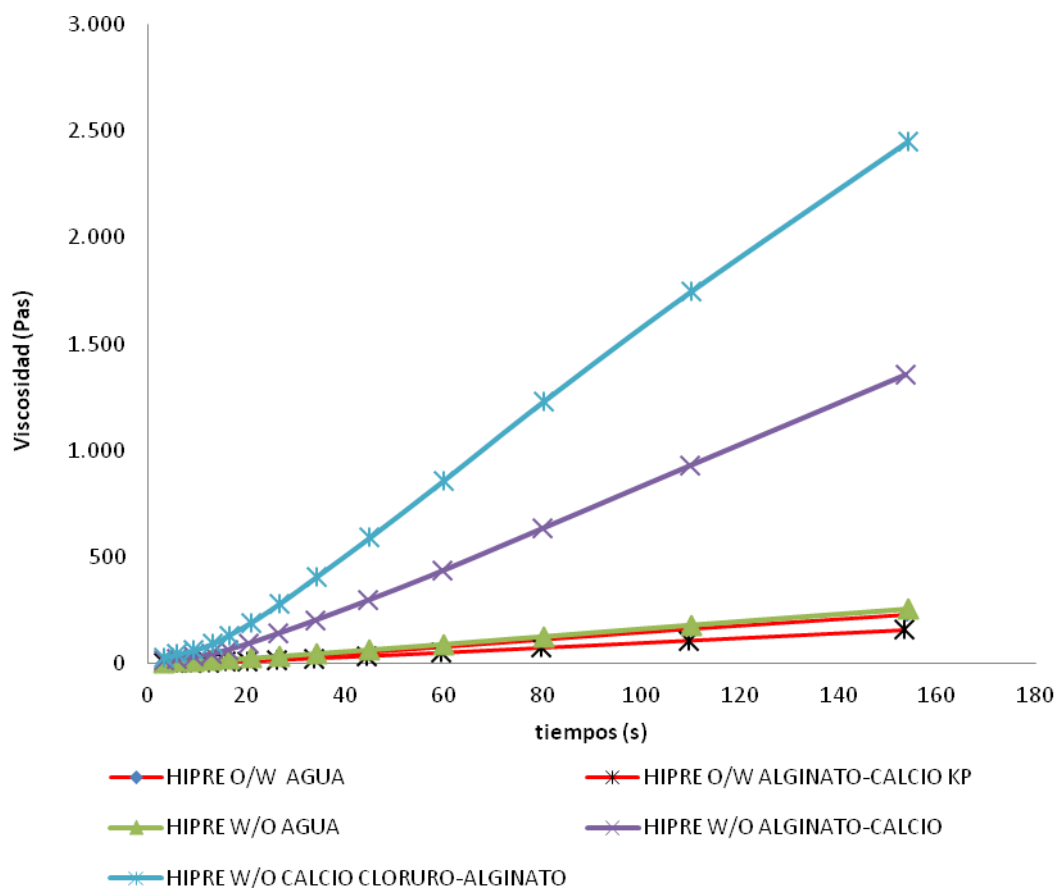


Figura 4.16. Cambios de viscosidad en función del tiempo de HIPREs O/W comparadas con HIPREs W/O con distintos componentes acuosos.

Como resumen de la formación y caracterización de las HIPREs W/O y O/W con distintos componentes acuosos se llega a las siguientes conclusiones:

Las HIPREs W/O estudiadas tienen tamaño nanométrico mientras que las HIPREs O/W tienen tamaño micrométrico. Este hecho se puede justificar por la menor concentración de tensioactivo que tienen las HIPREs O/W.

La incorporación de cloruro de calcio a las HIPREs W/O supone una desestabilización de las mismas.

La viscosidad máxima de las HIPREs W/O se obtiene cuando el componente acuoso es una solución de alginato de sodio y se logra una mayor viscosidad cuando se incorpora primero solución de cloruro de calcio y después solución de alginato que cuando el



orden de incorporación de ambos componentes es inverso. Probablemente, la reticulación del alginato en un medio compartimentalizado como son las HIPREs W/O tiene lugar con mayor facilidad en uno de los dos procedimientos.

La incorporación de alginato de sodio y cloruro de calcio a las HIPREs O/W supone una disminución del tamaño de partícula. El efecto en la viscosidad de la emulsión no es tan notable como en las HIPREs W/O debido a la baja proporción del componente acuoso que constituye la fase externa.

### **4.2.3. Estudios de liberación de fármacos desde emulsiones altamente concentradas**

Se ha estudiado la difusión de dos principios activos, ketoprofeno y clorhidrato de clindamicina, desde emulsiones altamente concentradas W/O y O/W con diferentes componentes acuosos, con el objetivo de evaluar la posible influencia del alginato en las cinéticas de liberación y conseguir una liberación controlada de los principios activos. Los estudios se han llevado a cabo mediante un sistema basado en bolsas de diálisis de acetato de celulosa que contenían las formulaciones y estaban sumergidas en un medio receptor bajo agitación moderada y a temperatura constante, tal como se ha descrito en el apartado 3.3.6. de la parte experimental.

La elección de los principios activos se debe a sus propiedades físico-químicas (peso molecular y solubilidad) y al interés terapéutico para desarrollar formas farmacéuticas de liberación controlada. Tal como se ha indicado en la parte experimental, el ketoprofeno tiene un peso molecular de  $254 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y es prácticamente insoluble en agua, alrededor de  $0,01 \text{ mg/mL}$  (Sweetman, 2011). En cambio, el clorhidrato de clindamicina tiene un peso molecular de  $461 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  y es fácilmente soluble en agua, siendo su solubilidad  $645,5 \text{ mg/mL}$  (Calderó, 2010). Los pesos moleculares de ambos principios activos permiten su paso a través de las membranas utilizadas en los ensayos, con un MWCO de 12000 a 14000 Da. Dichas membranas son de acetato de celulosa, que es un material hidrófilo no iónico e inerte, que no ofrece dificultades al

paso de los principios activos seleccionados. Las solubilidades de los dos principios activos son adecuadas para efectuar un estudio comparativo de su difusión al ser incorporados en la fase interna o en la fase externa de las emulsiones altamente concentradas. Ambos principios activos, debido a su estructura química, absorben la luz ultravioleta lo que permite su detección y cuantificación en el medio receptor mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y/o espectrofotometría UV-visible.

Los ensayos de difusión se realizaron durante periodos de tiempo que oscilaron desde un mínimo de 6 horas hasta un máximo de 25 horas. La solución receptora seleccionada para los estudios de liberación fue una solución reguladora de fosfatos (PBS) con un pH de 7,4 ya que se cumplían condiciones *sink* para las concentraciones de principio activo en las formulaciones seleccionadas, es decir, la concentración final de principio activo en la solución receptora nunca sobrepasó el 10-20% de la concentración a saturación (Hanson, 1989; Guy, 1989). El cumplimiento de las condiciones *sink* garantiza que el proceso de difusión no está ralentizado o impedido por la saturación del principio activo en el medio de difusión. El ketoprofeno es prácticamente insoluble en agua pero debido a que su pKa es 4,0, su solubilidad aumenta considerablemente a pH básico, alcanzando valores de 4 mg/mL en PBS 7,4 (Avdeef, 2000). El pKa del clorhidrato de clindamicina es 7,7 (Harvey, 1980), que es un valor próximo al pH de la solución receptora por lo que no se prevé ningún tipo de limitación en la difusión debido a la elevada solubilidad de dicho principio activo.

Se estudió la liberación de ketoprofeno y de clorhidrato de clindamicina desde HIPRES con distintos componentes acuosos (agua, solución de alginato sódico y solución de alginato sódico reticulado con cloruro de calcio) y a efectos comparativos también se estudió la difusión desde soluciones de ketoprofeno en PBS y en Miglyol 812, así como desde un hidrogel comercial que contenía un 2,5% de ketoprofeno. Las formulaciones seleccionadas se detallan en la tabla 4.4. Seguidamente se describen y discuten los resultados obtenidos.

Tabla 4.4. Composición de las formulaciones estudiadas en los ensayos de liberación de principios activos

Formulaciones		O/S	W/S	Componente acuoso			Principios activos	
				Agua %	Alginato sódico %	CaCl <sub>2</sub> %	Keto %	Clinda %
HIPRES W/O	HWO6K	70/30	-	83	-	-	0,25	-
	HWO6AK				1	-	0,25	-
	HWO6CAK				1	0,015	0,25	-
	HWO6ACK				1	0,015	0,25	-
	HWO6acK				1	0,015	0,25	-
	HWO6Clin				-	-	-	0,25
	HWO6AClin				1	-	-	0,25
	HWO6acClin				1	0,015	-	0,25
HIPRES O/W	HOW2K	-	80/20	13,60	-	-	1,5	-
	HOW2acK				1	0,015	1,5	-
	HOW2Clin				-	-	-	1,5
	HOW2AClin				1	-	-	1,5
	HOW2acClin				1	0,015	-	1,5
Soluciones	Keto PBS				-	-	0,4	-
	Keto PBS				-	-	0,25	-
	Keto Miglyol				-	-	1,5	-
Gel comercial	Fastum gel®				-	-	2,5	-

\*Todos los porcentajes indicados son peso/peso

#### 4.2.3.1. Estudios de liberación de ketoprofeno

##### Estudios de liberación de ketoprofeno desde HIPRES W/O

En primer lugar, para asegurar que el principio activo no sufría retención en la membrana de acetato de celulosa utilizada, se estudió la difusión de una solución de ketoprofeno en PBS a una solución receptora de PBS. La concentración de fármaco escogida fue el 0,4% en peso, que era una concentración inferior al valor de solubilidad máxima de dicho principio activo en PBS (4,18 mg/ml). En la Tabla 4.5. se indican los

porcentajes de difusión obtenidos en los tres replicados realizados y en la Figura 4.17. se muestra el perfil de difusión obtenido al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

Tabla 4.5. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, a partir de una solución donadora de ketoprofeno (0,4% p/p) en PBS.

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	7.6	7.7	6.5	7.3	0.7
10	19.5	21.8	20.1	20.4	1.2
20	35.1	38.4	37.7	37.1	1.7
35	56.0	60.2	59.7	58.6	2.3
50	69.7	73.6	73.0	72.1	2.1
60	74.2	77.5	77.1	76.3	1.8
90	87.7	89.3	90.2	89.1	1.3
150	98.6	99.5	98.9	99.0	0.4
210	102.3	101.1	101.5	101.6	0.6

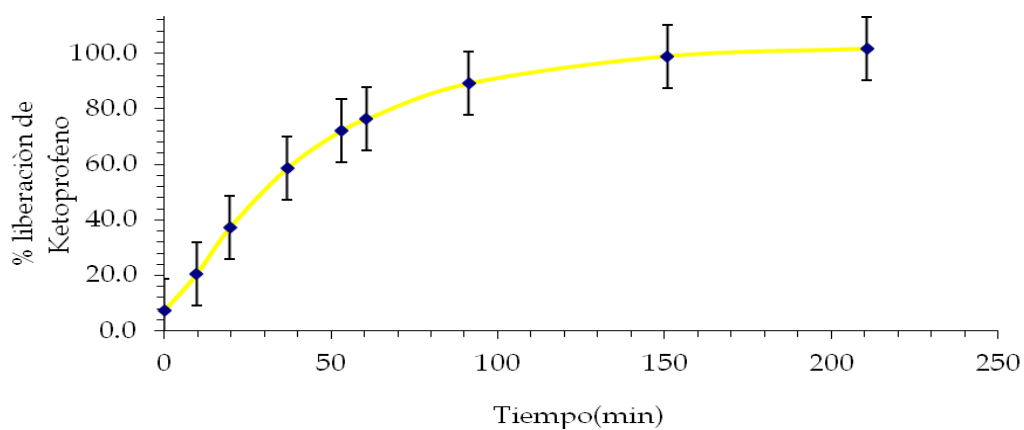


Figura 4.17. Perfil de difusión de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una solución de ketoprofeno al 0.4% p/p en PBS.

El perfil observado muestra una ligera retención por efecto de la membrana que, sin embargo, permite la total liberación del principio activo después de 3 horas aproximadamente. Los resultados se corresponden con un perfil típico de difusión a partir de soluciones, con una rápida liberación en las primeras horas (*burst release*).

Una vez conocido el perfil de difusión del ketoprofeno desde una solución de PBS, se iniciaron los estudios de liberación a partir de HIPREs W/O. Se seleccionaron tres HIPREs: HWO6K, HWO6AK y HWO6acK. En estas HIPREs, el contenido en fase acuosa es elevado, 83% y la relación entre el tensioactivo (Cremophor WO7) y el componente oleoso (parafina líquida) es 70/30 en peso. Las diferencias entre las tres emulsiones radican en el componente acuoso que constituye la fase interna: en HWO6K el componente acuoso es agua, en HWO6AK el componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% en peso y en HWO6acK el componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y de solución de cloruro de calcio al 0,015%, de forma que las cadenas de alginato se encuentran reticuladas físicamente mediante los iones calcio.

El ketoprofeno es prácticamente insoluble en agua (0,001%), muy ligeramente soluble en una solución de alginato al 1% (0,07%), muy ligeramente soluble en una solución de alginato al 1% y cloruro de calcio al 0,015% (0.049%), muy ligeramente soluble en parafina líquida (<0,04%); sin embargo es más soluble en la mezcla de parafina líquida y Cremophor WO7 (70:30) (1,8%). La concentración de ketoprofeno es el 0,25% del total de la emulsión, y se estima que estará preferentemente localizado en las interfases.

En las Tablas 4.6., 4.7. y 4.8. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados realizados para cada una de las HIPREs estudiadas y en las Figuras 4.18., 4.19. y 4.20. se muestran los perfiles de liberación obtenidos al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

Tabla 4.6. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es agua (HWO6K).

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	6.9	7.2	6.9	7.0	0.2
5	13.3	14.3	13.1	13.6	0.6
15	20.5	21.3	20.0	20.6	0.7
30	27.8	29.4	27.2	28.1	1.2
60	37.2	38.9	36.7	37.6	1.2
150	52.5	54.5	52.5	53.2	1.1
210	60.8	61.7	60.0	60.8	0.9
330	72.4	74.1	73.1	73.2	0.9
1380	96.6	95.6	95.6	95.9	0.5

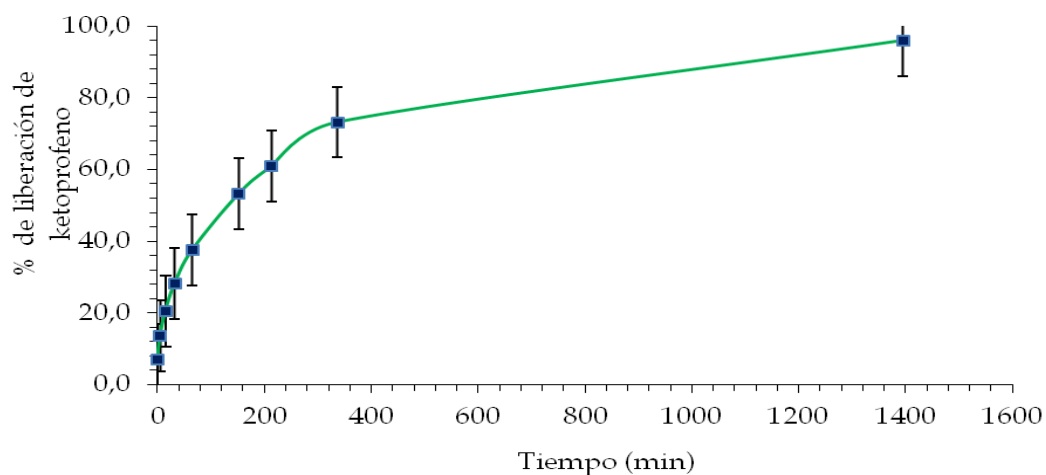


Figura 4.18. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es agua (HWO6K).

Tabla 4.7. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HWO6AK).

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	3.1	4.7	5.0	4.3	1.0
5	9.3	10.5	10.3	10.0	0.6
15	16.1	17.7	16.5	16.8	0.9
30	22.8	24.4	22.0	23.1	1.2
60	30.2	32.5	29.4	30.7	1.6
160	44.3	46.3	42.7	44.4	1.8
240	53.8	55.6	52.0	53.8	1.8
330	64.1	65.8	61.2	63.7	2.3
1380	92.0	92.6	90.7	91.8	0.9

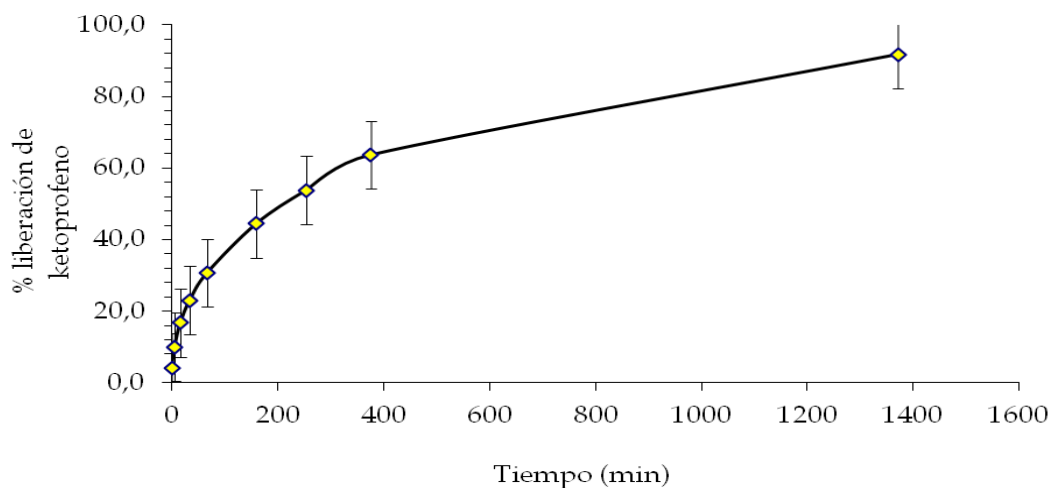


Figura 4.19. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HWO6AK).

Tabla 4.8. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HWO6ack).

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	5.7	6.4	5.6	5.9	0.4
5	10.7	11.4	9.6	10.6	0.9
15	16.8	17.4	14.3	16.2	1.7
30	22.2	23.4	18.9	21.5	2.3
60	29.1	30.8	25.0	28.3	3.0
120	38.6	41.1	33.2	37.7	4.0
190	46.7	50.0	37.8	44.8	6.3
330	55.8	59.7	48.7	54.7	5.6
1320	81.4	86.2	69.3	79.0	8.7

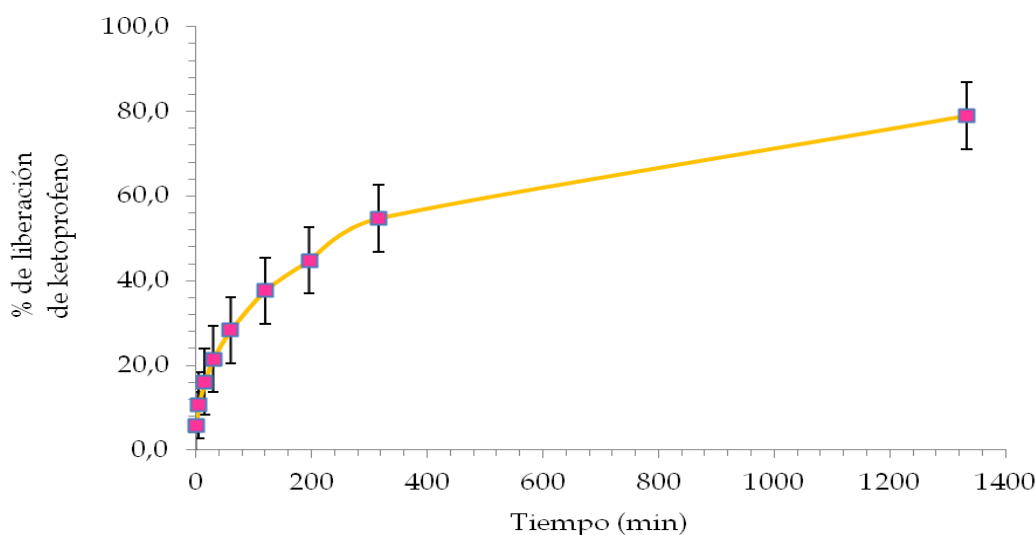


Figura 4.20. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HWO6ack).

El estudio comparativo de los resultados de liberación de ketoprofeno desde las tres HIPREs estudiadas, en comparación con la solución del principio activo en PBS permite observar una mayor retención del ketoprofeno cuando está en un medio altamente compartimentalizado como son las emulsiones altamente concentradas que cuando está en solución. En solución se alcanzaba el 100% de difusión al medio receptor transcurridas 3 horas, sin embargo, desde las HIPREs no se ha alcanzado este



porcentaje de liberación después de 22-24 horas. Comparando los tres tipos de HIPREs estudiados, con diferente composición en la fase interna, se observa una liberación más rápida del ketoprofeno cuando el componente acuoso es agua que cuando es alginato o alginato reticulado con calcio. Si se comparan los resultados de liberación a los 60 minutos, en la HIPRE que contiene agua es de  $37,6\% \pm 1,2$ , en la que contiene alginato es  $30,7\% \pm 1,6$  y en la que contiene alginato reticulado  $28,3\% \pm 3,0$ . De igual manera, si se comparan los resultados transcurridas 3,5 horas (330 minutos), en la HIPRE que contiene agua se alcanza un  $73,2\% \pm 0,9$ , en la que contiene alginato un  $63,7\% \pm 2,3$  y en la que contiene alginato reticulado un  $54,7\% \pm 5,6$ . Estos resultados contrastan con el 100% de difusión de la solución acuosa transcurridas 3 horas. Por otra parte, se observa una mayor retención del ketoprofeno cuando la fase interna es alginato o alginato reticulado en comparación con las HIPREs cuyo componente acuoso es agua. La solubilidad del ketoprofeno en agua es menor que en la solución de alginato y alginato reticulado. Estudios previos de difusión de principios activos a partir de emulsiones altamente concentradas (Llinàs 2013) han mostrado que la solubilidad del principio activo en la fase interna es responsable de la retención del mismo en la emulsión. Este hecho podría explicar la mayor liberación desde las emulsiones cuya fase interna es agua, sin embargo no explica la mayor retención cuando la fase interna es alginato reticulado, ya que el ketoprofeno es más soluble en este medio que en una solución de alginato.

