

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

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

Núria Sadurní Gràcia, 2006

1. INTRODUCCIÓ

1.1. NANO-EMULSIONS

1.1.1. DEFINICIÓ, TIPUS I PROPIETATS GENERALS

Les nano-emulsions són emulsions amb una mida de gota molt petita i uniforme, generalment, en l'interval comprés entre els 20 i els 200nm (Solans, 2005). La seva mida característica fa que tinguin una elevada estabilitat cinètica (enfront la sedimentació o el cremat) i els confereix un aspecte transparent o translúcid (Figura 1.1).



Figura 1.1. Nano-emulsions òpticament transparents (a) i translúcides (b) i emulsió convencional (c).

Les nano-emulsions, en tant que emulsions, són dispersions col·loïdals formades per una fase líquida dispersa en una altra fase també líquida, ambdues immiscibles entre elles i estabilitzades, generalment, mitjançant un o més compostos tensioactius (Becher, 1972). Segons el tipus de fase contínua (o externa) i dispersa (o interna) es classifiquen en nano-emulsions de fase externa aquosa (O/W) i de fase externa oliosa (W/O).

Aquest tipus de dispersions col·loïdals es denominen de diferents maneres en la bibliografia: *emulsions submicromètriques* (Benita, 1993; Lundberg, 1997; Sznitowska, 2001) expressió usada en l'àmbit farmacèutic, *miniemulsions* (Ugelstad, 1973; El-Aasser, 1984; El-Aasser, 1997) emprat en el camp de la polimerització, *emulsions ultrafines* (Nakajima, 1983, 1993, 1997), *microemulsions inestables* (Rosano, 1981; Nakajima, 1997), *nanoemulsions* (Nakajima, 1993). Tot i la diversitat de termes utilitzats, la denominació 'nano-emulsió' identifica de manera clara aquest tipus de

dispersions indicant que es tracta d'emulsions de mida de gota en l'interval nanomètric.

L'aspecte transparent de les nano-emulsions juntament amb la baixa viscositat fa que se les relacioni amb les microemulsions. Les nano-emulsions són sistemes termodinàmicament inestables, tot i tenir una elevada estabilitat cinètica, i, per tant, requereixen aportació d'energia per a la seva formació (Walstra, 1983). Aquest és un tret diferencial respecte les microemulsions, doncs aquestes són sistemes termodinàmicament estables, i, per tant, la seva formació és espontània (Danielsson, 1981; Solans, 1997).

1.1.2. INFLUÈNCIA DELS TENSOACTIUS EN LA FORMACIÓ D'EMULSIONS

Per a la formació i estabilització d'emulsions resulta de gran importància la presència de tensioactiu(s) que són molècules amfifíliques que presenten una part liòfila i una altra liòfoba (Winsor, 1948). Aquestes molècules disminueixen la tensió interfacial i, per tant, l'energia requerida per al procés d'emulsificació, i confereixen estabilitat a les gotes de fase dispersa respecte a la coalescència.

Les molècules tensioactives durant l'emulsificació produeixen un gradient de la tensió interfacial caracteritzat per l'elasticitat 'dilacional' o elasticitat de Gibbs, ε , que depèn de la tensió interfacial, γ , i de l'àrea interfacial, A , (Equació 1.1) (Walstra, 1996).

$$\varepsilon = \frac{\delta\gamma}{\delta(\ln A)} \quad \text{Equació 1.1}$$

Els tensioactius tendeixen a difondre cap a àrees amb tensions interfacials més elevades, i juntament amb ells transporten líquid, fase dispersa, donant lloc al que s'anomena efecte Marangoni. D'aquesta manera, l'elasticitat de Gibbs afavoreix el flux de líquid cap a la interfície. Aquest procés evita la coalescència durant l'emulsificació. A més, els tensioactius indueixen 'inestabilitats interfacials' que promouen la formació de gotes.

En alguns estudis s'ha observat que la presència de fases de cristalls líquids laminars i/o fases de microemulsió bicontínua (Wadle, 1993; Forgiarini, 2001; Morales, 2003; Sadurní, 2005) durant el procés d'emulsificació afavoreixen la formació de nano-emulsions de mida petita i uniforme. És per això que resulta de gran importància conèixer el comportament fàsic dels sistemes tensioactius objecte d'estudi.