Las diferencias observadas en cuanto a la liberación del ketoprofeno también se puede relacionar con el aumento de viscosidad de estas emulsiones que puede condicionar la liberación del principio activo o que parte del principio activo, aun siendo poco soluble en agua, quede retenido en la matriz de alginato. Cabe destacar que la viscosidad de las HIPREs W/O que contienen sólo agua es menor que la de las HIPREs que contienen alginato y alginato reticulado. Asimismo, la viscosidad de las HIPREs que contienen alginato es ligeramente superior a la de las HIPREs que contienen la mezcla de alginato sódico y cloruro de calcio, en cambio, la liberación en estas últimas es más lenta, lo que sugiere una mayor retención del principio activo en el alginato reticulado. Este efecto también podría relacionarse con una interacción del ketoprofeno parcialmente ionizado con los iones calcio de la matriz polimérica.

A la vista de los resultados obtenidos y observando las diferencias en los porcentajes de liberación de principio activo cuando en la fase interna había alginato de sodio y cloruro de calcio, se estudió la liberación de ketoprofeno desde dos HIPREs que contenían las dos soluciones, pero variando el orden de incorporación en la preparación de la emulsión. Se estudió la HIPRE HWO6CAK, en la que primero se incorporaba la solución de cloruro de calcio y después la solución de alginato y la HIPRE HWO6ACK en la que se incorporaba primero la solución de alginato y después la solución de cloruro de calcio. Los resultados de liberación de ketoprofeno se muestran en la Figura 4.21. y en las tablas 4.9 y 4.10 se tiene los resultados de la liberación.

*Tabla 4.9. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015%. Se ha añadido primero la solución de cloruro de calcio al 0,015% y luego solución de alginato de sodio al 1% (HIPRE HWO6CAK).*

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	2,8	2,4	1,1	2,1	0,9
5	7,4	7,1	5,4	6,6	1,1
15	12,6	11,7	10,5	11,6	1,1
30	16,9	16,0	14,5	15,8	1,2
60	23,4	22,1	20,1	21,8	1,7
120	30,9	29,8	27,3	29,3	1,8
200	38,3	36,4	33,3	36,0	2,5
330	45,2	43,6	40,0	43,0	2,7
1440	68,2	68,4	62,6	66,4	3,3
1590	68,6	69,9	63,8	67,4	3,2
1680	69,8	71,2	64,9	68,6	3,3

Tabla 4.10. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015%. Se ha añadido primero la solución de alginato de sodio al 1% y después la solución de cloruro de calcio al 0,015% (HIPRE HWO6ACK).

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	5,7	6,4	5,6	5,9	0,4
5	10,7	11,4	9,6	10,6	0,9
15	16,8	17,4	14,3	16,2	1,7
30	22,2	23,4	18,9	21,5	2,3
60	29,1	30,8	25,0	28,3	3,0
120	38,6	41,1	33,2	37,7	4,0
200	46,7	50,0	37,8	44,8	6,3
315	55,8	59,7	48,7	54,7	5,6
1320	81,4	86,2	69,3	79,0	8,7

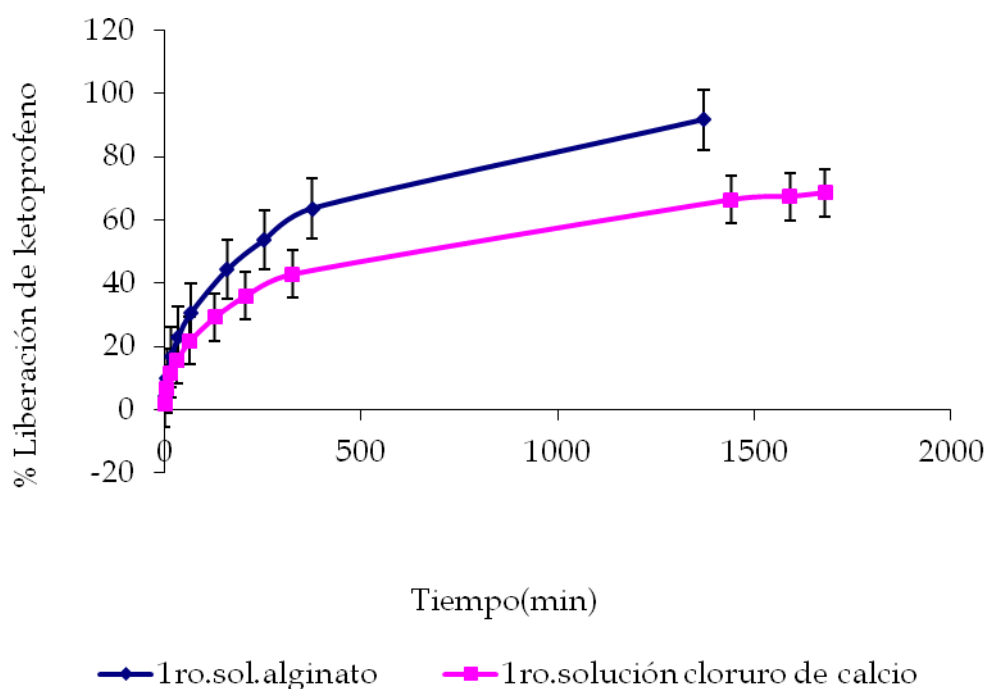


Figura 4.21. Perfiles de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde dos HIPREs en las que se ha variado el orden de incorporación de la solución de alginato de sodio y la solución de cloruro de calcio: HIPRE HWO6ACK (1ro.sol.alginato) e HIPRE HWO6CAK (1ro. solución cloruro de calcio).

En los resultados obtenidos cabe destacar la mayor retención de ketoprofeno cuando se ha incorporado en primer lugar la solución de cloruro de calcio que la solución de alginato (HWO6CA). Si se relacionan estos resultados de liberación con los estudios de viscosidad de estas emulsiones (Figuras 4.9. y 4.10.) se observa que las HIPREs en las que se había incorporado primero la solución de cloruro de calcio (HWO6CA) mostraban una viscosidad claramente superior a las HIPREs en las que se había incorporado primero el alginato (HWO6AC), sin embargo, la mayor viscosidad se observaba en las HIPREs que contenían sólo alginato (HWO6A); en cambio, la mayor retención de ketoprofeno se observa en las HIPREs en las que se ha incorporado primero el cloruro de calcio ((HWO6CA). De estas observaciones se deduce que la mejor reticulación se obtiene cuando se añade primero el cloruro de calcio y este efecto causa una retención mayor del ketoprofeno, incluso más evidente que el efecto de la mayor viscosidad producido por el alginato.

Con la finalidad de comparar los resultados de liberación a partir de emulsiones altamente concentradas con un gel comercial hidroalcohólico polimérico basado en acrilatos y que contiene un 2,5% de ketoprofeno (Fastum gel®), se estudió la liberación del principio activo desde dicho gel a una solución receptora de PBS. En la Tabla 4.11. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados realizados para dicho gel comercial y en la Figura 4.22 se muestra el perfil de liberación obtenido al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

*Tabla 4.11. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde un gel comercial (Fastum gel®).*

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	6.3	6.9	5.5	6.2	0.7
10	11.9	13.1	11.3	12.1	0.9
20	18.4	20.1	19.0	19.2	0.9
30	25.8	28.0	26.8	26.9	1.1
60	39.1	42.2	41.5	40.9	1.6
120	57.1	62.3	63.3	60.9	3.3
180	66.5	73.8	75.9	72.1	5.0
240	70.4	78.9	81.9	77.1	6.0
300	72.2	81.5	84.6	79.4	6.5
400	73.1	82.8	86.3	80.7	6.9

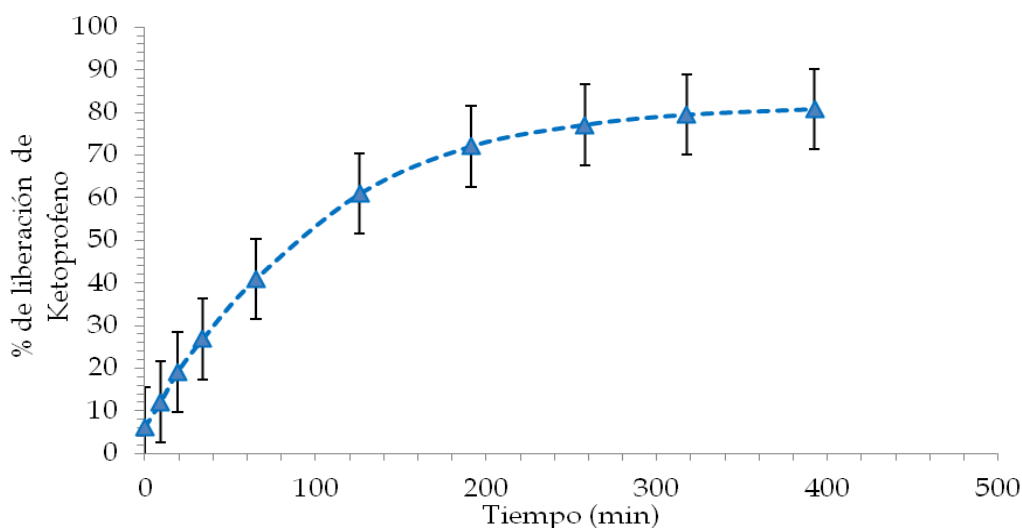


Figura 4.22. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde un gel comercial (Fastum gel®).

Cabe destacar una mayor retención del ketoprofeno en el gel comercial en comparación con la solución acuosa de ketoprofeno en PBS, ya que a los 60 minutos se ha liberado un  $40,9\% \pm 1,6$  desde el gel en comparación con el  $76,3\% \pm 1,8$  desde la solución de PBS y a las 3 horas se consigue la total difusión desde la solución frente al  $72,1\% \pm 5,0$  del gel. La liberación de ketoprofeno desde el gel comercial es más rápida que desde las HIPREs estudiadas; a las 3 horas, la liberación de principio activo desde las HIPREs es alrededor del 40-50%. Sin embargo, no se alcanza la total liberación de fármaco desde el gel comercial y a las 6 horas el porcentaje liberado es inferior al 90%. La pendiente de la curva tiende a mantenerse constante lo que indica que el porcentaje de liberación no aumentará posteriormente de manera marcada.

A modo de resumen, en la Figura 4.23 se han representado los perfiles de liberación de una solución al 0,25% de ketoprofeno en PBS, de un gel comercial (Fastum gel®), de una HIPRE cuyo componente acuoso es agua (HIPRE HWO6K), una HIPRE cuyo componente acuoso es una solución de alginato al 1% (HIPRE HWO6AK), de una HIPRE cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio elaborada previamente a la preparación de la emulsión (HIPRE HWO6acK) y de una HIPRE que contiene como componente acuoso una solución de cloruro de calcio incorporada a la emulsión con anterioridad a la solución de alginato de sodio (HIPRE HWO6CAK).

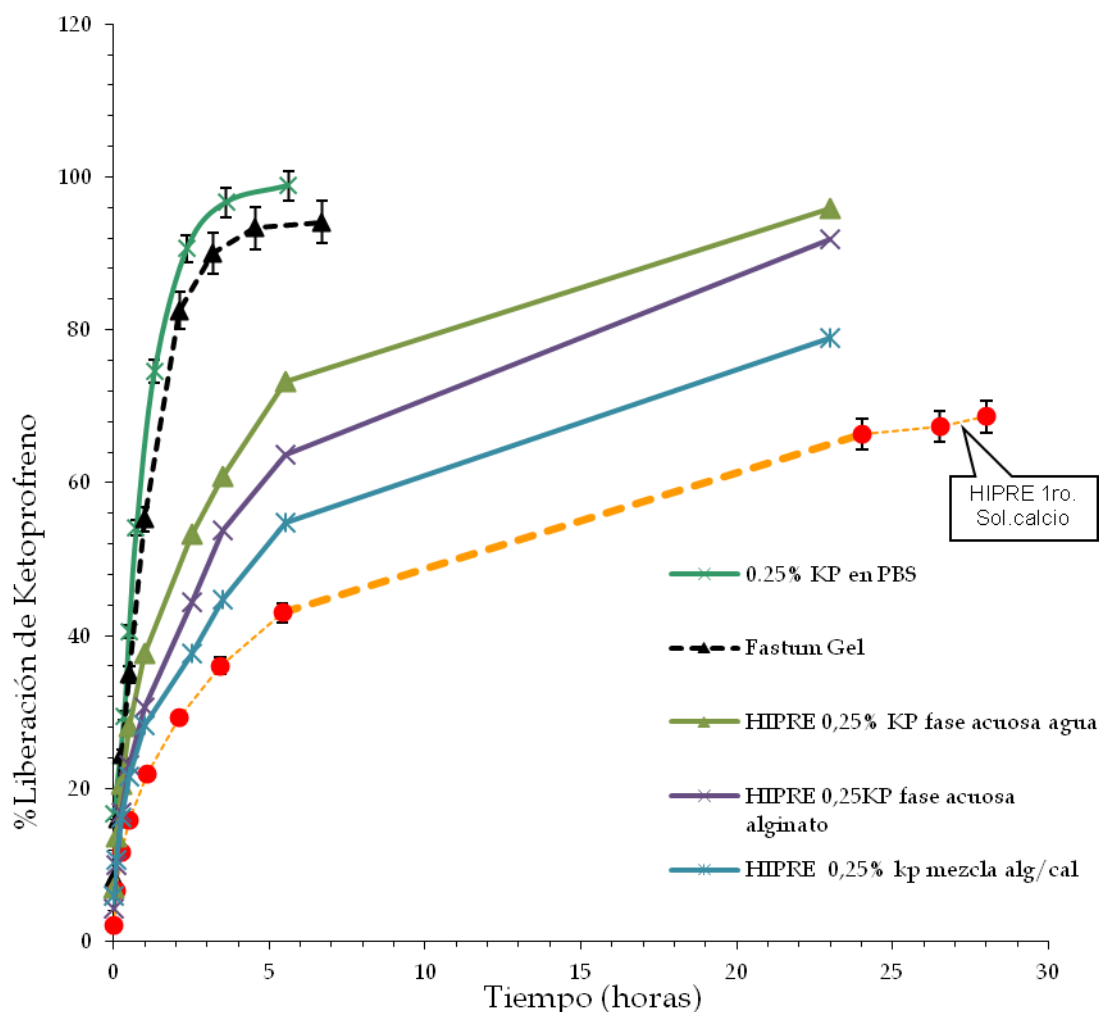


Figura 4.23. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una solución al 0,25% de ketoprofeno en PBS, un gel comercial (Fastum gel®), una HIPRE cuyo componente acuoso es agua (HIPRE HWO6K), una HIPRE cuyo componente acuoso es una solución de alginato al 1% (HIPRE HWO6AK), una HIPRE cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio elaborada previamente a la preparación de la emulsión (HIPRE HWO6acK) y de una HIPRE que contiene como componente acuoso una solución de cloruro de calcio incorporada a la emulsión con anterioridad a la solución de alginato de sodio (HIPRE HWO6CAK).

En la Figura 4.23 se observa claramente la posibilidad de controlar la liberación del ketoprofeno cuando se incorpora en emulsiones altamente concentradas W/O, en comparación con una solución de ketoprofeno o un hidrogel comercial, especialmente cuando se incorpora alginato en la fase interna y también se observa la mayor retención de ketoprofeno lograda cuando el componente acuoso de la HIPRE es el

alginato reticulado con cloruro de calcio, cuando se ha incorporado en primer lugar el cloruro de calcio y en segundo lugar el alginato. Asimismo y del mismo modo que en estudios previos realizados con otros sistemas y otros principios activos, se constata la eficacia de los estudios de liberación de principio activo para interpretar las propiedades de sistemas micro y nanoestructurados y diseñar formas de liberación controlada.

### **Estudios de liberación de ketoprofeno desde HIPREs O/W**

Para estudiar la liberación de ketoprofeno desde emulsiones altamente concentradas O/W se seleccionaron dos HIPREs: una de ellas contenía únicamente agua como componente acuoso (HIPRE HOW2K) mientras que la otra contenía la mezcla de soluciones de alginato de sodio y de cloruro de calcio preparadas con anterioridad a la formación de la emulsión. El medio receptor fue solución de PBS a pH 7,4 como en los estudios descritos anteriormente. Cabe destacar que las HIPREs O/W seleccionadas contenían un 83% de componente oleoso (Miglyol 812) y por ello, la concentración de componente acuoso era sólo el 13,6%, por lo que la influencia de la composición de la fase acuosa se estima que será menor que en las HIPREs W/O estudiadas anteriormente, en las que la concentración del componente acuoso era el 83%. También cabe destacar las diferencias en cuanto a la naturaleza y concentración del tensioactivo (3,4% de Cremophor RH455 en las HIPREs O/W y 5,1% de Cremophor WO7 en las HIPREs W/O) y en el componente oleoso (Miglyol 812 en las HIPREs O/W y parafina líquida en las HIPREs W/O). La concentración de ketoprofeno fue del 1,5%, ya el fármaco es soluble en este componente oleoso (40 mg/mL) (Llinàs, 2010), es muy superior a su solubilidad en agua (0,01 mg/mL) (Sweetman, 2011), que era el factor limitante para la incorporación de ketoprofeno en las HIPREs W/O descritas en los apartados anteriores. La concentración del 1,5% en las HIPREs O/W permitía igualmente el cumplimiento de las condiciones *sink* en el medio receptor. A efectos comparativos se estudió la difusión de ketoprofeno desde una solución de Miglyol 812 que contenía un 1,5% de ketoprofeno a una solución receptora de PBS pH 7,4. En la Tabla 4.12. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados

realizados y en la Figura 4.24. se muestra el perfil de difusión obtenido al representar el porcentaje de fármaco en la solución de Miglyol 812 en función del tiempo.

Tabla 4.12. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una solución de ketoprofeno (1,5%) en Miglyol 812.

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	1.7	2.4	2.0	2.0	0.3
5	7.5	10.9	11.6	10.0	2.2
10	11.9	15.3	20.0	15.7	4.0
20	19.1	20.1	26.0	21.7	3.7
30	25.1	27.7	41.0	31.3	8.5
45	30.6	38.5	42.8	37.3	6.2
60	40.7	47.4	49.7	45.9	4.7
120	66.0	73.8	73.6	71.1	4.5
180	84.0	91.6	90.3	88.6	4.1
240	97.2	103.6	99.9	100.2	3.2

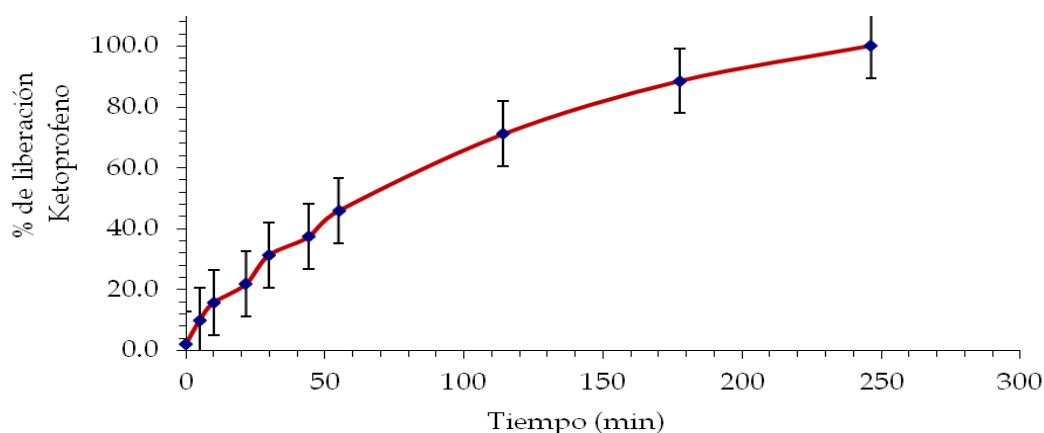


Figura 4.24. Perfil de difusión de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una solución de ketoprofeno (1,5% p/p) en Miglyol 812.

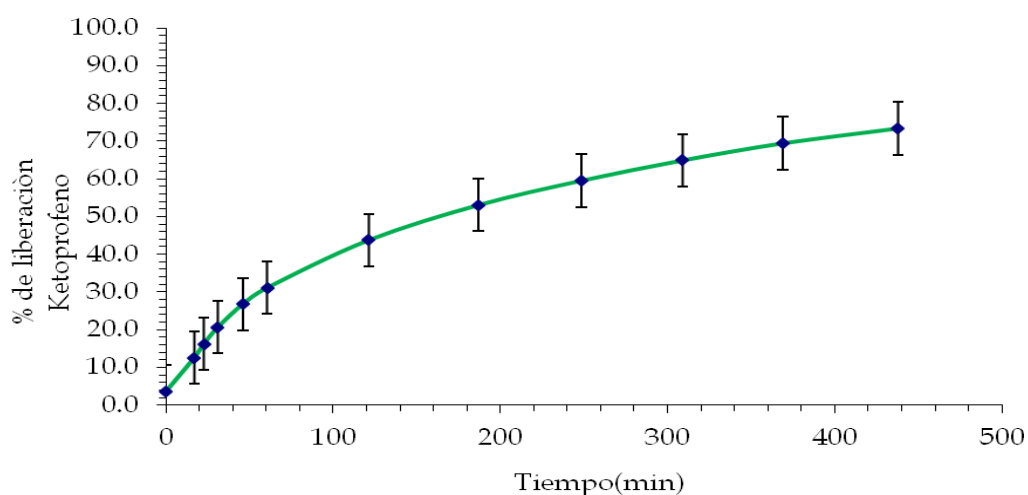
El perfil observado muestra una ligera retención por efecto de la membrana hidrófila que, sin embargo, permite la total liberación del principio activo después de 4 horas. Los resultados se corresponden con un perfil típico de difusión a partir de soluciones, con una rápida liberación en las primeras horas (*burst release*).



En la Tabla 4.13. y 4.14. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados realizados para cada una de las HIPREs estudiadas y en las Figuras 4.25. y 4.26. se muestran los perfiles de liberación obtenidos al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

*Tabla 4.13. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es agua (HOW2K).*

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	1.9	3.4	3.7	3.5	0.9
15	9.3	11.6	13.6	12.6	2.1
20	12.3	15.8	16.7	16.2	2.3
30	16.0	20.3	20.9	20.6	2.7
45	20.7	26.3	27.2	26.8	3.5
60	24.8	31.4	30.9	31.1	3.7
120	36.6	43.9	43.6	43.7	4.1
180	45.4	53.5	52.6	53.0	4.4
240	52.1	59.9	59.2	59.6	4.3
300	57.4	65.2	64.6	64.9	4.4
360	61.8	69.8	69.1	69.4	4.4
420	67.1	73.3	73.5	73.4	3.7



*Figura 4.25. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es agua (HOW2K).*

Tabla 4.14. Porcentaje de ketoprofeno en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HOW2ack).

Tiempo (minutos)	% Liberación de ketoprofeno			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	3.1	3.1	0.9	2.4	1.3
15	7.9	9.5	11.5	9.6	1.8
20	12.3	13.4	15.8	13.8	1.8
30	17.3	18.5	23.6	19.8	3.3
45	22.7	23.0	30.5	25.4	4.5
60	27.4	27.5	36.0	30.3	4.9
90	34.6	35.1	45.7	38.5	6.3
180	48.0	56.5	59.5	54.7	6.0
240	57.3	63.8	69.9	63.6	6.3
320	64.6	71.3	77.7	71.2	6.6
420	73.5	76.4	86.4	78.8	6.7
480	77.7	-	90.5	84.1	9.0
1380	106.8	102.3	112.4	107.2	5.1

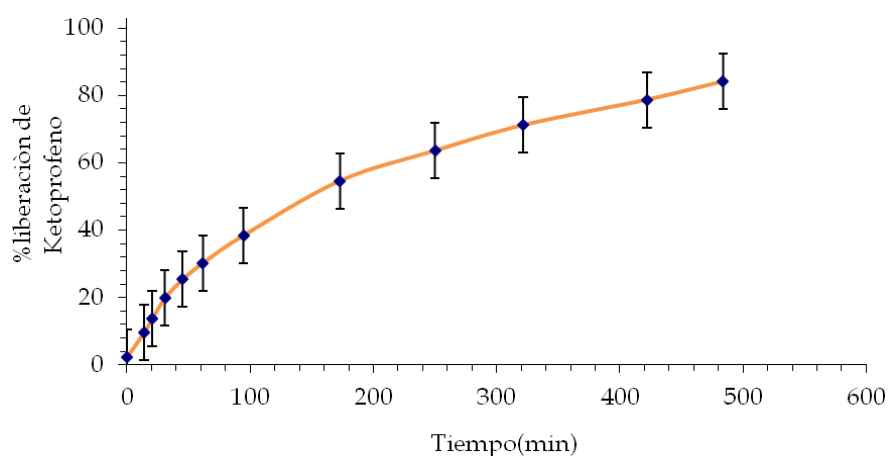


Figura 4.26. Perfil de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HOW2ack).

Comparando los resultados de liberación obtenidos con las dos HIPREs O/W estudiadas (HOW2K y HOW2ack), no se encuentran diferencias significativas respecto a las primeras siete horas, pudiéndose obtener una liberación más retardada en comparación a la obtenida desde una solución de Miglyol o de una solución de PBS,

descrita en apartados anteriores. Si se comparan los valores obtenidos con las HIPREs O/W con los obtenidos a partir de las HIPREs W/O descritos anteriormente se puede concluir que para las HIPREs cuyo componente acuoso es agua, en las HIPREs O/W existe una ligera retención del principio activo en tiempos inferiores a una hora, pero a tiempos más largos no se observan diferencias significativas. En cambio, cuando el componente acuoso es alginato reticulado, se observa una mayor retención del principio activo en las HIPREs W/O a partir de la tercera hora y en dichas emulsiones no se alcanza la total liberación del principio activo transcurridas 22 horas, a diferencia de las HIPREs O/W en las que si que se alcanza la total liberación a las 23 horas. Los resultados obtenidos permiten concluir que la influencia del alginato reticulado en la liberación del ketoprofeno cuando el alginato está en la fase externa es mínima, probablemente debido a la baja proporción de la fase externa; en este caso, la retención del ketoprofeno se puede atribuir a la mayor solubilidad del principio activo en la fase interna de la emulsión (Miglyol 812). Este efecto ha sido descrito previamente en otros estudios de liberación de principios activos que son solubles en la fase interna de emulsiones altamente concentradas (Calderó, 2012). Sin embargo, la mayor retención del principio en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W cuando la fase acuosa está reticulada se podría justificar por la localización del fármaco en la interfase y por la elevada proporción de alginato reticulado en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W por lo que el efecto de retención en la matriz de alginato es mucho menor, figura 4.27.

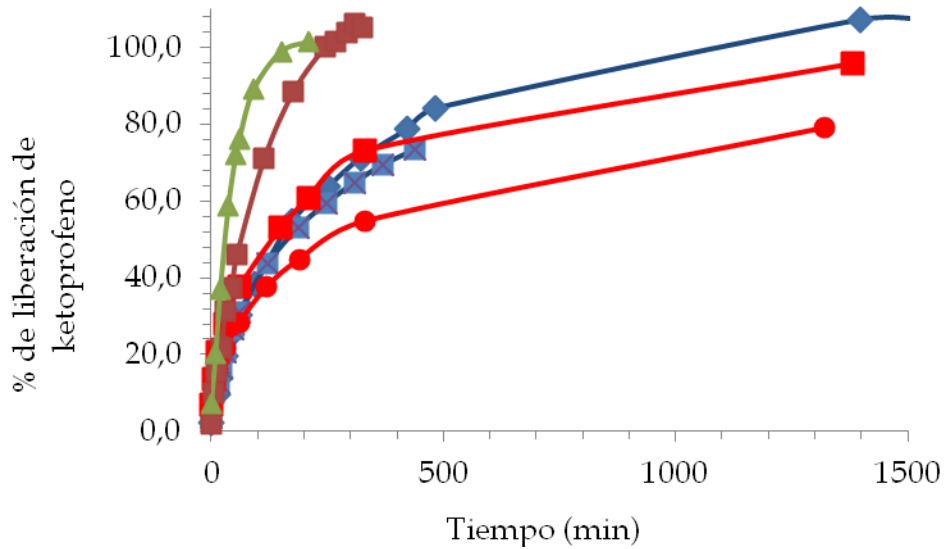
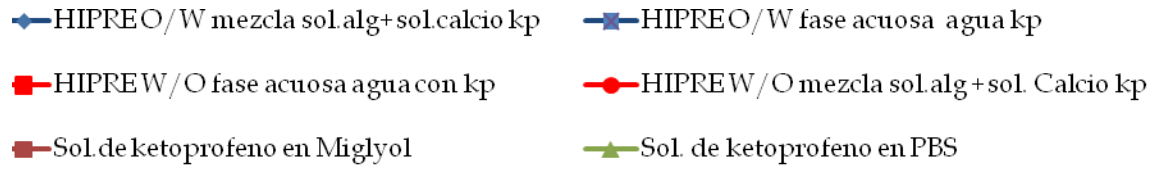


Figura 4.27. Perfiles de liberación de ketoprofeno a través de membrana de celulosa desde: a) solución de ketoprofeno (0,4%) en PBS, b) solución de ketoprofeno (1,5%) en Miglyol, c) HIPRE W/O cuyo componente acuoso es agua (HWO6K), d) HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HWO6ack), e) HIPRE O/W cuyo componente acuoso es agua (HOW2K) y f) HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HOW2ack).

## 4.2.3.2. Estudios de liberación de clorhidrato de clindamicina

### Estudios de liberación de clorhidrato de clindamicina desde

#### HIPREs W/O

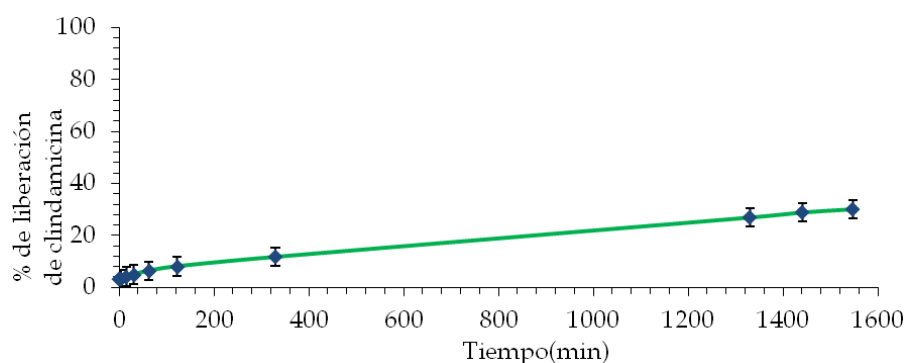
Se realizaron los estudios de liberación a partir de HIPREs W/O, que fueron las mismas emulsiones seleccionadas para los estudios de liberación de ketoprofeno pero en este caso con un principio activo con una elevada solubilidad en agua como es el clorhidrato de clindamicina. Se seleccionaron tres HIPREs: HWO6Clin, HWO6AClin y HWO6acClin. En estas HIPREs, recordando lo descrito en el apartado de liberación de ketoprofeno, el contenido en fase acuosa es elevado, 83% y la relación entre el tensioactivo (Cremophor WO7) y el componente oleoso (parafina líquida) es 70/30 en peso. Las diferencias entre las tres emulsiones radican en el componente acuoso que constituye la fase interna: en HWO6Clin el componente acuoso es agua, en HWO6AClin el componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% en peso y en HWO6acClin el componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y de solución de cloruro de calcio al 0,015%, de forma que las cadenas de alginato se encuentran reticuladas físicamente mediante los iones calcio. La concentración de clorhidrato de clindamicina es el 0,25% del total de la emulsión, que se estima que estará predominantemente en la fase acuosa debido a su elevada solubilidad en agua. Esta concentración es la misma que se ha estudiado con ketoprofeno. El medio receptor fue una solución de PBS a pH 7,4, igual que en los estudios de liberación de ketoprofeno.

La difusión del clorhidrato de clindamicina desde una solución acuosa se ha estudiado previamente y está descrita en la bibliografía (Calderó, 2010). Presenta un perfil de difusión característico de las soluciones, con un rápido efecto burst y una difusión total antes de tres horas. En las Tablas 4.14., 4.15. y 4.16. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados realizados para cada una de las HIPREs estudiadas y en las Figuras 4.28., 4.29. y 4.30. se muestran los perfiles de liberación

obtenidos al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

*Tabla 4.14. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es agua (HWO6Clin).*

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	3.1	3.3	2.7	3.0	0.3
5	3.2	3.8	2.9	3.3	0.4
15	3.9	4.9	3.7	4.1	0.6
30	4.7	5.5	4.5	4.9	0.6
60	5.7	7.8	5.8	6.4	1.2
120	7.7	9.5	7.0	8.1	1.3
330	10.4	13.4	11.2	11.7	1.5
1380	23.0	32.4	25.2	26.9	4.9
1440	25.4	34.5	26.8	28.9	4.9
1560	25.8	35.7	28.7	30.1	5.1



*Figura 4.28. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es agua (HWO6Clin).*

Tabla 4.15. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HWO6AClin).

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	2.4	2.9	3.1	2.8	0.3
5	2.8	3.3	3.7	3.3	0.5
15	4.2	4.0	5.6	4.6	0.9
30	4.5	3.7	5.9	4.7	1.1
60	6.5	6.6	6.8	6.7	0.2
120	7.3	7.2	8.1	7.5	0.5
300	10.2	10.4	11.8	10.8	0.9
510	13.8	12.6	15.0	13.8	1.2
1380	22.5	20.3	22.8	21.9	1.3
1500	23.6	22.2	24.4	23.4	1.1

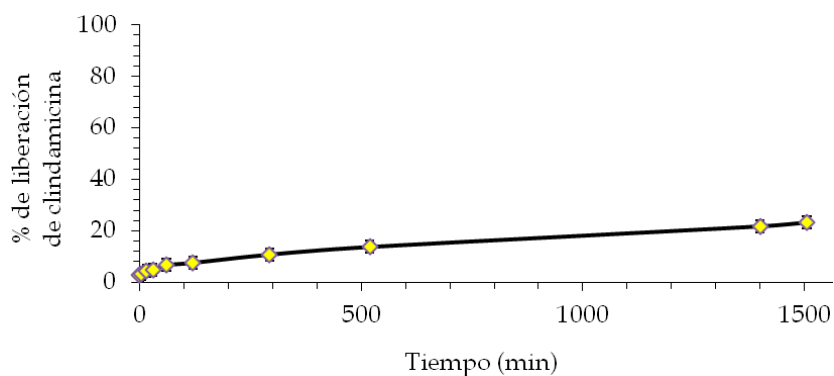


Figura 4.29. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HWO6AClin).

Tabla 4.16. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HWO6acClin).

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	5.8	5.3	6.3	5.8	0.46
5	6.5	6.0	6.6	6.4	0.29
15	6.7	5.9	6.9	6.5	0.53
30	7.3	7.4	8.4	7.7	0.60
60	9.3	7.6	9.8	8.9	1.11
120	11.3	10.2	14.2	11.9	2.08
240	14.4	14.2	16.1	14.9	1.01
360	17.9	15.4	20.4	17.9	2.50
1380	37.8	31.2	37.4	35.5	3.67
1500	30.7	29.2	39.0	33.0	5.23

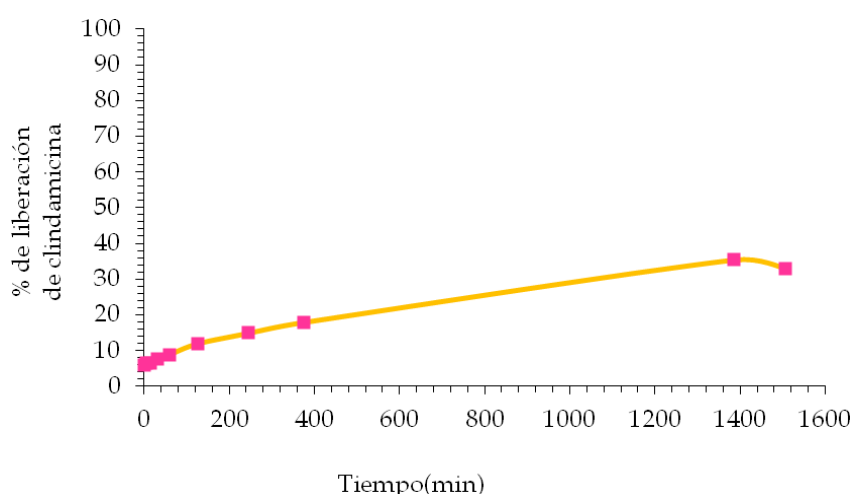


Figura 4.30. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE W/O cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HWO6acClin).

El estudio comparativo de los resultados de liberación de clorhidrato de clindamicina desde las tres HIPREs estudiadas, permite observar una gran retención de este principio activo hidrosoluble cuando está en la fase interna de un medio altamente compartimentalizado como son las emulsiones altamente concentradas, tal y como se



ha descrito anteriormente con este tipo de emulsiones (Calderó 2010 y 2012). En solución se alcanza el 100% de difusión al medio receptor transcurridas 3 horas, sin embargo, desde las HIPREs no se alcanza el 40% de liberación después de 25 horas. Comparando los tres tipos de HIPREs estudiados, con diferente composición en la fase interna, se observa una liberación ligeramente más rápida del clorhidrato de clindamicina cuando el componente acuoso es alginato reticulado con calcio que cuando es alginato o agua. Si se comparan los resultados de liberación a los 60 minutos, en la HIPRE que contiene agua es de  $6,4\% \pm 1,2$  (en el caso de ketoprofeno era  $37,6\% \pm 1,2$ ), en la que contiene alginato es  $6,7 \pm 0,2$  (en el caso de ketoprofeno era  $30,7\% \pm 1,6$ ) y en la que contiene alginato reticulado es  $8,9 \pm 1,1$  (en el caso de ketoprofeno era  $28,3\% \pm 3,0$ ). De igual manera, si se comparan los resultados transcurridas 2 horas (120 minutos), en la HIPRE que contiene agua se alcanza un  $8,1\% \pm 1,3$ , en la que contiene alginato un  $7,5\% \pm 0,5$  y en la que contiene alginato reticulado un  $11,9\% \pm 2,08$ . Transcurridas 23 horas desde el inicio del ensayo de liberación, en la HIPRE que contiene agua se alcanza un  $26,9\% \pm 4,9$ , en la que contiene alginato un  $21,9\% \pm 1,3$  y en la que contiene alginato reticulado un  $35,5\% \pm 3,68$ . No se observan diferencias significativas entre las HIPREs que contienen agua o solución de alginato en la fase interna, pero en cambio, la liberación es ligeramente superior cuando hay alginato reticulado, aun siendo la liberación muy lenta. Este hecho podría relacionarse con resultados previos obtenidos por M. Llinàs (Llinàs, 2010): en dicho estudio se determinó la liberación de clorhidrato de clindamicina desde emulsiones altamente concentradas y se lograba aumentar ligeramente la liberación del principio activo cuando se incorporaban distintas concentraciones de cloruro de sodio en la fase interna de las emulsiones, debido al efecto *salting out*, desplazando el clorhidrato de clindamicina desde la fase interna hacia la fase externa. Cabe destacar los valores significativamente más bajos en la liberación de clorhidrato de clindamicina respecto a los de ketoprofeno, en las mismas formulaciones, lo que se atribuye a la mayor solubilidad del hidrocloreuro de clindamicina en la fase interna.

## **Estudios de liberación de clorhidrato de clindamicina desde**

### **HIPREs O/W**

Para estudiar la liberación de clorhidrato de clindamicina desde emulsiones altamente concentradas O/W se seleccionaron tres HIPREs: una de ellas contenía únicamente agua como componente acuoso (HIPRE HOW2Clin), otra contenía una solución de alginato al 1% (HIPRE HOW2AClin) y la tercera contenía la mezcla de soluciones de alginato de sodio y de cloruro de calcio preparadas con anterioridad a la formación de la emulsión (HIPRE HOW2acClin). El medio receptor fue solución de PBS a pH 7,4 como en los estudios descritos anteriormente. Es importante recordar que las HIPREs O/W seleccionadas contenían un 83% de componente oleoso (Miglyol 812) y por ello, la concentración de componente acuoso era sólo el 13,6%, por lo que la influencia de la composición de la fase acuosa se estima que será menor que en las HIPREs W/O estudiadas anteriormente, en las que la concentración del componente acuoso era el 83%. También cabe destacar las diferencias en cuanto a la naturaleza y concentración del tensioactivo (3,4% de Cremophor RH455 en las HIPREs O/W y 5,1% de Cremophor WO7 en las HIPREs W/O) y en el componente oleoso (Miglyol 812 en las HIPREs O/W y parafina líquida en las HIPREs W/O). La concentración de hidrocloreto de clindamicina en la emulsión fue del 1,5%, que es la misma concentración que en los estudios de liberación de ketoprofeno desde HIPREs O/W. Cabe destacar que estudios previos realizados por M.Llinàs sobre liberación de clorhidrato de clindamicina desde HIPREs W/O demostraron que un incremento del 10% en la concentración del fármaco, no lograba aumentar el porcentaje de liberación del mismo (Llinàs, 2010).

En las tablas 4.17., 4.18 y 4.19. se indican los porcentajes de liberación obtenidos en los tres replicados realizados para cada una de las HIPREs estudiadas y en las figuras 4.31., 4.32. y 4.33, se muestran los perfiles de liberación obtenidos al representar el porcentaje de fármaco en el medio receptor en función del tiempo.

Tabla 4.17. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es agua (HOW2Clin).

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	4.4	7.2	7.9	6.5	1.9
5	10.6	14.9	16.1	13.9	2.9
15	14.0	19.2	21.0	18.0	3.7
30	18.2	23.4	26.5	22.7	4.2
60	24.3	30.7	33.9	29.6	4.9
120	32.5	42.4	44.2	39.7	6.3
240	44.7	57.6	56.7	53.0	7.2
360	53.1	67.3	64.8	61.8	7.6
1350	75.3	102.5	92.6	90.2	13.7
1500	75.6	98.3	96.0	90.0	12.5

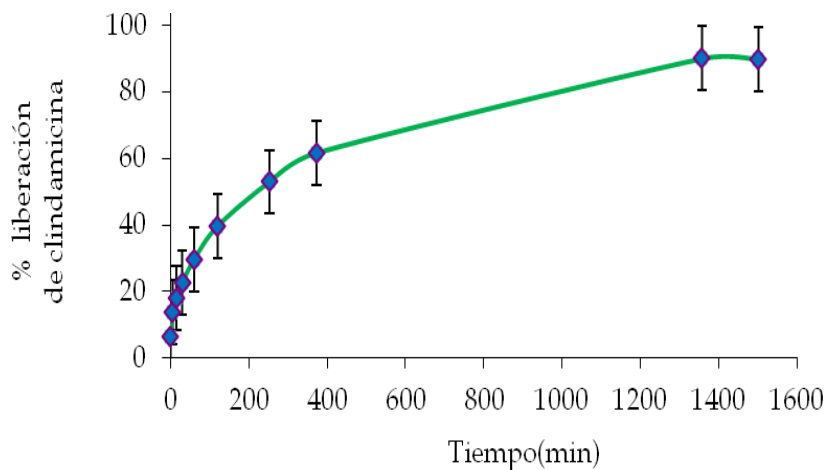


Figura 4.31. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es agua (HOW2Clin).

Tabla 4.18. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HOW2AClin).