1.1.3. COMPORTAMENT FÀSIC DE SISTEMES TENSIOACTIUS

L'estudi del comportament fàsic d'un sistema tensioactiu permet obtenir informació global i sistemàtica de les fases que estan en equilibri, del tipus d'agregats moleculars que es formen i de la seva variació enfront la temperatura. Els resultats del comportament fàsic es representen, generalment, mitjançant diagrames de fases, que permeten visualitzar de manera clara la informació experimental obtinguda. L'anàlisi del diagrama de fases proporciona informació de les relacions entre el comportament fàsic i les interaccions entre els components del sistema.

Segons la regla de les fases de Gibbs (Equació 1.2) el nombre de fases (P) que poden coexistir en un sistema depèn del nombre de components del sistema (C) i del nombre de graus de llibertat (F), que són la temperatura, la pressió i la composició.

$$F = C + 2 - P \quad \text{Equació 1.2}$$

1.1.3.1. REPRESENTACIÓ GRÀFICA

La manera més freqüent de representar diagrames de fases de sistemes ternaris és el triangle equilàter. En aquest tipus de representació (Figura 1.2) els dos graus de llibertat que es fixen normalment són la pressió i la temperatura. Cada vèrtex (p.ex. A) representa el 100% d'un dels components, mentre que l'aresta oposada (p.ex. B-C) representa un 0% del mateix. Les arestes del triangle representen composicions formades pels dos components de cada vèrtex. Les composicions de l'interior del triangle (p. ex. D) estan formades pels tres components del sistema. Les composicions

situades sobre una recta que uneix un dels vèrtexs (p.ex. B) al costat oposat tenen una proporció constant dels altres dos components (A i C).

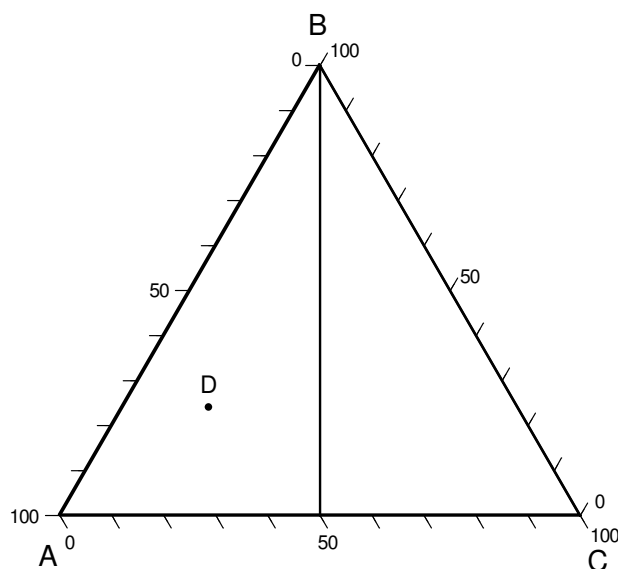


Figura 1.2. Esquema de la representació gràfica d'un diagrama de fases mitjançant el triangle equilàter.

La representació de diversos diagrames de fases ternaris mitjançant el triangle equilàter a diferents temperatures donen lloc a un prisma triangular o prisma de fases. Generalment, es solen determinar seccions del prisma de fases. Una de les seccions més estudiades és la variació de la temperatura enfront la concentració de tensioactiu a una relació aigua/components oliós constant. Aquest tipus de representacions són especialment interessants per a l'estudi de l'emulsificació a composició constant variant la temperatura.

1.1.3.2. TIPUS DE FASES DELS SISTEMES TENLIOACTIUS

Els sistemes tensioactius es distingeixen dels altres sistemes per la gran riquesa de fases (de tipus sòlid, líquid i amb estructura de cristall líquid) que formen. El tipus de fases existents en un sistema tensioactiu depenen de la naturalesa del tensioactiu, de la seva concentració, de la temperatura i de la presència d'additius. Les principals fases líquides i de cristall líquid dels sistemes tensioactius i la nomenclatura que s'utilitzarà en la tesi es resumeixen en la Taula 1.1.

Nomenclatura	Tipus d'estructura	Descripció macroscòpica
L₁	Solució micel.lar o microemulsió directa	Fase isotropa i transparent
L₂	Solució micel.lar o microemulsió inversa	Fase isotropa i transparent
L₃	Estructura esponja	Fase líquida transparent
I₁	Cristall líquid cúbic (estructura micel.lar directa)	Fase isotropa, transparent i molt viscosa
I₂	Cristall líquid cúbic (estructura micel.lar inversa)	Fase isotropa, transparent i molt viscosa
V₁	Cristall líquid cúbic (estructura bicontínua directa)	Fase isotropa, transparent i molt viscosa
V₂	Cristall líquid cúbic (estructura bicontínua inversa)	Fase isotropa, transparent i molt viscosa
L_α	Cristall líquid laminar	Fase anisotropa, lleugerament tèrbola i viscosa
H₁	Cristall líquid hexagonal directe	Fase anisotropa, transparent i viscosa
H₂	Cristall líquid hexagonal invers	Fase anisotropa, transparent i viscosa

Taula 1.1. Nomenclatura, estructura i descripció macroscòpica de les principals fases d'un sistema tensioactiu

Encara que no és comú trobar totes les estructures en un mateix sistema tensioactiu en el sistema aigua/tensioactiu copolímer en bloc tipus òxid etilè-òxid propilè-òxid etilè (OE₁₉OP₄₄OE₁₉)/xilè n'apareixen un gran nombre, com s'observa en la Figura 1.3, on també es mostra l'esquema del tipus d'estructura de cada fase. Això és degut a que els tensioactius copolímers en bloc poden adoptar un rang ampli de curvatures en solució. Així, aquest sistema ternari resulta un bon sistema model per a la descripció de les diferents agregacions de tensioactiu en solució en funció de la concentració de tensioactiu.

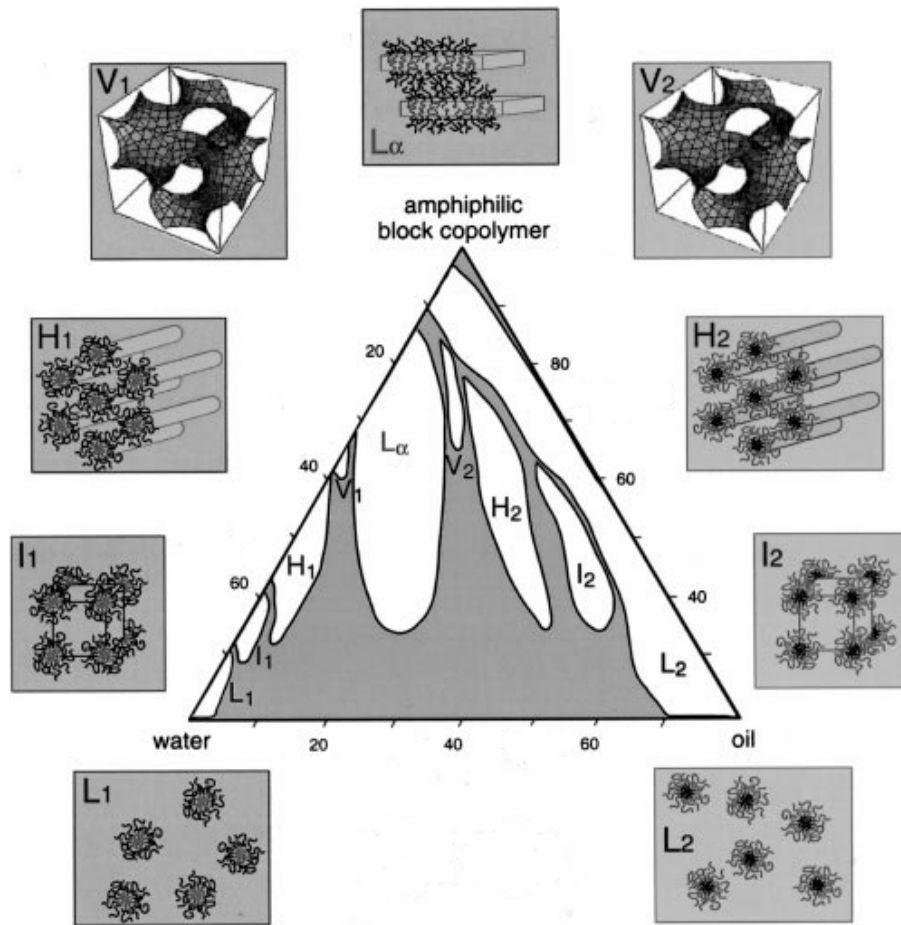


Figura 1.3. Diagrama de fases ternari del sistema aigua/tensioactiu copolímer en bloc/xilè juntament amb l'esquema del tipus d'estructura tensioactiva de cada fase, a 25°C (Alexandridis, 1998).