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	4.0	4.7	4.4	4.4	0.4
5	9.0	11.5	8.8	9.8	1.5
15	12.6	16.7	12.8	14.0	2.3
30	16.9	21.7	17.7	18.8	2.6
60	24.0	30.3	26.0	26.7	3.2
150	38.2	47.0	43.1	42.8	4.4
270	50.8	60.7	57.3	56.3	5.0
390	60.4	70.3	68.0	66.2	5.2
1440	93.3	99.3	100.3	97.6	3.8
1500	94.3	98.6	100.5	97.8	3.2

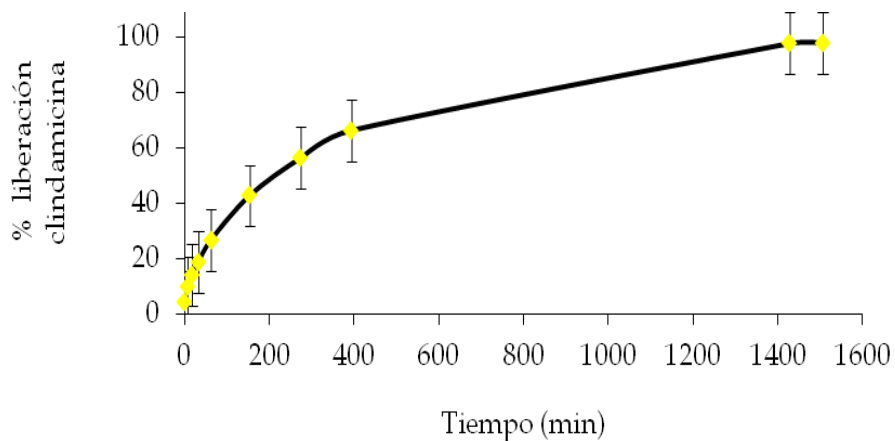


Figura 4.32. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una solución de alginato de sodio al 1% (HOW2AClin).

Tabla 4.19. Porcentaje de clorhidrato de clindamicina en la solución receptora en función del tiempo, liberado desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HOW2acClin).

Tiempo (minutos)	% Liberación de clindamicina			Promedio	Desv.std
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3		
0	3.6	5.1	4.4	4.4	0.8
5	9.0	10.4	9.1	9.5	0.8
15	13.3	15.8	14.7	14.6	1.2
30	19.6	23.2	22.7	21.8	1.9
60	27.9	32.3	31.6	30.6	2.4
120	35.6	40.3	40.6	38.9	2.8
240	51.5	54.7	56.5	54.2	2.5
1080	90.2	90.6	94.9	91.9	2.6
1440	95.0	94.8	99.6	96.4	2.7
1501.3	94.2	94.8	99.0	96.0	2.6

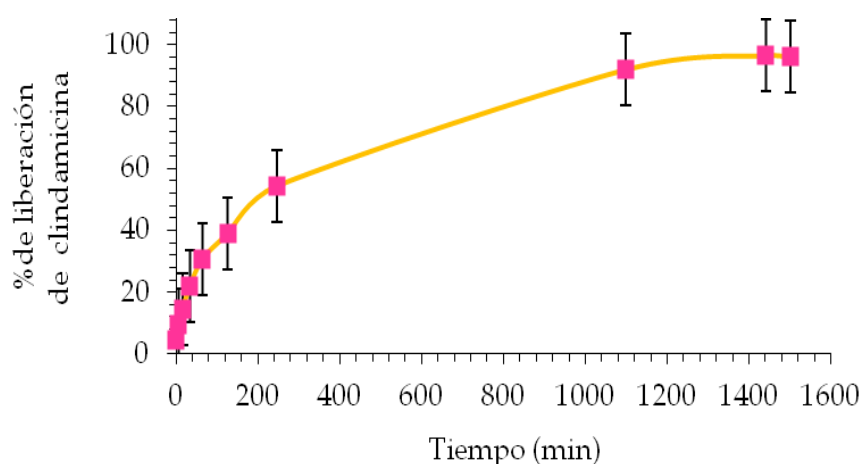


Figura 4.33. Perfil de liberación de clorhidrato de clindamicina a través de membrana de celulosa desde una HIPRE O/W cuyo componente acuoso es una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y solución de cloruro de calcio al 0,015% (HOW2acClin).

El estudio comparativo de los resultados de liberación de clorhidrato de clindamicina desde las tres HIPREs O/W estudiadas, no permite encontrar diferencias significativas en cuanto a la liberación del principio activo desde las HIPREs que contienen sólo agua como componente acuoso, las que contienen solución de alginato al 1% o las que contienen alginato reticulado con cloruro cálcico. Igual como se observó en la

liberación del ketoprofeno desde HIPREs O/W, la influencia del alginato o del alginato reticulado es insignificante debido a la baja proporción de componente acuoso (13,64%) en estas emulsiones. El incremento en la desviación estándar del porcentaje de liberación de fármaco en función del tiempo para las HIPREs cuyo componente acuoso es agua, podría atribuirse a una desestabilización de las emulsiones en las bolsas de diálisis en contacto con el medio receptor a tiempos largos, hecho que no se observa en las HIPREs que contienen alginato o alginato reticulado en la fase externa. Es destacable la diferencia en cuanto al porcentaje de liberación de clorhidrato de clindamicina desde HIPREs W/O en las que no se alcanza el 40% de liberación después de 25 horas; con las HIPREs O/W es posible la liberación de la totalidad del principio activo alrededor de 24-25 horas. Este hecho también contrasta con la difusión desde una solución de clorhidrato de clindamicina donde se puede cuantificar la totalidad del fármaco en la fase receptora después de 3 horas aproximadamente.

A modo de resumen se muestran en la Figura 4.34. los resultados de los estudios de liberación de clorhidrato de clindamicina desde las HIPREs estudiadas.

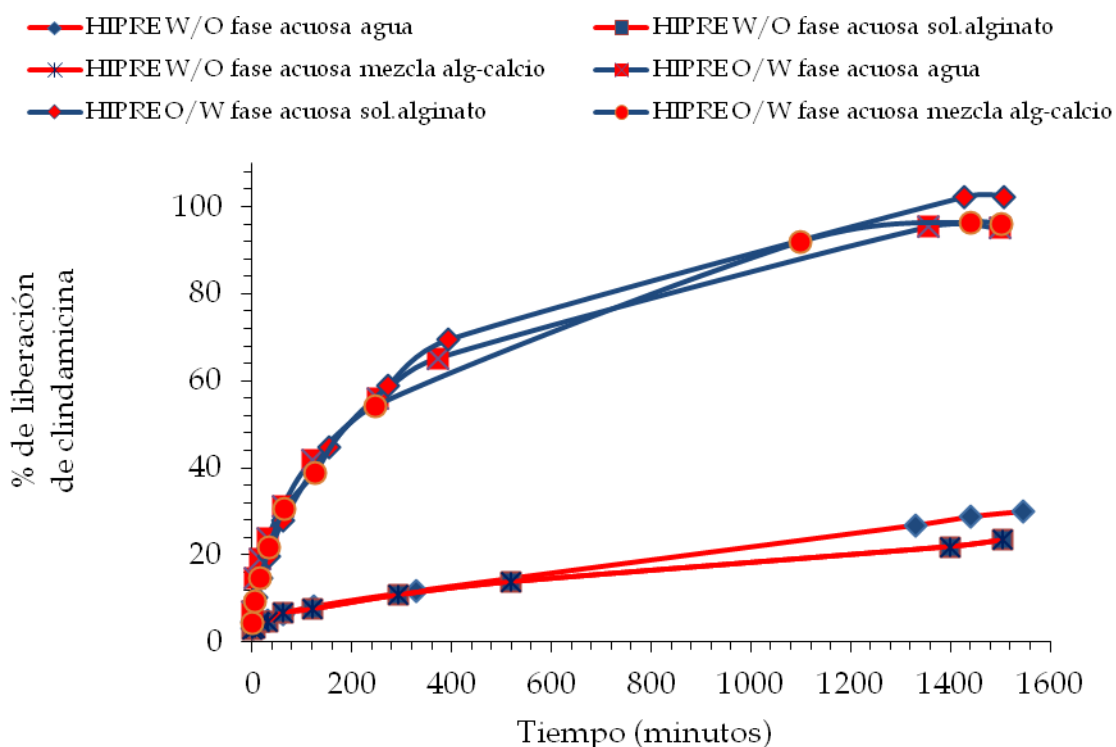


Figura 4.34. Perfiles de liberación de clorhidrato clindamicina desde HIPREs W/O y O/W con distintos componentes acuosos.

Los resultados de los estudios de liberación de un fármaco hidrosoluble como el clorhidrato de clindamicina permiten concluir que las HIPREs pueden controlar la liberación del mismo: cuando el principio activo está en la fase interna acuosa (HIPREs W/O), debido a su elevada solubilidad en agua, la liberación es extraordinariamente lenta y se acelera ligeramente cuando en la fase interna hay alginato reticulado, probablemente debido a un efecto *salting out* provocado por el cloruro de calcio; sin embargo, cuando el principio activo está mayoritariamente en la fase externa (HIPREs O/W), la liberación es mucho más rápida, alcanzándose la total liberación después de 24-25 horas pero dicha liberación es muy inferior a la difusión que se produce desde una solución acuosa, por lo que el medio altamente compartimentalizado que caracteriza a las HIPREs permite retardar considerablemente la liberación. El efecto del alginato o del alginato reticulado es insignificante cuando se encuentra en la fase externa, probablemente debido a su baja concentración.

### **4.3. Formación y caracterización de materiales porosos a partir de emulsiones altamente concentradas con alginato reticulado con cloruro de calcio**

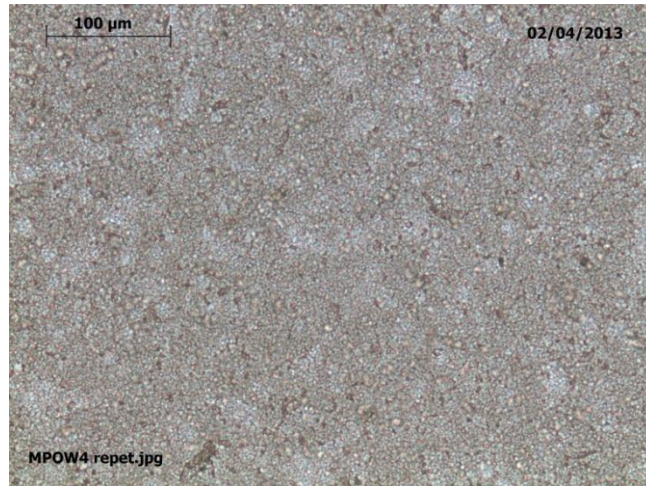
Las emulsiones altamente concentradas han sido utilizadas como plantilla para la obtención de materiales nanoestructurados (Esquena, 2006). De este modo, la incorporación de un polímero en la fase interna o externa de una HIPRE y la posterior eliminación de los componentes líquidos de la emulsión, puede dar lugar a materiales sólidos porosos o a partículas, según el polímero forme parte de la fase externa o de la fase interna de la HIPRE. En la presente Tesis Doctoral, se ha estudiado la posibilidad de obtener partículas o materiales porosos cuando se incorpora alginato reticulado en la fase interna de HIPREs W/O o en la fase externa de HIPREs O/W, debido a la solubilidad preferencial del alginato en medio acuoso. El objetivo era obtener materiales que pudieran ser administrados como implantes osteoarticulares, pero que mantuvieran una estructura altamente organizada, partiendo de la estructura de las

HIPREs. Por ello se seleccionaron HIPREs formuladas con excipientes biocompatibles que pudieran ser eliminados mediante disolventes poco tóxicos, fácilmente eliminables y aceptables para uso farmacéutico. A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos.

Para la obtención de materiales porosos de alginato, se seleccionaron las HIPREs O/W desarrolladas y descritas en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral. Concretamente la formulación utilizada fue la correspondiente al sistema agua/Cremophor RH455/ Miglyol 812, con un 83% de componente oleoso (Miglyol 812) y un 17% de la mezcla componente acuoso (W)/tensoactivo(S) con una proporción en peso de 80/20 (W/S, que es la HIPRE HOW2). En los estudios de liberación de fármacos a partir de HIPREs se incorporó como componente acuoso una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y una solución de cloruro de calcio al 0,015%; sin embargo, para la preparación de materiales porosos se aumentaron estas concentraciones para conseguir materiales con mayor cantidad de alginato reticulado y se partió de una mezcla al 2% de alginato y un 0,1% de cloruro de calcio, que representan un 0,272% de alginato y un 0,0136% de cloruro de sodio en la HIPRE O/W. La preparación, tal como se ha descrito en la parte experimental consistió en dos etapas: en primer lugar, la preparación de la HIPRE O/W y en segundo lugar, el lavado y la extracción del componente oleoso y el tensoactivo.

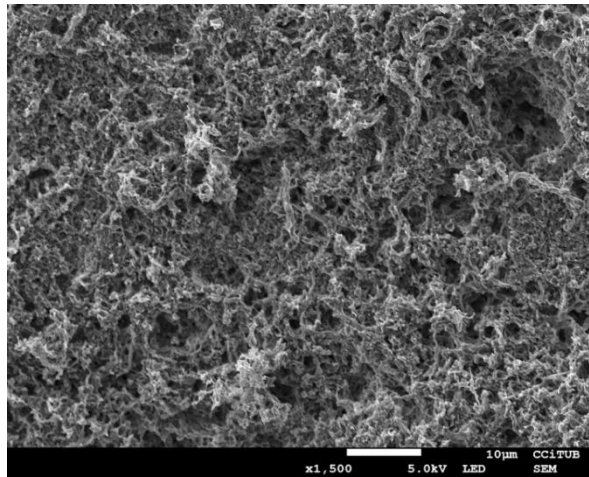
Para la preparación de la HIPRE O/W se mezcló el tensoactivo y la dispersión de alginato, agitando mediante vórtex. A esta mezcla se le incorporó gota a gota Miglyol agitando mediante vórtex y ultratúrrax y finalmente se incorporó la solución de cloruro de calcio homogeneizando mediante ultratúrrax. En la Figura 4.36. se muestra el aspecto de la HIPRE obtenida observada mediante microscopía óptica.



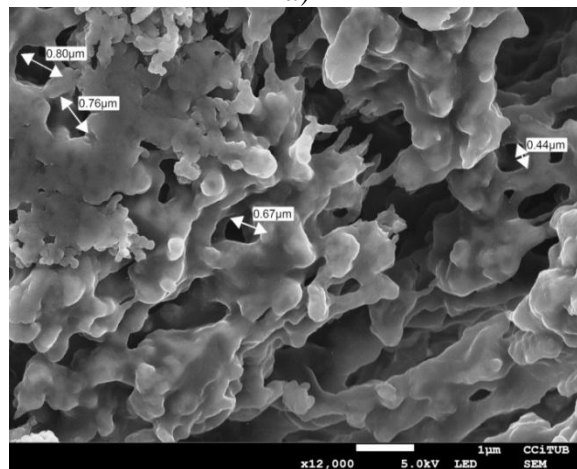


*Figura 4.35. Imagen de microscopía óptica de HIPRE O/W recién preparada utilizada como plantilla para obtener material poroso. Aumento 40x.*

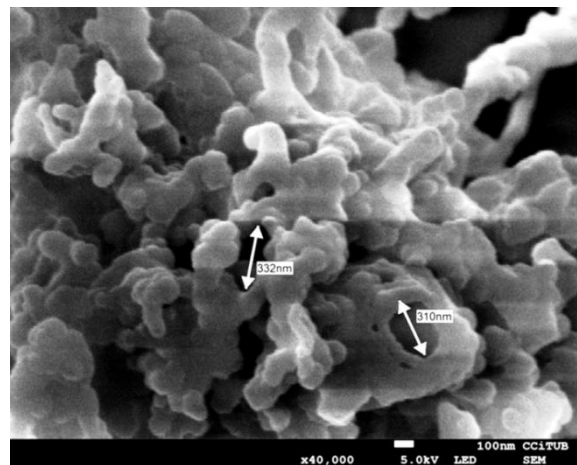
Una vez preparada la HIPRE O/W se procedió a eliminar agua, componente oleoso y tensioactivo. En primer lugar se introdujo la HIPRE en estufa a 50°C hasta peso constante, después se lavó el residuo con butanol, se agitó, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Dicho proceso se repitió varias veces con etanol. El residuo obtenido se dejó secar a temperatura ambiente o en estufa a 50°C. En la Figura 4.37. se muestra el aspecto de los materiales obtenidos observados por microscopía electrónica a distintos aumentos. Cabe destacar la polidispersidad en el tamaño de los poros, característico de las HIPREs que se han utilizado como plantilla, así como la existencia de algunos poros de tamaño nanométrico.



a)



b)



c)

Figura 4.36. Imágenes de SEM de los materiales porosos de alginato reticulado obtenido a partir de HIPREs O/W después de sucesivos lavados con butanol y etanol, eliminación de los solventes y secado en estufa a 50°C. a) 1500x, b) 12000x, c) 40000x

Además de determinar la porosidad de los materiales de alginato mediante SEM, se determinó la superficie específica de dichos materiales mediante el análisis de su isoterma de adsorción mediante un equipo de sorción de gases. El análisis de porosimetría se realizó mediante el aparato Quantachrome Autosorb-iQ que analiza la capacidad de adsorción de un material tomando en cuenta la cantidad de un gas inerte que es capaz de adsorber el cuerpo poroso según la isoterma de adsorción de Brunauer-Emmett-Teller (BET) y luego relaciona la capacidad de adsorción con el tamaño del poro. La aplicación de la teoría BET permite calcular el valor de la superficie específica a partir de las isotermas de adsorción y desorción. La técnica no permite obtener información de tamaños de poro superiores a 300 nm, aunque dichos poros se pueden observar mediante microscopía electrónica de rastreo (SEM). Los resultados de este análisis se detallan en la en la tabla 4.20 y figura 4.37.

*Tabla 4.20 Valores correspondientes a los materiales porosos de alginato reticulado determinados a partir de la teoría BET mediante las isotermas de adsorción.*

Parámetro	MATERIAL POROSO	
	Magnitud	Unidades
Díámetro medio de poro	44.9	nm
Moda	45.9	nm
Volumen de poro	0.224	cc/g*
Área superficial	28.85	m <sup>2</sup> /g
Volumen total de poro con tamaño menor a 331 nm	0.324	cc/g

---

\*cc/g; centímetro cúbico por gramo

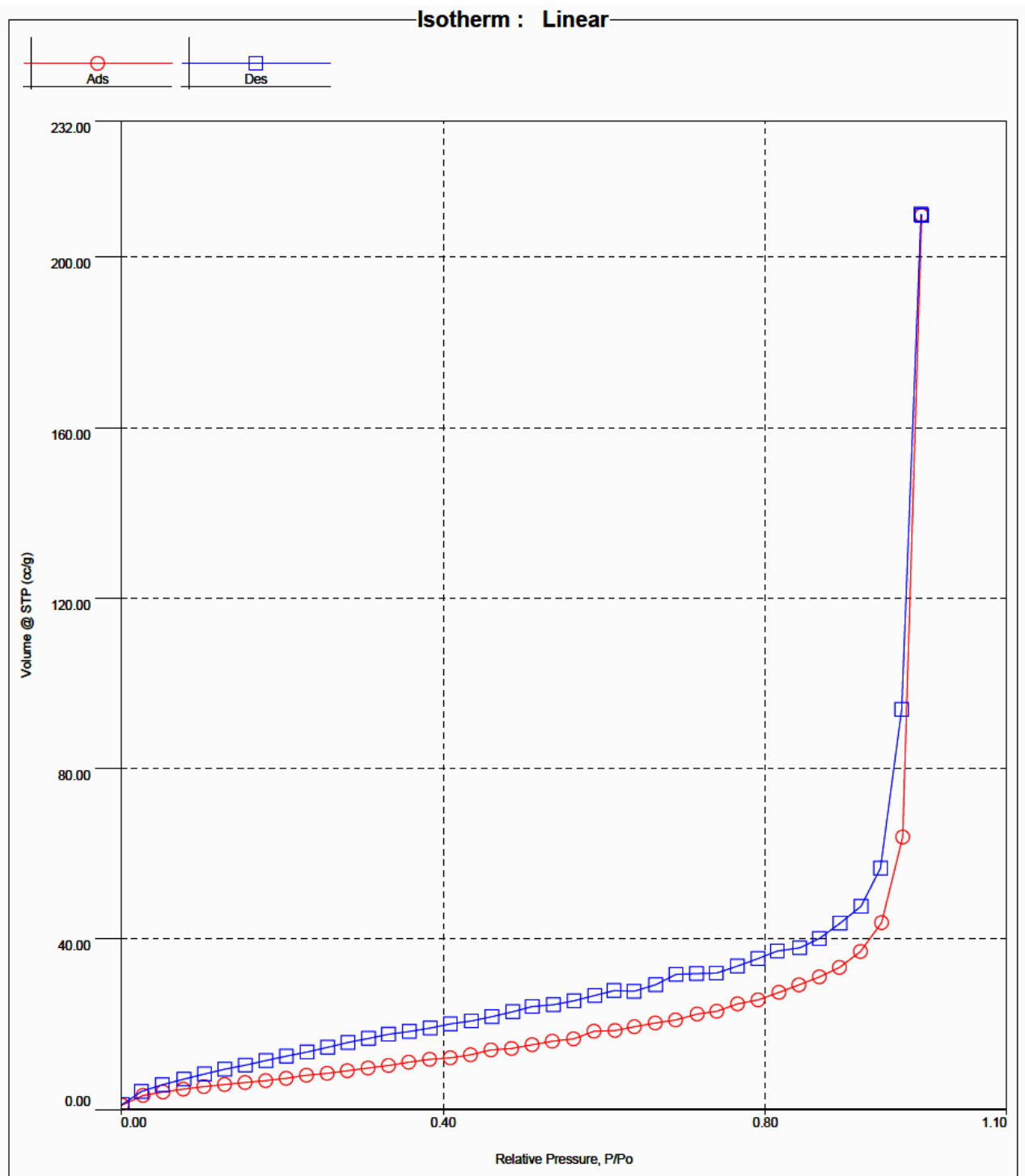


Figura 4.37. Isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno del material poroso de alginato reticulado obtenido a partir de una HIPRE O/W.

El ciclo de histéresis que se observa entre las isothermas de adsorción y desorción de nitrógeno (Figura 4.37.) se debe a la mesoporosidad de la muestra, La presencia de mesoporos (2-50 nm) provoca una condensación capilar del adsorbato que produce

una diferencia entre las presiones de adsorción y desorción. Mediante esta histéresis es posible caracterizar la porosidad que presenta la muestra. Además, el gran aumento de gas adsorbido a presiones altas es una característica típica de la presencia de macroporos (tamaño superior a 50 nm).