Descrites de menor a major concentració de tensioactiu en l'aresta aigua-tensioactiu, en primer lloc, es troba una fase de solució micel·lar o microemulsió directa, L₁. L'interior de l'estructura de la micel·la directa està formada per les cadenes lipòfiles de tensioactiu i pel component oliós, mentre la part hidròfila del tensioactiu està orientada cap a l'exterior, en contacte amb la fase polar, l'aigua. La monocapa de tensioactiu en aquesta fase adopta una forta curvatura espontània positiva. En afegir més tensioactiu i més component oliós, es produeix un empaquetament regular de micel·les de mida petita, formant una fase de cristall líquid cúbic, I₁. A diferència d'altres cristalls líquids les fases de cristall líquid cúbic són isotropes, és a dir, no presenten birrefringència. En augmentar la concentració de tensioactiu, les micel·les s'allarguen i formen una estructura de cilindre. Quan la concentració de micel·les cilíndriques augmenta,

aquestes es disposen en estructura hexagonal formant una fase de cristall líquid hexagonal, H_1 , que és anisotropa, transparent i viscosa. El radi de la secció circular d'un cilindre és molt proper a la longitud de la molècula de tensioactiu. A concentracions superiors de tensioactiu, es pot formar una fase bicontínua, V_1 , en la que les molècules de tensioactiu es disposen mitjançant estructures cúbiques interconnectades entre elles. A concentracions superiors de tensioactiu les molècules de tensioactiu s'agrupen en bicapes alternades amb capes d'aigua i d'oli, formant una fase de cristall líquid laminar, L_α . Aquesta estructura és simètrica i presenta una curvatura zero. La fase de cristall líquid laminar és lleugerament tèrbola, anisotropa i viscosa. Les bicapes de tensioactiu poden ser rígides i planes o molt flexibles i ondulades. Si es continua augmentant la concentració de tensioactiu es formen estructures inverses. V_2 , és una fase cúbica bicontínua inversa, i, H_2 , és una fase hexagonal inversa en la que la part hidròfila de la molècula de tensioactiu està orientada cap a l'interior de la micel. la cilíndrica que contindrà l'aigua, les cadenes lipòfiles estan orientades cap a l'exterior. I_2 és una fase de cristall líquid cúbic invers de tipus micel. lar en la que nuclis d'aigua estan envoltats de molècules de tensioactiu. Finalment, L_2 , consisteix en una fase de solucions micel. lars inverses.

1.1.4. MÈTODES D'EMULSIFICACIÓ

L'energia necessària per a la formació de nano-emulsions pot provenir de fonts externes d'energia (homogeneïtzadors d'alta pressió, ultrasons, agitadors d'alta cisalla, etc.), o bé, internes (energia química del sistema). Els mètodes que utilitzen l'energia externa són denominats mètodes de dispersió o d'alta energia, mentre que els mètodes que aprofiten l'energia química emmagatzemada en el sistema són els mètodes de condensació o de baixa energia. S'ha descrit que una combinació d'ambdós mètodes dona lloc a l'obtenció de nano-emulsions de mida de gota molt petita i uniforme (Nakajima, 1997). Com en tota emulsió, per a la formació de nano-emulsions són importants tant l'ordre, la velocitat com la temperatura en la que s'addicionen els components.

1.1.4.1. MÈTODES DE DISPERSIÓ O D'ALTA ENERGIA

Els mètodes de dispersió o d'alta energia són els més utilitzats en la indústria per a la formació de nano-emulsions.

Durant l'emulsificació mitjançant aquests mètodes es produeix un trencament de les gotes. En el cas de la formació de nano-emulsió, aquest trencament requereix una elevada energia i/o concentració de tensioactiu.