El análisis de los materiales de alginato obtenidos a partir de HIPREs O/W permite concluir que dichos materiales presentan una porosidad no sólo debida al efecto plantilla de las emulsiones, sino que también presentan porosidad en las paredes de los poros. Esta porosidad puede atribuirse a que el alginato está en una proporción muy baja en la fase continua de la HIPRE y no es suficiente para cubrir toda la superficie de la fase continua, con lo que quedan espacios vacíos. No se han incorporado concentraciones más elevadas de alginato debido a la elevada viscosidad de las dispersiones, que dificulta la preparación de las HIPREs.

El valor relativamente bajo de superficie específica,  $28,85 \text{ m}^2/\text{g}$ , muestra que dichos materiales son básicamente macroporosos, ya que la presencia de microporos (tamaño inferior a 2 nm) produciría unos valores superficie específica mucho más grandes. Además, la baja adsorción de gas a presiones bajas también indica la ausencia de microporosidad. Los valores de superficie específica de los materiales porosos de alginato obtenidos a partir de HIPREs son similares a los descritos en la bibliografía para espumas sólidas de quitosano, poliestireno-divinilbenceno y ácido hialurónico (Miras, 2013; Canal, 2012; Roig, 2016).

Además de estudiar la formación de materiales porosos de alginato a partir de HIPREs O/W, se estudió la formación de partículas de alginato a partir de HIPREs W/O.

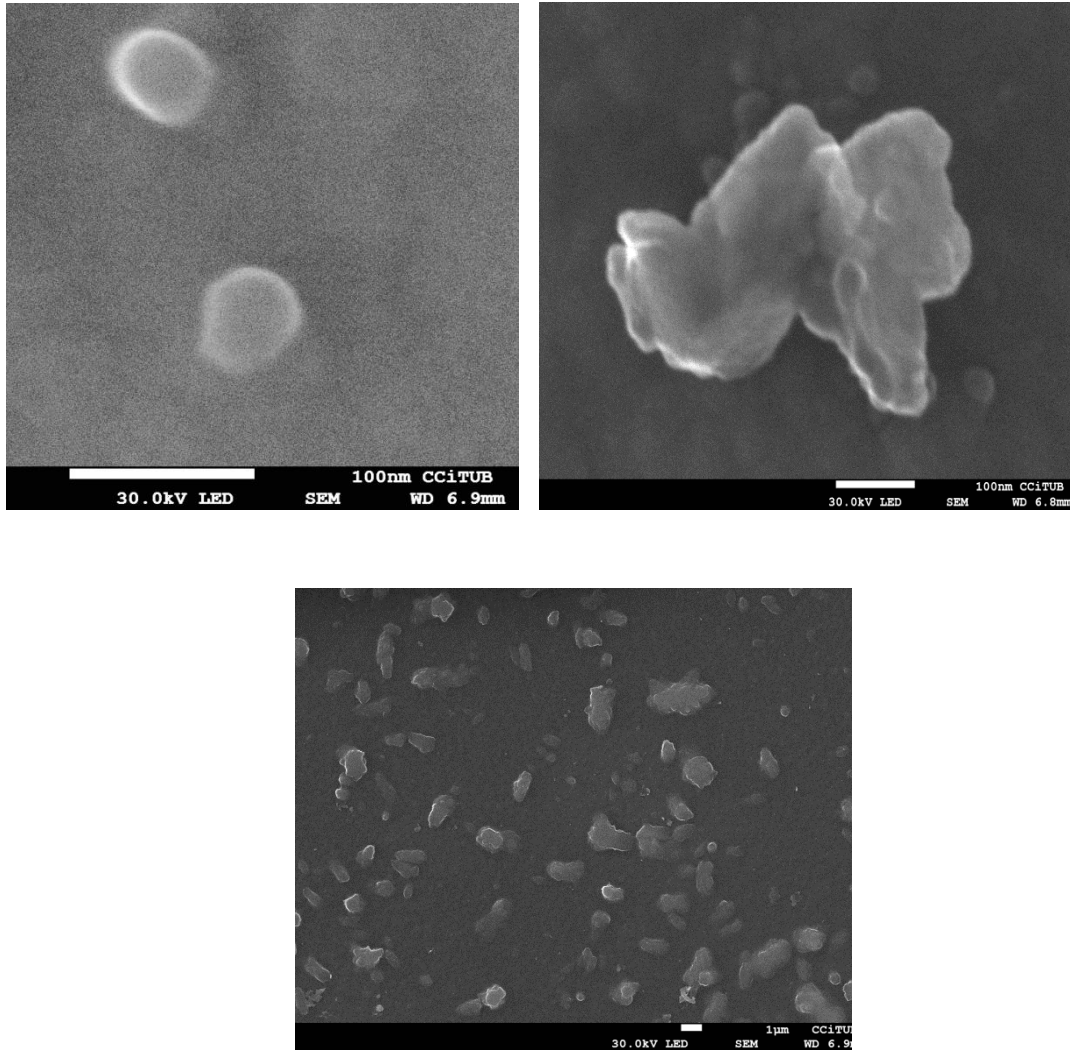
## **4.4. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio en solución**

La utilización de sistemas tensioactivos nanoestructurados para la obtención de nanopartículas poliméricas ha sido objeto de estudio por parte de numerosos grupos de investigación en los últimos años. En esta Tesis Doctoral se consideró de gran interés estudiar la formación de partículas de alginato reticulado con calcio utilizando emulsiones altamente concentradas y nano-emulsiones como plantilla, con objeto de controlar el tamaño de las partículas obtenidas. A efectos comparativos, también se estudió la formación de partículas de alginato reticulado con calcio en solución, siguiendo un método descrito en la bibliografía que ha sido ampliamente utilizado. A continuación se describen y discuten los resultados obtenidos.

### **4.4.1. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con calcio en solución**

Se prepararon partículas de alginato según el método propuesto por Rajaonarivony (Rajaonarivony 1993). El método, que está descrito en la parte experimental, consistió en añadir 4,5 mL de agua a 5 mL de una solución de alginato al 0,12%. A continuación, se añadió gota a gota 0,5 mL de solución de cloruro de calcio al 0,2% (18 mM). Dos minutos más tarde se añadieron gota a gota 2 mL de una solución de poli-lisina al 0,05%. La mezcla se agitó a 2400 rpm durante 5 minutos. Según la bibliografía, la utilización de una capa de policationes tales como la polilisina disminuye el tamaño de poro de las partículas de alginato y proporciona inmunoprotección a las partículas cuando están destinadas a ser utilizadas como vectores en terapia génica. Cabe destacar la baja proporción de alginato de sodio utilizada (0,06% en total) así como el porcentaje en cloruro de calcio (0,01%).

Las partículas de alginato obtenidas por el método de Rajaonarivony se caracterizaron mediante SEM y mediante DLS, utilizando el Zetasizernano ZS (Malvern) y el equipo Vasco 2 (Cordouan). En la Figura 4.38 se muestran algunas imágenes de SEM de las nanopartículas obtenidas.



*Figura 4.38. Imágenes de SEM de nanopartículas de alginato reticulado obtenidas en solución, mediante el método propuesto por Rajaonarivony (Rajaonarivony 1993) a diferentes aumentos.*

La caracterización mediante DLS permitió comprobar la morfología irregular y elevada polidispersidad de tamaños de las partículas obtenidas. El análisis mediante el equipo Zetasizernano (Malvern) proporcionó unos tamaños correspondientes a un Z-average de  $772,9\text{nm} \pm 89,91$ , con una polidispersidad de 0,505. Mediante el análisis con el equipo Vasco2 (Cordouan) se pudieron distinguir dos grupos de partículas con

tamaños distintos: un grupo presentaba un tamaño entre 227 y 239 nm y el otro grupo tenía un tamaño entre 547 y 636 nm. Ambos tamaños se encuentran en el rango descrito en la bibliografía, que es entre 250 y 850 nm.

Después de caracterizar las nanopartículas de alginato obtenidas en solución mediante el método de Rajaonarivony, se estudió la formación de nanopartículas utilizando sistemas tensioactivos como plantilla, con la finalidad de optimizar el tamaño y la polidispersidad de las mismas.

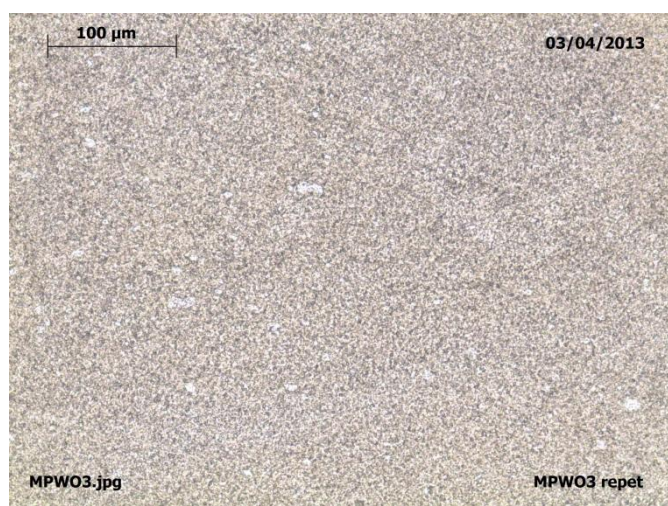
#### **4.4.2. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio a partir de HIPREs W/O**

Para la obtención de partículas de alginato reticulado con calcio, se seleccionaron las HIPREs W/O desarrolladas y descritas en apartados anteriores de la presente Tesis Doctoral. Concretamente la formulación utilizada fue la correspondiente al sistema agua/Cremophor WO7/ parafina líquida, con un 83% de componente acuoso y un 17% de la mezcla componente oleoso (O)/tensioactivo (S) con una proporción en peso de 70/30 (O/S), que corresponde a la HIPRE HWO6. En los estudios de liberación de fármacos a partir de HIPREs se incorporó como componente acuoso una mezcla de solución de alginato de sodio al 1% y una solución de cloruro de calcio al 0,015%; sin embargo, para la preparación de partículas se aumentaron estas concentraciones para conseguir mayor cantidad de alginato reticulado y se partió de una mezcla al 2% de alginato y un 0,1% de cloruro de calcio, que representan un 1,66% de alginato y un 0,083% de cloruro de sodio en la HIPRE W/O. La preparación, tal como se ha descrito en la parte experimental consistió en dos etapas: en primer lugar, la preparación de la HIPRE W/O y en segundo lugar, el lavado y la extracción del componente oleoso y el tensioactivo.

Para la preparación de la HIPRE W/O se mezcló el tensioactivo y la parafina líquida, agitando mediante vórtex. A esta mezcla se le incorporó gota a gota la solución de



alginato agitando mediante vórtex y homogeneizando con ultratúrrax y finalmente se incorporó la solución de cloruro de calcio, homogeneizando mediante ultratúrrax. Cabe destacar la dificultad en la preparación de estas HIPREs debido a su elevada viscosidad y debida a la mayor concentración de alginato reticulado. En la Figura 4.39. se muestra el aspecto de la HIPRE obtenida observada mediante microscopía óptica.



*Figura 4.39. Imagen de microscopía óptica de HIPRE W/O recién preparada utilizada como plantilla para obtener material particulado. Aumento 40x.*

Se estudió el comportamiento reológico de estas HIPREs y se determinó el módulo elástico ( $G'$ ) y el módulo viscoso ( $G''$ ). En la Figura 4.40 se muestran los valores obtenidos en función de la frecuencia. Si se comparan estos resultados con los obtenidos con la misma HIPRE pero con concentraciones inferiores de alginato y cloruro de calcio (Figura 4.10.) se observa el notable incremento especialmente del módulo elástico ( $G'$ ), que pasa a alcanzar valores de 8000 Pa a una frecuencia de 10 Hz, frente a valores alrededor de 1000 Pa, que se obtenían con concentraciones de alginato y cloruro de calcio más bajas (HIPRE HWO6AC). El módulo viscoso ( $G''$ ) también sufre un considerable aumento, alcanzando 2000 Pa a 10Hz en las HIPREs con una mayor concentración de alginato reticulado, frente a valores inferiores a 500 Pa en las HIPREs estudiadas anteriormente. El comportamiento reológico de estas HIPREs dificulta su preparación, ya que precisan una agitación más energética.

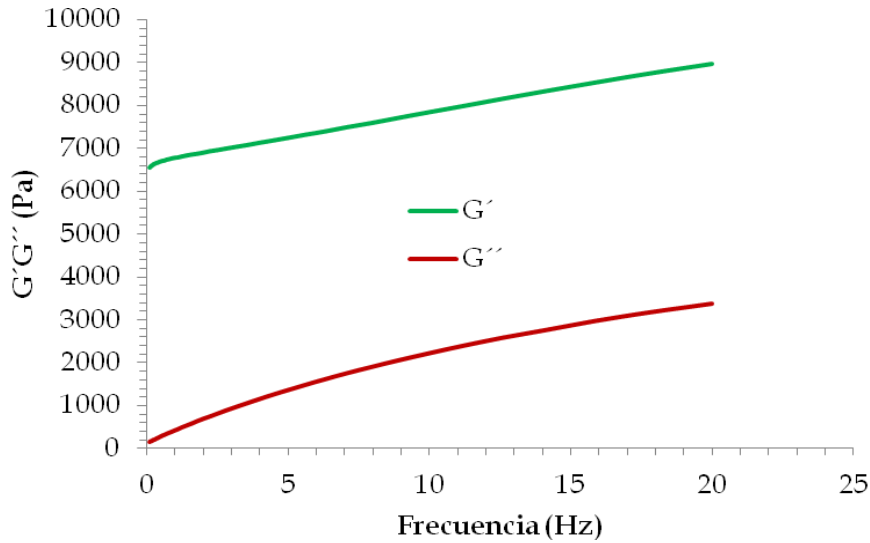


Figura 4.40. Representación del módulo elástico  $G'$  (Pa) y del módulo viscoso  $G''$  (Pa) en función de la frecuencia para las HIPREs W/O utilizadas como plantilla para la preparación de partículas de alginato reticulado con calcio.

Una vez preparada la HIPRE W/O se procedió a eliminar agua, componente oleoso y tensioactivo. En primer lugar se dejó secar a 50°C la HIPRE sobre papel filtro durante 24 horas. El residuo casi seco se le añadió 1,5 mL de butanol y la mezcla se mantuvo en agitación durante un par de minutos a temperatura ambiente; a continuación se eliminó el sobrenadante y se efectuaron varios lavados con etanol. Se mezcló el residuo con etanol durante 12 horas. Finalmente se filtró y secó a 50°C hasta peso constante. En la Figura 4.41. se muestra el aspecto de las partículas obtenidas observadas por microscopía electrónica a distintos aumentos.

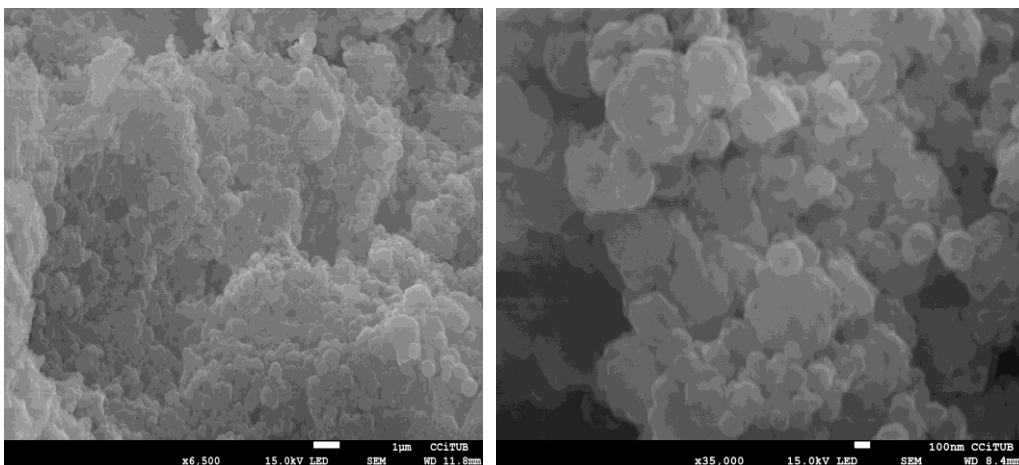


Figura 4.41. Microfotografía SEM de HIPRE W/O de material nanoparticulado después de haber sido lavado.

Cabe destacar la forma isodiamétrica, la agregación de las partículas y la gran polidispersidad en el tamaño, característico de las HIPREs que se han utilizado como plantilla. El método de preparación, a partir de emulsiones altamente concentradas favorece la agregación de las partículas y la polidispersidad, obteniéndose un material nanoparticulado, cuya estructura es inversa a la estructura del material poroso obtenido a partir de las HIPREs O/W y descrito en un apartado anterior. Si se comparan las partículas obtenidas a partir de las HIPREs con las obtenidas en solución, se observa una mayor densidad de partículas cuando se utilizan HIPREs como plantilla, lo que puede atribuirse tanto a la mayor concentración de alginato utilizado como a la estructura compartimentalizada de las HIPREs, que permite una distribución del alginato más homogénea. Asimismo, se observan diferencias en la morfología de las partículas, siendo mucho más redondeadas las obtenidas a partir de HIPREs. En ambos casos se observa polidispersidad. En un futuro está previsto estudiar la posibilidad de dispersar las partículas agregadas formadas a partir de HIPREs, la estabilidad del material constituido por partículas agregadas y la influencia de las variables de composición así como la optimización de las formulaciones y de los métodos de preparación.

Los resultados obtenidos con las HIPREs llevaron a plantear el estudio de la formación de nanopartículas de alginato utilizando otros sistemas tensioactivos nanoestructurados, con tamaños de gota más uniformes, como las nano-emulsiones W/O.

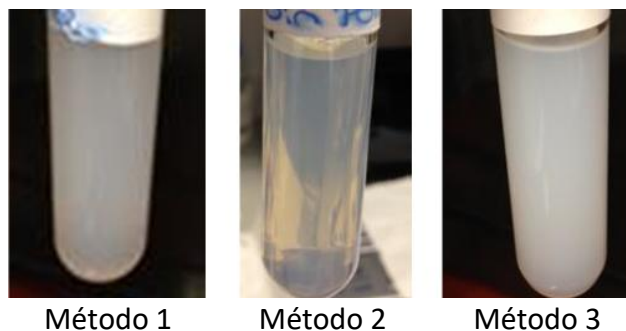
#### **4.4.3. Formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con cloruro de calcio a partir de nano-emulsiones**

Para el estudio de la formación de nanopartículas de alginato reticulado a partir de nano-emulsiones, se seleccionaron nano-emulsiones W/O que formadas en el sistema agua/mezcla de tensioactivos Cremophor EL: Cremophor WO7/miristato de isopropilo,

descritas previamente en la bibliografía (Usón, 2004) y estudiados en nuestro grupo de investigación. Concretamente se seleccionó el sistema que tenía una relación en peso de tensioactivos Cremophor EL: Cremophor WO7 de 1:7. Se estudió la solubilidad del alginato en miristato de isopropilo y se comprobó que era prácticamente insoluble en este componente oleoso, mostrando una solubilidad preferencial por el agua. De este modo, las gotas de la nano-emulsión podrán ser utilizadas como plantillas para la formación de nanopartículas de alginato reticulado. La nano-emulsión seleccionada tenía un 85% de miristato de isopropilo y una relación en peso de agua/mezcla de tensioactivos de 30/70, por lo que el contenido en agua era del 4,5% y el contenido en tensioactivos del 10,5%. En dicha nano-emulsión se estudió la incorporación de distintas concentraciones de alginato de sodio, cloruro de calcio y otros excipientes, para la formación de nanopartículas.

Se estudió la incorporación de alginato de sodio, cloruro de calcio en concentraciones bajas, para evitar la precipitación del alginato debido a la baja concentración de agua en las nano-emulsiones W/O. En primer lugar se estudió la influencia del orden de incorporación de los componentes en las propiedades de las nano-emulsiones. El componente acuoso consistió en una mezcla con un 0,06% de alginato de sodio y un 0,1% de cloruro de calcio. Las formulaciones se prepararon a 70°C agitando con un vórtex a 2500 rpm. Los métodos de incorporación ensayados fueron los siguientes:

- Método 1: Se mezclaron los tensioactivos y el miristato de isopropilo y se añadió gota a gota la mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio.
- Método 2: Se mezclaron los tensioactivos y la mezcla de solución de alginato de sodio y cloruro de calcio y se añadió gota a gota el miristato de isopropilo.
- Método 3: Se mezclaron los tensioactivos y la solución de alginato de sodio y se añadió gota a gota primero el miristato de isopropilo y después la solución de cloruro de calcio. En la Figura 4.42. se muestra el aspecto de las dispersiones obtenidas.



*Figura 4.42. Aspecto visual de las dispersiones de nanopartículas de alginato reticulado obtenidas en nano-emulsión, según tres métodos de incorporación de los componentes.*

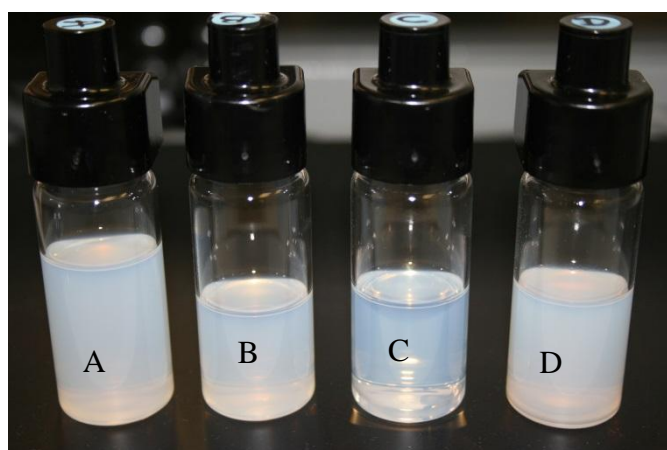
Tal como se observa en la Figura 4.42., con el método 2 se obtuvieron dispersiones translúcidas mientras que con los métodos 1 y 3 el aspecto era más blanquecino, especialmente con el método 3; por ello, el método 2 fue seleccionado para realizar estudios posteriores.