L'elevada energia necessària per la formació de nano-emulsions s'entén en considerar la pressió de Laplace, p_L , la qual es defineix com la diferència entre la pressió dins i fora de la gota. La pressió de Laplace depèn de la tensió interfacial, γ , i del radi de gota de l'emulsió, r . Si s'assumeix que les gotes són esfèriques i monodisperses la pressió de Laplace s'expressa segons l'Equació 1.3:

$$p_L = 2 \frac{\gamma}{r} \quad \text{Equació 1.3}$$

Per trencar una gota en gotes de radi més petit cal que sigui fortament deformada. Aquesta deformació augmenta la pressió de Laplace. Conseqüentment, per tal que el trencament es produeixi es necessari l'aport d'una elevada cisalla que prové, generalment, de l'agitació provocada pel líquid dels voltants. Per aconseguir un aport més gran de cisalla cal aplicar més agitació, i, per tant, més energia.

D'altra banda, els tensioactius disminueixen la tensió interfacial, i, per tant, la pressió de Laplace, de manera que l'augment de concentració de tensioactiu redueix l'aport de cisalla necessària pel trencament de les gotes. A més, la possible coalescència de les noves gotes formades deguda a les col·lisions produïdes durant el procés d'emulsificació també és previnguda pels tensioactius.

Els homogeneïtzadors d'alta pressió produeixen l'energia requerida en temps més curts i el flux és més homogeni, donant lloc a dispersions amb mides de gota més petites (Walstra, 1983; Walstra, 1998). Per això, són els aparells

més utilitzats per formar nano-emulsions. Mitjançant aquest mètode, l'emulsió, amb els components prèviament mesclats, es bombejada a alta pressió per una cambra d'interacció. L'emulsió travessa uns microcanals dins la cambra d'interacció, creant-se una zona de turbulència intensa en la que la fase dispersa es trenca en gotes petites i uniformes (Tabibi, 1990). No obstant, no estan descrites mides de gota inferiors als 50nm mitjançant l'ús d'homogeneïtzadors d'alta pressió (Nakajima, 1997).

1.1.4.2. MÈTODES DE CONDENSACIÓ O DE BAIXA ENERGIA

Els mètodes de condensació o de baixa energia es basen en els canvis físico-químics (canvis de curvatura espontània de la capa de tensioactiu, canvis en les forces d'enllaç entre molècules i ions, entre d'altres) que tenen lloc durant les transicions de fases produïdes en els processos d'emulsificació. Aquests mètodes es realitzen, generalment, a temperatura constant variant la composició o bé en una composició constant variant la temperatura. Aquests mètodes permeten la formació nano-emulsions de manera gairebé espontània (Lee, 1982; Sagitani, 1992; Izquierdo, 2001; Uson, 2003; Morales, 2003; Sadurní, 2005).

1.1.4.2.1. Emulsificació a temperatura constant

La formació de nano-emulsions mitjançant les transicions de fases produïdes durant l'emulsificació a temperatura constant ha estat objecte d'estudi en els últims anys (Forgiarini, 2000; Uson, 2003; Sadurní, 2005). Mitjançant aquests mètodes s'han obtingut nano-emulsions O/W i W/O de mida de gota molt petita i uniforme. Els canvis produïts en la curvatura natural del tensioactiu durant el procés d'emulsificació sembla ser un factor clau per a la formació de nano-emulsions per aquests mètodes.

Forgiarini et al. van formar nano-emulsions O/W en el sistema aigua/Brij 30/decà a 25°C mitjançant addicions successives d'aigua a mescles oli/tensioactiu amb l'ajut d'una agitació suau. Les nano-emulsions de mida de gota mitja de 50nm i elevada estabilitat cinètica, es van obtenir per relacions oli/aigua petites, inferiors a 30/70, i un 5% de tensioactiu. Els

autors van descriure que els processos implicats en la formació de nano-emulsions de mida de gota petita i uniforme en aquest sistema eren: la presència de cristall líquid laminar formant part d'una de les fases en equilibri de les nano-emulsions, unes tensions interfacials en equilibri molt baixes i, sobretot, els canvis en la curvatura natural del tensioactiu produïts durant el procés d'emulsificació (Forgiarini, 2001).