Con la finalidad de evaluar el efecto de la poli-L-lisina, componente utilizado en la preparación de nanopartículas en solución según el método de Rajaonarivony (Rajaonarivony 1993), se estudiaron dispersiones de nanopartículas en nano-emulsión, que contenían concentraciones de alginato de sodio del mismo orden que las utilizadas en el método de preparación de nanopartículas de alginato en solución descrito por Rajaonarivony, así como concentraciones de alginato más elevadas, que eran del mismo orden que las utilizadas en los estudios de liberación de fármaco a partir de HIPREs con alginato reticulado. En la Tabla 4.21 se indica la concentración de alginato de sodio, cloruro de calcio y poli-L-lisina en el componente acuoso de las formulaciones estudiadas. En la Figura 4.43 se muestra el aspecto visual de las formulaciones. La muestra C corresponde a la nano-emulsión sin alginato ni cloruro de calcio ni poli-L-lisina.

*Tabla 4.21. Concentración\* de alginato de sodio, cloruro de calcio y poli-L-lisina en el componente acuoso de las formulaciones constituidas por un 85% de miristato de isopropilo y 15% de la mezcla agua/tensioactivos (30/70).*

<b>Muestra</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> (%)</b>	<b>Poli-L-lisina (%)</b>
A	0,05	0,083	0,0083
B	0,05	0,083	-
C	-	-	-
D	1,0	0,015	0,0083

\*Todas las concentraciones se han expresado en relación peso/peso.



*Figura 4.43. Aspecto visual de las dispersiones de alginato reticulado con calcio en nano-emulsión. La muestra C es la nano-emulsión sin alginato.*

En la Figura se observa el aspecto translúcido característico de la nano-emulsión (C), que se opacifica ligeramente al incorporar alginato, cloruro de calcio y poli-L-lisina. No se observan diferencias en cuanto al aspecto de las muestras A y B, que sólo se diferencian en el contenido en poli-L-lisina (muestra A). Sin embargo, la muestra D, con un mayor contenido de alginato, presenta un aspecto notablemente más blanco y se puede observar un pequeño precipitado al cabo de unas horas de su preparación.

Se caracterizaron estas muestras mediante DLS, utilizando el equipo Zetasizer nano ZS (Malvern) y se estudió su estabilidad durante una semana. En la Tabla 4.22. se muestran los diámetros de partícula obtenidos (Z-average) y la polidispersidad y en la Figura 4.44 se observa la variación del tamaño en función del tiempo.

Tabla 4.22. Tamaño de partícula (Z-average) y polidispersidad de las formulaciones en función del tiempo desde la preparación.

Muestra	Día	Z-average (nm)	Polidispersidad
A	1	120.9	0.158
	2	121	0.106
	5	123	0.129
	6	118.9	0.155
	7	121.1	0.088
B	1	123	0.212
	2	117	0.147
	5	116	0.201
	6	113.1	0.095
	7	114.5	0.091
C	1	101.5	0.138
	4	106.3	0.095
	5	105.9	0.042
	6	107.3	0.065
D	1	140.2	0.312
	4	126.4	0.165
	5	125	0.177
	6	114.3	0.248

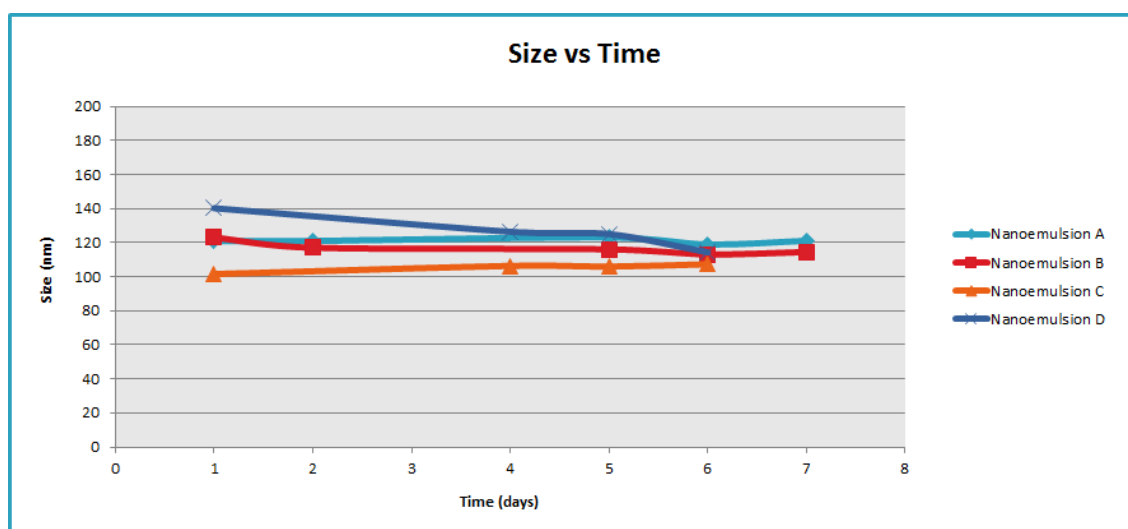


Figura 4.44. Variación del tamaño de partícula de las formulaciones A, B, C y D en función del tiempo.

Según los valores de Z-average obtenidos mediante el análisis de las muestras por DLS, los tamaños de partícula de la nano-emulsión C, que no contiene alginato ni cloruro de calcio ni poli-L-lisina, oscilan entre 101 y 107 nm, considerablemente inferiores a los de las formulaciones que contienen alginato, lo que se puede atribuir a la presencia de alginato en la fase interna y la formación de nanopartículas en las formulaciones A, B y D. Los valores más elevados (alrededor de 140 nm) y la mayor polidispersidad se obtienen con la formulación D, que contiene la concentración de alginato más alta. No se observan diferencias significativas entre las formulaciones A y B (alrededor de 120 nm), con lo que no se ha podido constatar efecto alguno en el tamaño de partícula atribuible a la poli-L-lisina. Las formulaciones han mostrado estabilidad en cuanto al tamaño de partícula durante una semana, excepto la formulación D, que ha sufrido un descenso, probablemente debido a la sedimentación de las partículas más grandes, que correspondería al precipitado que se ha podido observar a simple vista. Cabe destacar el pequeño tamaño y la baja polidispersidad de estas nanopartículas preparadas a partir de nano-emulsión, en comparación con las nanopartículas de alginato reticulado con calcio preparadas en solución por el método de Rajaonarivony (Rajaonarivony 1993) y también con otras nanopartículas de alginato de sodio reticulado sólo con calcio descritas en la bibliografía (Paques, 2014). En la Figura 4.45. se observa una imagen obtenida por microscopía crio-SEM de la muestra B.



*Figura 4.45. Imagen de la muestra B obtenida mediante microscopía electrónica crio-SEM.*



Se efectuó un estudio de la estabilidad de las muestras A, B, C y D mediante un espectrómetro de difusión múltiple de luz (Turbiscan®). Dicho equipo mide la retrodifusión de la luz que atraviesa la muestra a distintas alturas (light backscattering) en función del tiempo y permite cuantificar la estabilidad con gran precisión. Cada muestra se colocó en una célula cilíndrica y fue analizada por un haz de luz emitido en el infrarrojo cercano, a una longitud de onda de 880 nm. Dos sensores ópticos recibían al mismo tiempo y respectivamente la luz transmitida y la luz retrodispersada. La intensidad de la luz retrodispersada es directamente proporcional al tamaño de las partículas. Cada muestra estudiada fue escaneada cinco veces durante 5 minutos a 25°C y los análisis se repitieron en días consecutivos. En las Figuras 4.46., 4.47, 4.48 y 4.49. se muestran los perfiles de retrodifusión (backscattering) obtenidos con las muestras estudiadas.

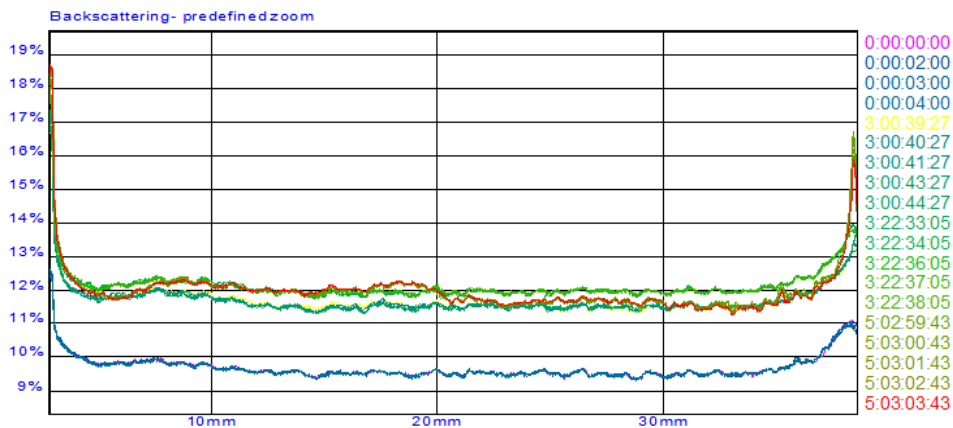


Figura 4.46. Representación del backscattering de la muestra A.

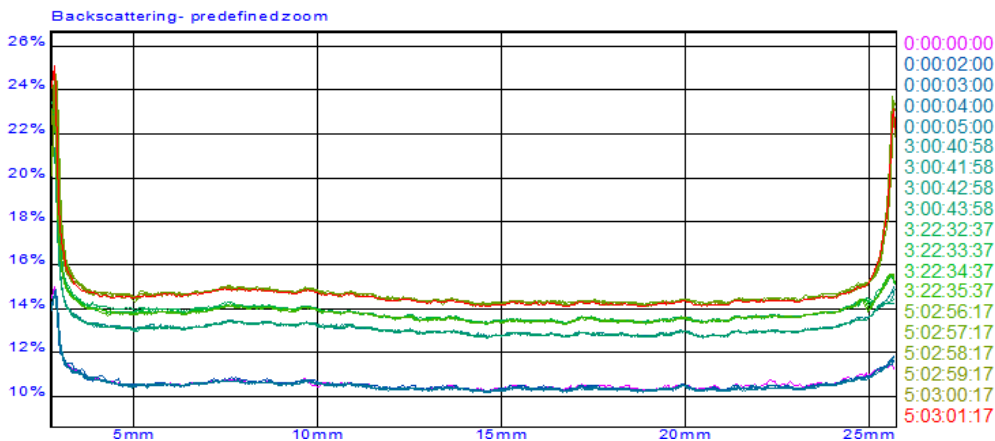


Figura 4.47. Representación del backscattering de la muestra B.

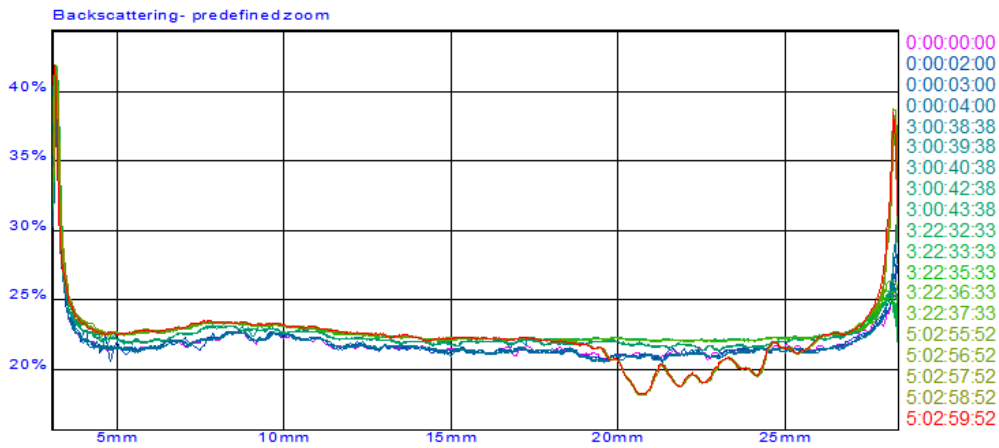


Figura 4.48. Representación del backscattering de la muestra C.

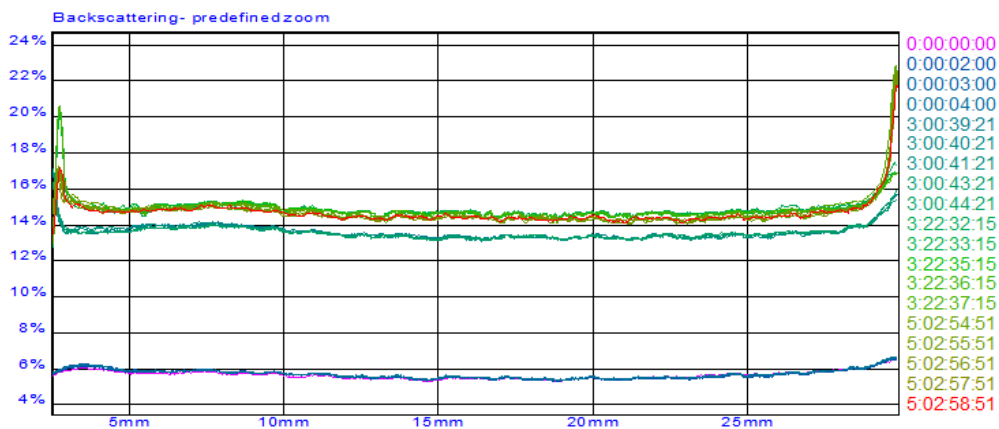


Figura 4.49. Representación del backscattering de la muestra D.

Los resultados de retrodifusión de la luz muestran una mayor estabilidad en la nano-emulsión C, que no contiene alginato, cuyos valores de intensidad se mantienen prácticamente constantes en toda la muestra y los espectros de retrodifusión están prácticamente superpuestos en los primeros días. Cabe destacar unas variaciones observadas en el cuarto día en una determinada altura, que podrían corresponder a alguna impureza. En cambio, en las otras muestras, se observa notables diferencias entre el primer día (línea azul) con respecto a días sucesivos, especialmente en la muestra D, que contiene una mayor concentración de alginato. Estas variaciones observadas en las muestras A, B y D son compatibles con la formación de

nanopartículas en la fase interna de la nano-emulsión, con una mayor velocidad de sedimentación que las gotas de la nano-emulsión.

Se estudió la influencia de la reticulación del alginato de sodio en el tamaño de partícula de las dispersiones. Para ello se preparó una nano-emulsión que contenía sólo alginato de sodio y se comparó con otra que también contenía cloruro de calcio. Los tamaños se compararon con la nano-emulsión sin alginato de sodio ni cloruro de calcio (nano-emulsión C). Las determinaciones se realizaron mediante el equipo de DLS Vasco2 (Cordouan), que proporciona valores de diámetro en nanómetros y la intensidad correspondiente a cada población de partículas. En la Tabla 4.22 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla 4.23. Tamaño de partícula (nm) de nano-emulsiones y dispersiones de nanopartículas en función de su composición.*

<b>Muestra</b>	<b>Alginato de sodio (%)</b>	<b>CaCl<sub>2</sub> (%)</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>Intensidad</b>
C	-	-	22,7	0,05
			109,8	0,92
E	0,06	-	60,8	0,22
			234,5	0,75
F	0,06	0,1	49,6	0,28
			145,7	0,69

En la Tabla 4.23 se observa que para todas las muestras se obtienen dos valores correspondientes a dos poblaciones: una población de partículas inferiores a 50 nm, con una baja intensidad y otra población de partículas más grandes con una mayor intensidad. Los valores menores se obtienen con la muestra C, que es la nano-emulsión sin alginato. Estos valores son similares a los obtenidos con el equipo Zetanalyzer (Malvern) que proporcionaba un Z-average de 101,5 y una polidispersidad de 0,138 para la misma formulación (muestra C, tabla 4.21). En la muestra C, la intensidad de la población de partículas pequeñas es muy pequeña (0,05). La intensidad de esta

población aumenta cuando hay alginato, lo que se traduce en un aumento de la polidispersidad de la muestra, igual como se puede evidenciar en los resultados de la Tabla 4.21. Sin embargo, es notable la disminución de tamaño de partícula de la muestra F, con alginato reticulado, en relación a la muestra E que no contiene cloruro de calcio. Este resultado se podría interpretar como una contracción debida al ordenamiento de las cadenas de alginato por la reticulación producida por los iones calcio. Sería necesario realizar más estudios con otras concentraciones de alginato y cloruro de calcio que permitieran comprobar esta hipótesis. De todas maneras, el efecto plantilla de la nano-emulsión en la formación de nanopartículas parece claramente demostrado.

Con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula obtenido y la polidispersidad y de acuerdo con metodologías propuestas en la bibliografía (Lertsutthiwong, 2008), se estudió el efecto de la aplicación de ultrasonidos en diferentes etapas del proceso de preparación. En la Tabla 4.24 se muestran los tamaños de partícula obtenidos con la muestra F.

*Tabla 4.24. Tamaño de partícula (nm) de dispersiones de nanopartículas formadas a partir de nano-emulsiones que contienen como componente acuoso una solución de 0,06% de alginato de sodio y un 0,1% de cloruro de calcio (muestra F), en función de la aplicación de ultrasonidos en diferentes etapas del proceso de preparación.*

<b>Sonicación</b>	<b>Diámetro (nm)</b>	<b>Intensidad</b>
Sin sonicación	49,6	0,28
	145,7	0,69
15 minutos antes de incorporar miristato de isopropilo	55,2	0,30
	181,5	0,66
15 minutos después de incorporar miristato de isopropilo	44,5	0,23
	130,6	0,73
	144,2	0,70

De los resultados obtenidos se puede deducir que la aplicación de ultrasonidos durante 15 minutos después de la incorporación del componente oleoso permite disminuir ligeramente el tamaño de dos poblaciones de partículas. Sin embargo, la sonicación de la muestra antes de incorporar el componente oleoso no consigue una disminución del tamaño sino lo contrario. Los resultados obtenidos parecen indicar una influencia positiva de la aplicación de ultrasonidos como método de homogeneización al finalizar la preparación de las dispersiones de nanopartículas pero sería necesario realizar nuevos ensayos para poder establecer con más precisión la duración más adecuada.

Finalmente, se incorporó un fármaco hidrosoluble, clorhidrato de clindamicina, en un 1% en las dispersiones de nanopartículas y se analizó el tamaño de partícula con fármaco incorporado. El tamaño de partícula se incrementó ligeramente, tanto el de las partículas pequeñas que aumentó de 49,6 nm a 54,8 nm, como el de las partículas grandes, que aumentó de 145,7 nm a 179,4 nm, pudiéndose deducir la incorporación del principio activo en las nanopartículas, aunque no se determinó la eficiencia de encapsulación.

Los resultados obtenidos en los estos estudios preliminares de preparación de nanopartículas de alginato reticulado a partir de nano-emulsiones ofrecen grandes posibilidades en cuanto al desarrollo de nuevas formas de dosificación de principios activos, debiéndose profundizar en la optimización del método de preparación, en la caracterización y en la estabilidad de las mismas, así como en la eliminación del componente oleoso y tensioactivos y posterior resuspensión en medio acuoso. Está previsto realizar estudios de liberación de fármacos desde estas nanopartículas, porque los tamaños obtenidos son considerablemente inferiores y más homogéneos que los de las nanopartículas de alginato de sodio reticuladas sólo con cloruro de calcio descritas en la bibliografía (Paques, 2014) y pueden ofrecer notables ventajas para su administración por distintas vías debido a su pequeño tamaño y a la biocompatibilidad del alginato y de los excipientes utilizados.

# **CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se ha estudiado la formación y caracterización de nanosistemas de liberación de fármacos que contienen alginato, con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos. Se han seleccionado las emulsiones altamente concentradas (HIPREs) de fase externa acuosa (O/W) y oleosa (W/O) y las nano-emulsiones de fase externa oleosa (W/O) como sistemas tensioactivos adecuados estudiar la incorporación y reticulación del alginato y para la obtención de materiales porosos y nanopartículas de alginato como sistemas de liberación de fármacos. Todos los excipientes utilizados han sido biocompatibles y adecuados para uso farmacéutico.

Los estudios realizados han permitido establecer las siguientes conclusiones:

En cuanto a la selección del método y la concentración de alginato de sodio y cloruro de calcio:

Se ha estudiado la reticulación del alginato de sodio mediante cloruro de calcio, utilizando el método de gelificación externa y se han seleccionado las mezclas más adecuadas para ser incorporadas a los distintos sistemas tensioactivos como componente acuoso, en función de la viscosidad de la mezcla, de las características de la emulsión y de la finalidad del estudio. Las composición del componente acuoso ha sido: a) en las HIPREs utilizadas como sistemas de liberación de fármacos: 1% de alginato de sodio y 0,015% de cloruro de calcio, por la baja viscosidad de la mezcla y la facilidad de incorporación en la preparación de la emulsión; b) en las HIPREs utilizadas como plantilla para la formación de materiales porosos y nanopartículas: 2% de alginato de sodio y 0,1% de cloruro de calcio, para conseguir una mayor cantidad de alginato reticulado y c) en las nano-emulsiones W/O utilizadas como plantilla para la formación de nanopartículas: 0,05-0,06% de alginato de sodio y alrededor del 0,1% de



cloruro de calcio, para evitar la precipitación del alginato debido a la baja proporción de componente acuoso.

En cuanto a la formación y caracterización de HIPREs W/O y O/W con alginato reticulado con calcio como sistemas de liberación controlada de fármacos:

Se ha estudiado la incorporación del alginato de sodio y el cloruro de calcio como componente acuoso de HIPREs W/O, con un 83% de componente acuoso y una relación de parafina líquida y Cremophor WO7 de 70/30 en peso, y en HIPREs O/W, con un 83% de Miglyol 812 y una relación de componente acuoso y Cremophor RH455 de 80/20. Se ha caracterizado la estructura de las emulsiones mediante microscopía óptica y electrónica y reología, pudiéndose comprobar que las gotas de las HIPREs W/O obtenidas son de tamaño nanométrico mientras que las de las HIPREs O/W son de tamaño micrométrico. La viscosidad está claramente influenciada por la presencia de alginato y por el orden de incorporación del alginato de sodio y el cloruro de calcio en la preparación de la HIPREs, especialmente en las HIPREs W/O, cuyo valor del módulo elástico ( $G'$ ) aumenta considerablemente en presencia de alginato de sodio y cuando se incorpora en primer lugar el cloruro de calcio y seguidamente el alginato de sodio, lo que indica que el proceso de reticulación está influenciado por el orden de incorporación de los componentes. El efecto en la viscosidad de la emulsión no es tan notable como en las HIPREs W/O debido a la baja proporción del componente acuoso que constituye la fase externa.

Se ha incorporado un fármaco prácticamente insoluble en agua, ketoprofeno, y un fármaco muy soluble en agua, clorhidrato de clindamicina, a HIPREs W/O y O/W con alginato reticulado con calcio y se ha estudiado la influencia de la estructura y composición de dichas emulsiones en la liberación de los fármacos desde las emulsiones a una solución receptora. Se ha podido constatar la posibilidad de controlar la liberación del ketoprofeno cuando se incorpora en emulsiones altamente concentradas W/O, en comparación con una solución de ketoprofeno o un hidrogel comercial, especialmente cuando se incorpora alginato en la fase interna y también se ha observado una mayor retención de ketoprofeno cuando el componente acuoso de la HIPRE es el alginato reticulado con cloruro de calcio, cuando se ha incorporado en

primer lugar el cloruro de calcio y en segundo lugar el alginato. La mayor retención del principio activo en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W cuando la fase acuosa está reticulada se podría justificar por la localización preferente del principio activo en las interfases de las HIPREs W/O debido a su solubilidad y también por la elevada proporción de alginato reticulado en las HIPREs W/O en comparación con las HIPREs O/W por lo que el efecto de retención en la matriz de alginato es mucho menor.

Los resultados de los estudios de liberación de un fármaco hidrosoluble, clorhidrato de clindamicina, permiten concluir que las HIPREs pueden controlar la liberación del mismo: cuando el principio activo está en la fase interna acuosa (HIPREs W/O), debido a su elevada solubilidad en agua, la liberación es extraordinariamente lenta y se acelera ligeramente cuando en la fase interna hay alginato reticulado, probablemente debido a un efecto *salting out* provocado por el cloruro de calcio; sin embargo, cuando el principio activo está mayoritariamente en la fase externa (HIPREs O/W), la liberación es mucho más rápida, alcanzándose la total liberación después de 24-25 horas pero dicha liberación es muy inferior a la difusión que se produce desde una solución acuosa, por lo que el medio altamente compartimentalizado que caracteriza a las HIPREs permite retardar considerablemente la liberación. El efecto del alginato o del alginato reticulado es insignificante cuando se encuentra en la fase externa, probablemente debido a su baja concentración.

Se ha demostrado que la aplicación del método de gelificación externa de alginato en un medio altamente compartimentalizado como son las HIPREs ofrece nuevas posibilidades para la obtención de nuevos materiales que permitan la liberación controlada de fármacos. Asimismo y del mismo modo que en estudios previos realizados con otros sistemas y otros principios activos, se ha constatado la eficacia de los estudios de liberación de principio activo para interpretar las propiedades de sistemas micro y nanoestructurados y diseñar formas de liberación controlada.

En cuanto a la formación y caracterización de materiales porosos de alginato reticulado con calcio utilizando HIPREs O/W como plantilla:

Se han obtenido materiales porosos de alginato reticulado con calcio, utilizando como plantilla HIPREs O/W, con un 83% de Miglyol 812 y una relación de componente acuoso y Cremophor RH455 de 80/20, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio al 0,1%. Las HIPREs obtenidas han sido lavadas con disolventes orgánicos para eliminar el componente oleoso y el tensioactivo, secadas a 50° y el material poroso obtenido ha sido caracterizado mediante microscopía electrónica y porosimetría. El análisis de los materiales de alginato obtenidos a partir de HIPREs O/W permite concluir que dichos materiales presentan una porosidad no sólo debida al efecto plantilla de las emulsiones, sino que también presentan porosidad en las paredes de los poros. Esta porosidad puede atribuirse a que el alginato está en una proporción muy baja en la fase continua de la HIPRE y no es suficiente para cubrir toda la superficie de la fase continua, con lo que quedan espacios vacíos. No se han incorporado concentraciones más elevadas de alginato debido a la elevada viscosidad de las dispersiones, que dificulta la preparación de las HIPREs. El valor relativamente bajo de superficie específica, 28,85 m<sup>2</sup>/g, muestra que dichos materiales son básicamente macroporosos, ya que la presencia de microporos (tamaño inferior a 2 nm) produciría unos valores superficie específica mucho más grandes. Además, la baja adsorción de gas a presiones bajas también indica la ausencia de microporosidad.

En cuanto a la formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con calcio utilizando HIPREs W/O como plantilla:

Se han obtenido nanopartículas de alginato de sodio reticulado con calcio, utilizando como plantilla HIPREs W/O, con un 83% de componente acuoso y una relación de parafina líquida y Cremophor WO7 de 70/30 en peso, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 2% y cloruro de calcio al 0,1%. Las HIPREs obtenidas han sido lavadas con disolventes orgánicos para eliminar el componente oleoso y el tensioactivo, secadas a 50° y el material nanoparticulado obtenido ha sido

caracterizado mediante microscopía electrónica, constatándose la forma isodiamétrica, la agregación de las partículas y la gran polidispersidad en el tamaño, característico de las HIPREs que se han utilizado como plantilla. El método de preparación, a partir de emulsiones altamente concentradas favorece la agregación de las partículas y la polidispersidad, obteniéndose un material nanoparticulado, cuya estructura es inversa a la estructura del material poroso obtenido a partir de las HIPREs O/W. Si se comparan las partículas obtenidas a partir de las HIPREs con las obtenidas en solución, se observa una mayor densidad de partículas cuando se utilizan HIPREs como plantilla, lo que puede atribuirse tanto a la mayor concentración de alginato utilizado como a la estructura compartimentalizada de las HIPREs, que permite una distribución del alginato más homogénea. Asimismo, se observan diferencias en la morfología de las partículas, siendo mucho más redondeadas las obtenidas a partir de HIPREs. En ambos casos se observa polidispersidad. En un futuro está previsto estudiar la posibilidad de dispersar las partículas agregadas formadas a partir de HIPREs, la estabilidad del material constituido por partículas agregadas y la influencia de las variables de composición así como la optimización de las formulaciones y de los métodos de preparación.

En cuanto a la formación y caracterización de nanopartículas de alginato reticulado con calcio utilizando nano-emulsiones W/O como plantilla:

Se han obtenido nanopartículas de alginato de sodio reticulado con calcio, utilizando como plantilla nano-emulsiones W/O del sistema componente acuoso/mezcla de tensioactivos Cremophor EL:Cremophor WO7 (1:7, en peso)/miristato de isopropilo, con un 85% de miristato de isopropilo y una relación de componente acuoso y mezcla de tensioactivos de 30/70 en peso, siendo el componente acuoso una mezcla de alginato de sodio al 0,05-0,06% y cloruro de calcio alrededor del 0,1%. Las nanopartículas de alginato reticulado obtenidas se han caracterizado mediante técnicas de Dynamic Light Scattering (DLS) y se han determinado tamaños inferiores a 150 nm. Se ha estudiado la influencia en el tamaño de partícula de variables de composición como la concentración de alginato, de cloruro de calcio, de poli-L-lisina, de clorhidrato de clindamicina y de variables en el método de preparación como el

orden de incorporación de los componentes y la aplicación de ultrasonidos. Se ha constatado una disminución en el tamaño de partícula cuando el alginato está reticulado con calcio, cuando se somete a ultrasonidos después de la incorporación del componente oleoso. El tamaño de partícula se incrementaba ligeramente cuando se incorporó un 1% de clorhidrato de clindamicina. Los tamaños obtenidos son considerablemente inferiores y más homogéneos que los de las nanopartículas de alginato de sodio reticuladas sólo con cloruro de calcio descritas en la bibliografía. Los resultados obtenidos en los estos estudios preliminares de preparación de nanopartículas de alginato reticulado a partir de nano-emulsiones ofrecen grandes posibilidades en cuanto al desarrollo de nuevas formas de dosificación de principios activos, debiéndose profundizar en la optimización del método de preparación, en la caracterización y en la estabilidad de las mismas, así como en la eliminación del componente oleoso y tensioactivos y posterior resuspensión en medio acuoso.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## 6. BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abbas S.S., Schaalán M.F., Bahgat A.K., El-Denshary E.S. Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats. *Sci. World Journal*, 1–9, 2014.
- Ahmad Z., Khuller G.K. Alginate-based sustained release drug delivery systems for tuberculosis. *Expert Opinion Drug Delivery* 5, 1323–1334, 2008.
- Alban S., Schauerte A., Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure-activity relationships of new pullulan sulfates. *Carbohydrate Polymer* 47, 267–276, 2002.
- Allen T.M., Cullis P.R. Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* (303): 1818-1822, 2004.
- Amselem S., Friedman D. Submicron emulsions as drug carriers for topical administration, in: S. Benita (Ed.), *Submicron emulsions in drug targeting and delivery*, Harwood Academic Publishers, London, pp. 153– 173, 1998.
- Anton N., Benoit J.P., Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review. *Journal of Controlled Release* 128, 185–199, 2008.
- Antonietti M., Landfester K. Polyreactions in miniemulsions. *Prog. Polym. Sci.* 27, 689–757, 2002.
- Aronson M.P., Petko M.F. Highly concentrated water-in-oil emulsions: Influence of electrolyte on their properties and stability. *Journal of Colloid and Interface Science* 159 (1), 134-149, 1993.
- Arvidson N.G., Gudbjornsson B., Elfman L., Ryden A.C., Totterman T.H., Hallgren R. Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 53 (8), 521-524, 1994.
- Asua J.M. Miniemulsion polymerization. *Prog. Polym. Sci.* 27, 1283–1346, 2002.
- Audrey D. Tesis doctoral: Emulsions formulées avec des particules de silice: caractérisation, stabilité, transfert de matière. Université de Technologie de Compiègne, 2009.
- Augst A.D., Kong H.J., Mooney D.J. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol. Bioscience* 6, 623–633, 2006.



Aulton M.E. *Pharmaceutics: The science of dosage form design*. 2nd ed. Madrid: Elsevier, 251-252, 2003.

Auriemma G., Del Gaudio P., Barba A.A., d'Amore M., Aquino R.P. A combined technique based on prilling and microwave assisted treatments for the production of ketoprofen controlled release dosage forms. *Int. J. Pharm.* 415 (1–2), 196 – 205, 2001.

Avdeef A., Berger C.M., Brownell C. pH-Metric Solubility. 2: Correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods. *Pharmaceutical Research* 17, 85-89, 2000.

Azarmi S. In situ cross-linking of polyanionic polymers to sustain the drug-release of acetazolamide tablets. *Pharm. Ind*, 63(9), 877–881, 2003.

## B

Babak V., Stébé M.J., Fa N. Physico-chemical model for molecular diffusion from highly concentrated emulsions. *Mendeleev Commun* 13(6), 254–256, 2003.

Banker G.S. *Drug Products: Their role in the treatment of disease, their quality, and their status and future as drug-delivery systems*. Mod. Pharm. 4th ed., Elsevier. New York, p. 1–21, 2002.

Barbetta A., Cameron N.R. Morphology and Surface Area of Emulsion-Derived (PolyHIPE) Solid Foams Prepared with Oil-Phase Soluble Porogenic Solvents: Three-Component Surfactant System. *Macromolecules* 37, 3202-3213, 2004.

Barbetta A., Carnachan R. J., Smith K. H., Zhao C. T., Cameron N. R., Katakly R., Hayman M., Przyborski S. A., Swan M. Porous polymers by emulsion templating. *Macromol. Symp.* 226, 203-211, 2005.

Barbetta A., Barigelli E., Dentini M. Porous Alginate Hydrogels: Synthetic Methods for Tailoring the Porous Texture, *Biomacromolecules* 10, 2328–2337, 2009.

Barby D., Haq Z. Low density porous cross-linked polymeric materials and their preparation. Unilever. European Patent 0060138, 1982.

Barby D., Haq Z. U.S. Patent, 4,522,953, 1985.

Bartl V.H. Uber die polymerization in umgekehrter emulsion. *Macromolecular Chemistry and Physics* 57, 74-95, 1962.

BASF 2006. Información técnica.

- Bazylińska U., Pietkiewicz J., Saczko J., Nattich-Rak M., Rossowska J., Garbiec A., Wilk K. A. Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 47 (2), 406–420, 2012.
- Becher, P. *Emulsiones. Teoría y Práctica*. Editorial Blume. Madrid, 1972.
- Bennett J., Stanciu C. Alginate/antacid in the reduction of gastroesophageal reflux. *Lancet* 303, 109–11, 1974.
- Bhowmik B.B., Sa B., Mukherjee A. Preparation and in vitro characterization of slow release testosterone nanocapsules in alginates. *Acta Pharm.* 56(4), 417–429, 2006.
- Bidarra S.J., Barrias C.C., Granja P.L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater.* 10, 1646–1662, 2014.
- Blin J.L., Bleta R., Ghanbaja J., Stébé M.J. Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous-mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores. *Microporous and Mesoporous Materials* 94, 74-80, 2006.
- Bodmeier R., Wang J. Microencapsulation of drugs with aqueous colloidal polymer dispersions. *J. Pharm. Sci.* 82, 191–194, 1993.
- Borges O., Borchard G., Verhoef J.C., De Sousa A, Junginger H.E. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int. J. Pharm* 299,155–66, 2005.
- Brunauer S., Emmett P. H., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60 (2), 309-319, 1938.
- Busby W., Cameron N. R., Jahoda C. A. B. Tissue engineering matrixes by emulsion templating. *Polym. Int.* 51, 871–881, 2002.

## C

- Cafaggi S., Russo E., Stefani R., Leardi R., Caviglioli G., Parodi B. Preparation and evaluation of nanoparticles made of chitosan or N-trimethyl chitosan and a cisplatin---alginate complex. *J. Control Release* 121, 110–123, 2007.
- Calderó G., García-Celma M.J., Solans C., Plaza M., Pons R. Influence of composition variables on the molecular diffusion from highly concentrated water-in-oil emulsions (gel-emulsions). *Langmuir* 13,385–390, 1997.

- Calderó G., García-Celma M.J., Solans C., Stébé M.J., Ravey J.C., Rocca S. Diffusion from hydrogenated and fluorinated gel-emulsion mixtures. *Langmuir* 14, 1580–1585, 1998.
- Calderó G., García-Celma M.J., Solans C., Pons R. Effect of pH on mandelic acid diffusion in water in oil highly concentrated emulsions (gel-emulsions). *Langmuir* 16, 1668–1674, 2000.
- Calderó G., Llinàs M., García-Celma M.J., Solans C. Studies on controlled release of hydrophilic drugs from W/O high internal phase ratio emulsions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 99 (2), 701-71, 2010.
- Calderó G., García-Celma M.J., Solans C. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *Journal of Colloid & Interface Science* 353 (2), 406-411, 2011.
- Calderó G., Patti A., Llinàs M., García-Celma M.J. Diffusion in highly concentrated emulsions, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17, 255–260, 2012.
- Calderó G., Montes R., Llinàs M., García-Celma M.J., Porras M., Solans C. Studies on the formation of polymeric nano-emulsions obtained via low-energy emulsification and their use as templates for drug delivery nanoparticle dispersions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 145, 922–931, 2016.
- Cameron N.R., Sherrington, D.C. Synthesis and Characterization of Poly(aryl ether sulfone) PolyHIPE Materials. *Macromolecules* 30(19), 5860-5869, 1997.
- Cameron N.R. High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers. *Polymer* 46, 1439-1449, 2005.
- Cameron N.R., Silverstein M.S. Colloidal templating. Porous polymer. John Willey & Sons. New York, p.119-172, 2011.
- Canal C., Aparicio R.M., Vílchez A., Esquena J., García-Celma M.J. Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams. *Journal Pharm. Pharmaceutical Sci.* 15 (1), 197-207, 2012.
- Capdevila M., Maestro A., Porras M., Gutiérrez J.M. Preparation of Span 80/oil/water highly concentrated emulsions: Influence of composition and formation variables and scale-up. *Journal of Colloid and Interface Science* 345 (1), 27-33, 2010.
- Ceglia G., Merlin A., Viot O., Schmitt V., Mondain-Monval O. Porous materials with tunable mechanical properties. *Journal of Porous Materials* 21, 903-912, 2014.
- Chen H.H., Ruckenstein E. Correlation between the stability of concentrated emulsions and the interfacial free energy between the two phases. *Journal of Colloid and Interface Science* 138 (2), 473-479, 1990.

Chickering D., Jacob J., Mathiowitz E. Bioadhesive microspheres II. Characterization and evaluation of bioadhesion involving hard, bioerodible polymers and soft tissue. *React. Polym.* 25,189–206, 1995.

Clark D.E., Green H.C. Alginic acid and process of making same. US Patent 2036922, 1936.

Coleman R.J., Lawrie G., Lambert L.K., Whittaker M., Jack K.S., Grndahl L. Phosphorylation of alginate: Synthesis, characterization, and evaluation of in vitro mineralization capacity. *Biomacromolecules* 12,889–897, 2011.

Cooperación Técnica Belga (CTB). *Vademécum Farmacoterapéutico del Ecuador. Proyecto Salud de Altura.* Quito, pp 205, 2008.

Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 21-23, 2013.

## D

De Campos V. E. B., Ricci Jr. E., Mansur C. R. E. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 12 (3), 2881–2890, 2012.

Del Gaudio P., Russo P., Lauro M.R., Colombo P., Aquino R.P. Encapsulation of Ketoprofen and Ketoprofen Lysinate by Prilling for Controlled Drug Release. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 10 (4), 2009.

Dettmar P.W., Strugala V., Tselepis C. The effect of alginates on deoxycholic-acid induced changes in esophageal mucosal biology at pH 4. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 18 (3), 317–333, 2007.

Domínguez-Gil A., Martín A. *Avances en Tecnología farmacéutica*, en: C. Avendaño, J. Tamargo (Eds.), *Nuevos avances en medicamentos.* Instituto de España, Real Academia Nacional de Farmacia. Realigraf, S.A. Madrid, 2004, pp. 57-121.

Draget K.I., Smidsrød O., Skjåk-Bræk G. Alginates from algae, en (Steinbüchel A., Rhee, S.K., eds.) *Polysaccharides and Polyamides in the Food Industry. Properties, production and patents.* Wiley-VCH, Weinheim, 1-30, 2005.

Draget K.I. *Alginates: Handbook of Hydrocolloids*, 2a. edición. Woodhead. Cambridge, 379–395, 2009.

## E

El-Aasser M.S., Miller C.M. Preparation of latexes using miniemulsions, en: J.M. Asua (Ed.), *Polymeric dispersions: principles and applications*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, pp. 109– 126, 1997.

El-Aasser M.S., Sudol E.D. Miniemulsions: overview of research and applications. *Journal of Coatings Technology Research* 1 (1), 21–31, 2004.

Esquena J., Sankar, Solans C. Highly Concentrated W/O Emulsions Prepared by the PIT Method as Templates For Solid Foams. *Langmuir* 19, 2983–2988, 2003.

Esquena J., Solans C. Highly concentrated emulsions as templates for solid foams. *Emulsions and Emulsions Stability*. Taylor & Francis (Surfactant Science Series, vol. 132). Boca Raton, FL (USA), 2006.

## F

Fagerlund G. Determination of specific surface by the BET method. *Matériaux et Construction* 6 (3), 239-245, 1973.

Fathy M. Ca-alginate beads loaded with meloxicam: effect of alginate chemical composition on the properties of the beads and the ulcerogenicity of the drug. *J Drug Deliv. Sci. Technol.* 16(3), 183-189, 2006.

Ferry J.D. *Viscoelastic properties of polymers*, 3rd edition. New York. John Wiley & sons, Inc. 1980.

Forgiarini A., Esquena J., González C., Solans C. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. *Langmuir* 17, 2076-2083, 2001.

Fornaguera C., Dols-Pérez A., Calderó G., García-Celma M.J., Camarasa J., Solans C. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood-brain-barrier. *Journal of Controlled Release* 211, 134-143, 2015.

Friberg S.E., Goldsmith L., Hilton M. Theory of emulsions en: Lieberman H.A., Rieger M.M., Banker G.S., *Pharmaceutical Dosage Forms: Dispersed Systems*. V.1., 2ª edición. Marcel Dekker. New York, 49-91, 1988.

Fulton J.E. Comedogenicity and irritancy of commonly used ingredients in skin care products. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 321-323, 1989.

## G

- Ganguly S., Krishna Mohan V., Jyothi Bhasu V.C., Mathews E. Surfactant-electrolyte interactions in concentrated water-in-oil emulsions: FT-IR spectroscopic and low-temperature differential scanning calorimetric studies. *Colloids & Surfaces* 65, 243-256, 1992.
- García-Celma M.J., Homs M, Morales D., Solans C. Nano-emulsions for Pharmaceutical Applications, en: Sánchez-Domínguez, M., Rodríguez-Abreu C. (eds.), *Nanocolloids: A meeting point for scientists and technologists*. Elsevier, Amsterdam, pp. 365-388, 2016.
- Gawel M., Librowski T., Lipkowska A. Influence of zinc hydroaspartate on the anti-inflammatory and gastric activity of ketoprofen in rats. *Pharmacol. Rep.* 65(1),214–219, 2013.
- George M., Abraham T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan - a review. *J Control Release* 114, 1–14, 2006.
- Ghosh G., Vílchez A., Esquena J., Solans C., Rodríguez-Abreu C. Preparation of ultra-light magnetic nanocomposites using highly concentrated emulsions. *Materials Chemistry and Physics* 130, 786– 793, 2011.
- Goh C.H., Heng P.W.S., Chan L.W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr. Polym.* 88, 1–12, 2012.
- Gombotz W.R., Pettit D.K. Reviews Biodegradable Polymers for Protein and Peptide Drug Delivery. *Bioconjugate Chem.* 6, 332-351, 1995.
- Gombotz W.R., Wee S.F. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Deliv. Rev.* 64,194–205, 2012.
- Grant G., Morris E., Rees D., Smith P., Thom D., Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg – box model. *Febs Letters* 32, 1, 1973.
- Griffin W.C. Classification of surface-active agents by “HLB”. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1, 311, 1949.
- Guimarães A.P., Maia D.A.S., Araújo R.S., Cavalcante C.L., de Sant'Ana H.B. Destabilization and recuperability of oil used in the formulation of concentrated emulsions and cutting fluids. *Chem Biochem Eng Q* 24(1), 43–49, 2010.