Uson et al. van descriure per primer cop la formació de nano-emulsions W/O per addicions successives d'oli a temperatura constant a mesclures tensioactiu/aigua. D'aquesta manera van obtenir nano-emulsions adequades per aplicacions farmacèutiques en sistemes tipus aigua/barrejes de tensioactius no iònics etoxilats/oli mineral amb mides de gota de 60 a 160nm, en composicions amb diferent proporció dels components tensioactius, una relació tensioactiu/aigua de 70/30 i un 85% d'oli. Les nano-emulsions formades es van separar en l'equilibri en una fase de cristall líquid laminar i una fase microemulsió inversa. Durant la formació de les nano-emulsions es produeixen canvis en la curvatura del tensioactiu (d'una microemulsió directa a una fase de cristall líquid laminar) (Uson, 2004). Així mateix s'ha descrit la formació de nano-emulsions W/O de mides de gota de 30 a 120 nm en sistemes similars mitjançant addicions d'aigua a barrejes tensioactiu/oli amb l'ajut d'agitació suau (Porrás, 2004).

1.1.4.2.2. Emulsificació a composició constant (mètode PIT)

Aquest mètode conegut com el mètode de la temperatura d'inversió de fases o mètode PIT fou introduït per Shinoda (Shinoda, 1968). És el mètode d'emulsificació de baixa energia més utilitzat a la indústria.

En sistemes aigua/tensioactiu no iònic etoxilat/component oliós, quan augmenta la temperatura es produeix una deshidratació de les cadenes polioxietilenades dels tensioactius, de manera que el tensioactiu esdevé lipòfil. A temperatures baixes la curvatura espontània de la monocapa de tensioactiu és positiva, formant-se estructures de tipus directe (microemulsions de fase externa aquosa) que poden coexistir amb un excés d'oli. A temperatures elevades la curvatura espontània esdevé negativa de manera que es formen estructures de tipus invers (microemulsions de fase

externa oliosa) que poden coexistir amb un excés d'aigua. A temperatures intermèdies (temperatura del balanç hidròfil-lipòfil o temperatura HLB), la curvatura espontània esdevé propera a zero, formant-se microemulsions bicontínues que solubilitzen quantitats equiparables d'aigua i oli i que coexisteixen amb un excés tant d'aigua com d'oli.

A la temperatura HLB les tensions interfacials entre la fase aquosa i oliosa són molt baixes afavorint-se l'emulsificació mitjançant el trencament de gotes amb l'aport de poca energia (Kunieda, 1981; Bourrel, 1988). No obstant, una baixa tensió interfacial dona lloc a que es produeixi coalescència ràpidament. Per aquest motiu, a la temperatura HLB les emulsions són molt inestables. Per tal d'evitar la coalescència les emulsions s'han de preparar a la temperatura HLB i modificar-la molt ràpidament de 25 a 30°C per sobre (si es volen obtenir emulsions W/O) o per sota (si es volen obtenir emulsions O/W) d'aquesta temperatura. D'aquesta manera, es produeixen emulsions estables cinèticament i amb mides de gota molt petites i monodisperses (Marszall, 1987; Förster, 1995).

Morales et al. van formar nano-emulsions O/W de 40nm de mida de gota en el sistema aigua/C₁₆E₆/oli mineral emulsificant a la temperatura HLB i refredant ràpidament fins a 40°C a partir de composicions d'una fase de microemulsió o de dos fases en l'equilibri (microemulsió i aquosa). Els autors van observar que el requeriment necessari per la formació de nano-emulsions de mida de gota mínima en el sistema consistia en que tot el component oliós i el tensioactiu estiguessin solubilitzats en la microemulsió, independentment de la quantitat d'aigua en excés (Morales, 2003). Així mateix, s'ha descrit la formació de nano-emulsions O/W de mides de gota de 50 a 130 nm en el sistema aigua/C₁₂E₄/hexadecà emulsificant a la temperatura HLB i refredant ràpidament fins a 25°C en composicions amb un 20% de component oliós i a concentracions de tensioactiu superiors a 3,5% (Izquierdo, 2002).

1.1.5. CARACTERITZACIÓ

1.1.5.1. CARACTERITZACIÓ DE NANO-EMULSIONS

Les tècniques utilitzades per mesurar mides de gota dins del rang entre 20 i 200 nm són, principalment, la dispersió de la llum làser i la microscopia electrònica (Finsy, 1994).

1.1.5.1.1. Microscopia electrònica

Mitjançant la microscopia electrònica es poden observar directament totes les gotes presents en una nano-emulsió. D'aquesta manera permet, entre d'altres, determinar la mida de les gotes així com la seva morfologia.