Guy R.H., Hadgraft J. Selection of drug delivery, Hadgraft J and Guy R.H., eds., *Transdermal Drug Delivery*. Marcel Dekker, New York, 75-76, 1989.

## H

Hainey P., Huxham I.M., Rowatt B., Sherrington D.C., Tetley L. Synthesis and ultrastructural studies of styrene-divinylbenzene Polyhipe polymers. *Macromolecules* 24(1), 117-121, 1991.

Hans E., Junginger H.E. Ointments and creams, in: *Colloidal Drug Delivery Systems (Drugs and the Pharmaceutical Sciences Series, vol. 66)*. Marcel Dekker. New York, 1994.

Hanson W.A. Theoretical concepts. *Handbook of Dissolution Testing*. Pharmaceutical Technology Publications. Oregon. Pág. 4. 1989.

Harvey S.C., A. Osol (Ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, PA, p.1153, 1980.

Huang M.H., Huang C.I., Lin S.C., Chen J.H., Ku C.C., Chou A.H., Liu S.J., Chen H.W., Chong P., Leng C.H. Enhancement of potent antibody and T-cell responses by a single dose, novel nanoemulsion formulated pandemic influenza vaccine. *Microbes and Infection* 11, 654-660, 2009.

Huang X., Zhang X., Wang X., Wang C., Tang B. Microenvironment of alginate-based microcapsules for cell culture and tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114, 1-8, 2012.

## I

Iannuccelli V., Coppi G., Leo E., Fontana F., Bernabei M.T. PVP solid dispersions for the controlled release of furosemide from a floating multiple-unit system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 26, 595-603, 2000.

Inkson B.J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. In *Materials Characterization Using Nondestructive Evaluation (NDE) Methods*. G. Huebschen, I. Altpeter, R. Tschuncky and H.G. Herrmann, eds. Elsevier. Cambridge, 17-43, 2016.

Israelachvili J.N., Mitchell D.J., Ninham B.W. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 2: Molecular and Chemical Physics* 72, 1525-1568, 1976.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Manual of Colloid and Surface Chemistry. Butterworths, London, 1971.

Izquierdo P., Esquena J., Tadros T. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversión temperatura method. *Langmuir* 18 (1), 26-30, 2002.

Izquierdo P., Esquena J., Tadros T., Dederen J.C, Feng J., García-Celma M.J., Azemar N., Solans C. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversión temperatura method. *Langmuir* 20, 6594-6598, 2004.

## J

Jain A. S., Khachane P. V, Shah S. M., Nagarsenker M. S. Nanoemulsions: a potential delivery system. *Pharma Rev.* 9 (54), 113–119, 2011.

Joscelyne S.M., Tradardh G. Membrane emulsification: a literature review. *J. Memb. Sci.* 169, 107-117, 2000.

## K

Kansal S., Tandon S., Verma R., Misra A., Choudhary P., Verma A.K., Verma R., Dube P.R., Mishra P.R. Coating doxorubicin-loaded nanocapsules with alginate enhances therapeutic efficacy against Leishmania in hamsters by inducing Th1-type immune responses. *British Journal of Pharmacology* 171, 4038–4050, 2014.

Kantor T.G. Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 6(3), 93-102, 1986.

Khan K., Rhodes C. A comparative evaluation of some alginates as tablet disintegrants. *Pharm Acta Helv* 47,41–50, 1972.

Koroleva M., Yurtov E.V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ. Chem. Rev.* 81 (1), 21-43, 2012.

Krefting A., Ohristiania O.F. Process of treating seaweed. Patente N. US598790, Norway, 1898.

Kristiansen K., Schirmer B., Aachmann F., Skjåk G., Draget K., Bjørn E. Novel alginates prepared by independent control of chain stiffness and distribution of G-residues: Structure and gelling properties. *Carbohydrate Polymers* 77, 725–735, 2009.



- Kunieda H., Solans C., Shida N., Parra J.L. The formation of gel-emulsions in a water/ Nonionic Surfactant/ Oil System. *Colloids and Surfaces*, 24, 225-237, 1987.
- Kunieda H., Yano N., Solans C. The stability of gel-emulsions in a water/nonionic surfactant/oil system. *Colloids and Surfaces* 36, 313-322, 1989.
- Kunieda H., Evans D.F., Solans C., Yoshida M. The structure of gel-emulsions in a water/nonionic surfactant/oil system. *Colloids & Surfaces* 47, 35-43, 1990.
- Kunieda H., Tanimoto M., Shigeta K., Rodríguez C. Highly concentrated cubic-phase emulsions: basic study on D-phase emulsification using isotropic gels. *J. Oleo Sci.* 50, 633-640, 2001.
- Kuo C.K., Ma P.X. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 22, 511–521. 2001.
- Kurt I. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications, *Food Hydrocolloids* 25, 251–256, 2011.

## L

- Landfester K., Willert M., Antonietti M. Preparation of polymer particles in nonaqueous direct and inverse miniemulsions. *Macromolecules* 33 (7), 2370–2376, 2000.
- Lee K.Y., Mooney D.J. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 37, 106–126, 2012.
- Lertsutthiwong P., Noomun K., Jongaroonngamsang N., Rojsitthisak P., Nimmannit U. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*. 74, 209–214, 2008.
- Lissant K. The geometry of high-internal-phase-ratio emulsions . *J. Colloid Interface Sci.* 22, 462–468, 1966.
- Lissant K. *Emulsions and emulsion technology. Part I.* Marcel Dekker. New York, 1974.
- Liu C.H., Yu S.Y. Cationic nanoemulsions as non viral vectors for plasmid DNA delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 79, 509-515, 2010.
- Liu J., Zhang Y., Wang C., Xu R., Chen Z., Gu N. Magnetically sensitive alginate templated polyelectrolyte multilayer microcapsules for controlled release of doxorubicin. *J. Phys. Chem.* 114,7673–7679, 2010.

Llinàs M. Estudi d'emulsions altament concentrades com a sistemes d'alliberació controlada de principis actius, Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, 2010.

Llinàs M., Calderó G., García-Celma M.J., Patti A., Solans C. New insights on the mechanisms of drug release from highly concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 394, 337-345, 2013.

## M

Maekawa H., Esquena J., Bishop S., Solans C., Chemlka B.F. Meso/macroporous inorganic oxide monoliths from polymer foams. *Adv Mater* 15 (7–8), 592–596, 2003.

Malmborg C., Topgaard D., Soderman O. Diffusion in inhomogeneous system : NMR studies in diffusion in highly concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 263 ,270-276, 2003.

Mason G. Determination of the pore-size distributions and pore-space interconnectivity of vikor porous glass and adsorption-desorption hysteresis capillary condensation isotherms. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* 415 (1849), 453-486, 1988.

Matsumoto S., Kita Y., Yonezawa D. An attempt at preparing wáter-in-oil-in-water multiple-phase emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 57, 353-361, 1976.

Miller C.A. Spontaneous emulsification produced by diffusion: a review. *Colloids and Surfaces* 29, 89-102, 1988.

Miras J., Vílchez S., Solans C., Esquena J. Chitosan macroporous foams obtained in highly concentrated emulsions as templates. *Journal of Colloid and Interface Science* 410, 33-42, 2013a.

Miras J., Vílchez S. Solans C., Tadros T., Esquena J. Kinetics of chitosan hidrogel formation in high internal phase oil-in-water emulsions (HIPEs) using viscoelastic measurements. *Soft Matter* 9, 8678-8686, 2013b.

Mirghani A., Idkaidek N.M., Salem M.S., Najib N.M. Formulation and release behavior of diclofenac sodium in Compritol 888 matrix beads encapsulated in alginate. *Drug Dev Ind Pharm* 26, 791–795, 2000.

Moglia R. Injectable PolyHIPEs as High-Porosity Bone Grafts. *Biomacromolecules* 12, 3621–3628, 2011.

Morales D., Gutiérrez J.M., García-Celma M.J., Solans C. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir* 19, 7196-7200, 2003.

Morral-Ruiz G., Solans C., García M.L., García-Celma, M.J. Formation of pegylated polyurethane and lysine-coated polyurea nanoparticles obtained from O/W nano-emulsions. *Langmuir* 28 (15), 6256-6264, 2012.

Morral-Ruiz G., Melgar-Lesmes P., Solans C., García-Celma M.J. Multifunctional polyurethane-urea nanoparticles to target and arrest inflamed vascular environment: A potential tool for cancer therapy and diagnosis. *Journal of Controlled Release* 171, 163-171, 2013.

Morral-Ruiz G., Melgar-Lesmes P., López-Vicente A., Solans C., García-Celma M.J. Biotinylated polyurethane-urea nanoparticles for targeted theranostics in human hepatocellular carcinoma *Nano Research* 8(5): 1729–1745, 2015.

## N

Nakajima H. Microemulsions in cosmetics, in: C. Solans, H. Kunieda (Eds.), *Industrial applications of microemulsions*. Marcel Dekker. New York, pp. 175– 197, 1997.

Nelson W.L., Cretcher L.H. The Alginic Acid from *Macrocystis Pyrifera*. *J. Am. Chem. Soc.* 51, 1914–1922, 1929.

Nielsen N.S., Petersen A., Meyer A.S., Timm-Heinrich M., Jacobsen Ch. Effects of lactoferrin, phytic acid, and EDTA on oxidation in two food emulsions enriched with long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Agric Food Chem* 52, 7690–7699, 2004.

Nussinovitch A., Gershon Z. Alginate oil-sponges. *Food Hydrocolloids* 11(3),281-286, 1997.

## O

Orive G., Tam S.K., Pedraz J.L., Halle J.P. Biocompatibility of alginate-poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials* 27, 3691-3700, 2006.

Ouwerx C., Velings N., Mestdagh M.M., Axelos M.A.V. Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. *Polymer Gels and Networks* 6, 393–408, 1998.

Ozawa K., Solans C., Kunieda H. Spontaneous formation of highly concentrated oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 188, 275-281, 1997.

## P

Paques J.P., Van Der Linden E., Van Rijn C.J.M., Sagis L.M.C. Preparation methods of alginate nanoparticles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 209, 163–171, 2014.

Pasparakis G., Bouropoulos N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. *Int. J. Pharm.* 323, 34–42, 2006.

Pawar S.N., Edgar K.J. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* 33, 3279–3305, 2012.

Peppas, N. Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering and mathematical modeling helped the field mature. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 5-9, 2013.

Podlogar F., Rogac M., Gasperlin M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Imwitor 308- IPM microemulsions on ketoprofene release. *International Journal of Pharmaceutics* 302, 68-77, 2005.

Pons R., Ravey J.C., Sauvage S., Stébé M.J., Erra P., Solans C. Structural studies on gel emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 76, 171-177, 1993.

Pons R., Carrera I., Erra P., Kunieda H., Solans C. Novel preparation method for highly concentrated water-in-oil emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 91, 259-266, 1994.

Pons R., Caldero G., Garcia M.J., Azemar N., Carrera I., Solans C. Transport properties of W/O highly concentrated emulsions (gel-emulsions). *Prog Colloid Sci.* 100, 132–136, 1996.

Princen H.M. Rheology of foams and highly concentrated emulsions. Elastic properties and yield stress of a cylindrical model system. *J. Colloid Interface Sci.*, 91, 160-175, 1983.

Princen H.M., Kiss A.D. Osmotic pressure of foams and highly concentrated emulsions. 2. Determination from the variation in volume fraction with height in an equilibrated column. *Langmuir* 3, 36-41, 1987.

## R

- Rajaonarivony M., Vauthier C., Courraze G., Puisieux F., Couvreur P. Development of a new drug carrier made from alginate. *Journal of Pharmaceutical Science* 82 (9) 9, 912-917, 1993.
- Rasmussen M.R., Snabe T., Pedersen L.H. Numerical modelling of insulin and amyloglucosidase release from swelling Ca-alginate beads. *J. Control Release* 91, 395–405, 2003.
- Raymond C. R., Paul J. S. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6<sup>a</sup> ed. Pharmaceutical Press, London, 20-2, 83-5, 622-4, 2009.
- Richez A., Deleuze H., Vedrenne P., Collier, R., 2005. Preparation of ultra-low-density microcellular materials. *Journal of Applied Polymer Science* 96(6), 2053-2063, 2005.
- Rocca S., Muller S., Stébé M. J. Release of a Model Molecule from Highly Concentrated Fluorinated Reverse Emulsions: Influence of Composition Variables and Temperature. *J. Controlled Release* 61, 251–265, 1999.
- Rodríguez C., Shigeta K., Kunieda H. Cubic phase based concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 223, 197-204, 2000.
- Roig F. Hidrogels i materials porosos d'acid hialurònic entrecreuat com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona, 2016.
- Roig F., Solans C., Esquena J., García-Celma M.J. Preparation, Characterization, and Release Properties of Hydrogels Based on Hyaluronan for Pharmaceutical and Biomedical Use. *Journal of Applied Polymer Science* 130, 1377-1382, 2013.
- Rowe R.C., Sheskey P.J., Weller, P., eds. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 7th edition. Pharmaceutical Press, London, 2012.
- Ruckenstein E., Kim J.K. Polymerization in gel-like emulsions. *Journal of Applied Polymer Science* 36, 907-923, 1988.
- Ruckenstein E., Park J.S. Stable Concentrated Emulsions as Precursors for Hydrophilic Hydrophobic Polymer Composites. *Polymer*, 33, 405-417, 1992.
- Ruvinov E., Cohen S. Alginate biomaterial for the treatment of myocardial infarction: Progress, translational strategies, and clinical outlook. *Advanced Drug Delivery Reviews* 96, 54-76, 2015.

## S

- Sadurní N., Solans C., Azemar N., García-Celma M.J. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26 (5), 438-445, 2005.
- Sakeena M.H.F., Elrashid S.M., Muthanna F.A., Gassan Z.A., Kanakal M.M., Laila L., Munavvar A.S., Azmin M.N. Effect of limonene on permeation enhancement of ketoprofen in palm oil esters nano-emulsions. *Journal of Oleo Science* 59 (7), 395-400, 2010.
- Sarfaraz N. *Handbook of Pharmaceuticals Manufacturing Formulations: Compressed Solid*, (Care Informa Health ed.), CRC Press LLC. Ed., 2004.
- Sarmiento B., Ferreira D.C., Jorgensen L., Van de Weert M. Probing insulins secondary structure after entrapment into alginate/chitosan nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65, 10–17, 2007a.
- Sarmiento B., Ribeiro A.J., Veiga F., Ferreira D.C., Neufeld R.J. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate Ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7, 2833–2841, 2007b.
- Seifriz W. Studies in emulsions, III-V. *J. Phys. Chem.* 29, 738-749, 1925.
- Senni K., Pereira J., Gueniche F., Delbarre-Ladrat C., Siquin C., Ratiskol J. Marine polysaccharides: A source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering. *Mar Drugs* 9, 1664–1681, 2011.
- Shapiro L., Cohen S. Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 18, 583–590, 1997.
- Sharp P.A., Langer R. Promoting convergence in biomedical science. *Science* 333, 521-522, 2011.
- Sherman P. Rheological properties of emulsions, in: Becher P. (ed.), *Encyclopedia of emulsion technology*, v.1. Basic Theory. Marcel Dekker. New York, 416-422, 1968.
- Shinoda K., Saito H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary systems composed of water, cyclohexane and nonionic surfactant. *Journal of Colloid and Interfacial Science* 26, 70-74, 1968.
- Shinoda K., Saito H. The stability of O/W type emulsions as function of temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT method. *Journal of Colloid and Interfacial Science* 30 (2), 258-263, 1969.

- Sikora E., Llinàs M., García-Celma M.J., Escribano E., Solans C. Transdermal delivery of forskolin from emulsions differing in droplet size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 126, 541-545, 2015.
- Silverstein M.S.. PolyHIPEs: Recent advances in emulsion-templated porous polymers. *Progress in Polymer Science* 39 (1), 199-234, 2014.
- Sing K.S.W., Everett D.H., Hault R.A.W. Reporting Physisorption Data for Gas/Solid System with special reference to determination of surface area and porosity. *International Union of Pure and Applied Chemistry* 57 (4), 603-619, 1985.
- Sjöblom J. *Encyclopedic handbook of emulsion technology*. New York : Marcel Dekker; 2001.
- Skjak-Braek G., Grasdalen H., Smidsrod O. Inhomogeneous Polysaccharide Ionic Gels. *Carbohydrate Polymers* 10, 31-54, 1989.
- Solans C., Comelles F., Azemar N., Sánchez Leal J., Parra J.L. Emulsiones-gel con elevado contenido en agua: formación y propiedades. *Jorn. Com. Esp. Deterg.*, 17, 109-122, 1986.
- Solans C., Domínguez J.G., Parra J.L., Heuser J., Friberg S.E. Gelled emulsions with a high water content. *Colloid and Polymer Science* 266, 570-574, 1988.
- Solans C., Esquena J., Forgiarini A., Morales D., Usón N., Izquierdo P. Nano-emulsions: formation and properties, in: D. Shah, B. Moudgil, K.L. Mittal (eds.), *Surfactants in solutions: fundamentals and applications*. Surfactants Science Series, Marcel Dekker, Ney Work, 525-554, 2002.
- Solans C., Esquena J., Azemar N. Highly concentrated (gel) emulsions, versatile reaction media. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 8, 156-163, 2003.
- Solans C., Esquena J., Azemar N., Rodríguez C., Kunieda H. Highly concentrated (gel) emulsions: Formation and properties, in: Petsev D.N., (Ed.), *Emulsions: Structure, stability and interactions*. Elsevier: Amsterdam: 511-555, 2004.
- Solans C., Izquierdo P., Nolla J., Azemar N., Garcia-Celma M.J. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 10, 102 – 110, 2005.
- Solans C., Solè I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 17, 246-254, 2012.
- Solé I., Solans C., Maestro A., González C., Gutiérrez J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 376 (1), 133-139, 2012.
- Stanford, E. C. C., British patent no. 142, 1881.

Sutradhar K.B., Amin L. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. *Eur. J. Nanomedicine* 5 (2), 97–110, 2013.

Swain S., Behera A., Beg S.N., Patra C.C., Dinda S., Sruti J. Modified Alginate Beads for Mucoadhesive Drug Delivery System: An Updated Review of Patents. *Recent Pat Drug Deliv. Formul.* 6, 1-19, 2012.

Swetman S.C. *Martindale The Complete Drug Reference*, 37a edition. Pharmaceutical Press. London, 2011.

## T

Tadros Th.F., Vincent B., *Encyclopedia de emulsion technology* (edited by Becher P.), Marcel Dekker 1, 1-56, 1983.

Tadros, Th.F., Izquierdo P., Esquena J., Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108, 303– 318, 2004.

Taylor P. Ostwald ripening in emulsions. *Advances in Colloids and Interfacial Science* 75 (2), 107-163, 1998.

Tønnesen H.H., Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 28, 621–630, 2002.

Torchilin V.P. Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58, 1532-1555, 2006.

Torre M.L., Giunchedi P., Maggi L., Stefli R., Machiste E.O., Conte U. Formulation and characterization of calcium alginate beads containing ampicillin. *Pharm. Dev Technol.* 3, 193–198, 1998.

## U

Uddin M.D.H., Rodríguez C., Watanabe K., López-Quintela A., Kato T., Furukawa H., Harashima A., Kunieda H. Phase behavior and formation of reverse cubic phase based emulsion in water/poly(oxyethylene)poly(dimethylsiloxane) surfactants/silicone oil system. *Langmuir* 17, 5169-5175, 2001.

Usón N., García M.J., Solans C. Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 250, 415–421, 2004.



## V

Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K., Kim S. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 269-281, 2015.

Veski P. Biopharmaceutical evaluation of pseudoephedrine hydrochloride capsules containing different grades of sodium alginate. *Int. J. Pharm.* 111, 171–179, 1994.

## W

Whitehead L., Collett J.H., Fell J.T. Amoxicillin release from a floating dosage form based on alginates. *Int. J. Pharm.* 210, 45–49, 2000.

WHO Model List of Essential Medicines (April 2015), 19th edition, p. 9 , 2015.

Williams J.M., Wroblewski D.A. Spatial-Distribution of the Phases in Water-in-Oil Emulsions. Open and Closed Microcellular Foams from Cross-Linked Polystyrene. *Langmuir* 4, 656-662, 1988.

Wong L.L.C., Villafranca P.M.B., Menner A. Hierarchical polymerized high internal phase emulsions synthesized from surfactant-stabilized emulsion templates. *Langmuir* 29, 5952-5961, 2013.

## Y

Yang, W., Pierstorff, E. Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems. *Journal of Laboratory Automation*, 17(1), 50-58, 2012.

Yu L., Ding J. Injectable hydrogels as unique biomedical materials. *Chem. Soc. Rev.* 37, 1473–1478, 2008a.

Yu C.Y., Jia L.H., Fabrication of nanospheres and vesicles as drug carriers by self-assembly of alginate. *J. Phys. Chem. C* 112, 16774–8, 2008b.

## Z

Zatz J.L., Woodford D.W. Prolonged release of theophylline from aqueous suspensions. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 13 , 2159–2178, 1987.

Zhang Y., Fai H., Leong K.W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 104-120, 2013.

Zhou S., Bismarck A., Steinke J.H.G. Thermo-responsive macroporous scaffolds prepared by emulsion templating. *Macromolecular rapid communications* 33, 1833-1839, 2012.

Zhou S., Bismarck A., Steinke J.H.G., 2013. Ion-responsive alginate based macroporous injectable hydrogels scaffolds prepared by emulsion templating. *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 4736-4736, 2013.

## **WEBGRAFIA:**

[www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net) → Visitada el día 11 de abril del 2015 a las 11:23

[www.aemps.gob.es](http://www.aemps.gob.es) Web de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

<http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c741.htm>