Per tal d'observar mostres mitjançant microscopia electrònica aquestes s'han de pretractar per poder ser sotmeses al buit i també cal que presentin conductivitat elèctrica (Haskell, 1998).

Per tal d'obtenir el màxim avantatge de l'observació de mostres per microscopia electrònica es poden preparar mitjançant la tècnica de la criofractura. Aquesta consisteix en la congelació ràpida de la mostra per mantenir les gotes intactes estructuralment. La mostra congelada es fractura per tal d'exposar les superfícies d'interès i, llavors, es cobreix amb un metall, com el Pt-C. Després s'elimina la mostra original per immersió en aigua o algun dissolvent. La rèplica de metall s'observa al microscopi. Aquesta tècnica proporciona imatges d'elevada qualitat (Levy, 1994), tot i que resulta costosa i llarga degut als equips especials requerits durant les diferents etapes de preparació.

En la microscopia electrònica de rastreig el feix d'electrons incideix sobre un punt de la mostra la qual dispersa els electrons i emet electrons secundaris. Aquesta tècnica permet observar partícules de mida de gota mínima de 10nm. La microscopia electrònica de transmissió permet observar partícules de mida tan petita com 1nm. En aquest tipus de microscopia el feix d'electrons es detecta després de travessar la mostra (Haskell, 1998).

1.1.5.1.2. Dispersió de la llum làser

La dispersió de la llum làser és la tècnica més adequada per mesurar mides de gota del rang nanomètric (Finsy, 1994). Aquesta tècnica mesura la intensitat de llum dispersada en funció de l'angle de dispersió.

Mitjançant aquesta tècnica és poden mesurar fluctuacions d'intensitat mantenint l'angle de dispersió de la mesura constant (dispersió dinàmica de la llum), o bé, es pot mesurar la intensitat promig en funció de l'angle (dispersió estàtica de la llum).

Dispersió dinàmica de la llum làser

Mitjançant la tècnica de dispersió dinàmica de la llum làser es mesuren fluctuacions de la intensitat dispersada a un angle constant en funció del temps. La intensitat dispersada per les partícules depèn de la seva mida, de la longitud d'ona, de l'angle de dispersió i de l'índex de refracció de la partícula i del medi continu (Haskell, 1998).

Les fluctuacions de la intensitat són detectades i amplificades pel fotomultiplicador. Seguidament, a partir de les fluctuacions detectades l'autocorrelador genera la funció d'autocorrelació. Mitjançant la funció d'autocorrelació s'obté la mesura de la correlació entre la intensitat dispersada a qualsevol temps i la intensitat després d'un cert temps, t_d (Finsy, 1994). Per a una dispersió de partícules esfèriques i monodisperses, la funció de correlació s'expressa segons l'Equació 1.4, on A és la línia de base, B és un paràmetre instrumental que indica l'eficiència del procés de recollida de dades, D_0 és el coeficient de difusió de les partícules i q és el mòdul del vector de dispersió.

$$g_r(q, t_d) = A + B \exp(-2 \cdot D_0 \cdot q^2 \cdot t_d) \quad \text{Equació 1.4}$$

el vector de dispersió, q , equival a:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad \text{Equació 1.5}$$

on θ és l'angle de dispersió, n és l'índex de refracció de la fase contínua i λ és la longitud d'ona de la llum.

Si es suposa que les partícules són esfèriques, es pot aplicar la llei d'Stokes–Einstein per obtenir el radi hidrodinàmic de les partícules (Equació 1.6), R_H . Aquest està relacionat amb el coeficient de difusió, D_0 i la viscositat del medi, η , juntament amb la constant de Boltzmann, K , i la temperatura absoluta, T .

$$R_H = \frac{KT}{6\pi\eta D_0} \quad \text{Equació 1.6}$$

Els paràmetres de la funció de correlació es poden analitzar per diferents mètodes. Els més comuns són el mètode dels cumulants (Koppel, 1972) del qual s'obté el diàmetre mitjà de gota (Z-average) i l'índex de polidispersitat de la dispersió, el mètode Contin (Provencher, 1982a, 1982b) i el Repes (Jakes, 1988; Johnsen, 1992).

El mètode dels cumulants es basa en la linealització de la funció de correlació en expressar-la en forma semilogarítmica. El coeficient de difusió de les partícules, D_0 , s'obté de la pendent de la corba resultant.

Si una mostra no és monodispersa, la funció de correlació es converteix en una suma d'exponencials i cal ajustar-la a un polinomi. En aquest cas la representació semilogarítmica no és linealitzable. Normalment s'ajusta fins a un polinomi de grau $n=5$, on cada terme s'anomena cumulant d'ordre- n . La variància de la funció de distribució de mida de partícula es representa per l'índex de polidispersió. Un índex de dispersió inferior a 0,2 és indicatiu que les gotes o partícules són monodisperses. El càlcul de la mida de gota mitjançant aquesta funció de correlació s'anomena Z-average (Z_{av}), la qual és una mida promig en intensitat (Finsky, 1994).

1.1.6. ESTABILITAT

Les nano-emulsions, en tant que emulsions, són sistemes termodinàmicament inestables tot i que poden posseir una elevada estabilitat cinètica degut a la petita mida de les gotes que formen la fase dispersa. Els processos que poden donar lloc a la desestabilització de les emulsions són la sedimentació o cremat, la floculació, la coalescència i la maduració d'Ostwald (Figura 1.4).

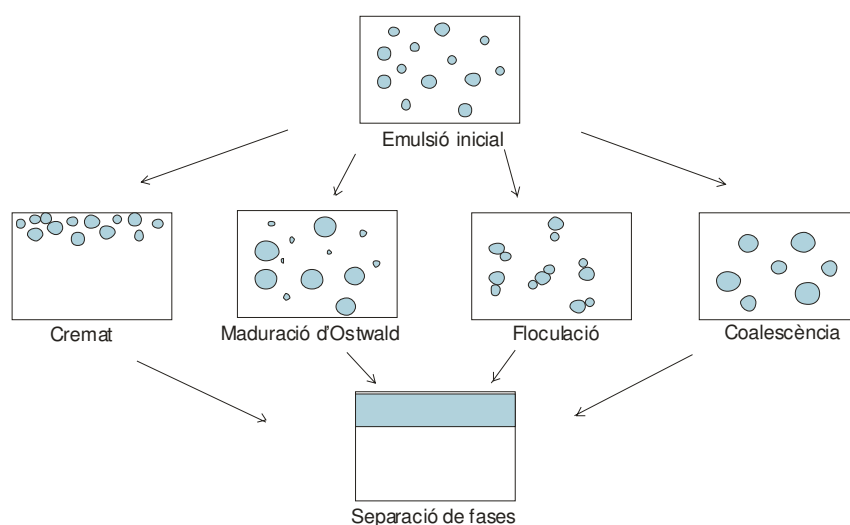


Figura 1.4. Mecanismes d'inestabilitat que conduïxen a la separació de fases en les emulsions. El cremat o sedimentació i la floculació són mecanismes poc influents en la desestabilització de nano-emulsions.

La maduració d'Ostwald és el principal procés que afecta l'estabilitat de nano-emulsions. La coalescència també afecta l'estabilitat de les nano-emulsions però en menor grau, ja que, com es veurà més endavant, la petita mida de gota de les nano-emulsions i una elevada concentració de tensioactiu pot prevenir el procés. Aquests processos poden tenir lloc en diferents etapes o simultàniament. La sedimentació o cremat i la floculació són processos que gairebé no afecten l'estabilitat de les nano-emulsions.

En la sedimentació o cremat, processos reversibles deguts a la diferència de densitats entre les fases dispersa i contínua (Tadros, 1983), el moviment

Brownià i, consegüentment, la velocitat de difusió és superior a la velocitat de cremat o sedimentació induïts per la gravetat.

La floculació és un procés reversible que consisteix en una agregació de gotes sense produir-se el trencament de la barrera interfacial (Verwey, 1948; Overbeek, 1978). En sistemes estabilitzats amb tensioactius no iònics, una mida de gota de l'ordre de pocs nanòmetres que minimitza les forces d'atracció de van der Waals entre gotes (Israelachvili, 1991) i una concentració elevada de tensioactiu que garanteix una pel·lícula interfacial prou gruixut al seu voltant (Gennes, 1985; 1987), disminueixen la probabilitat que hi hagi floculació.

1.1.6.1. COALESCÈNCIA

La coalescència és un procés irreversible mitjançant el qual dues o més gotes es fusionen en una única gota de mida més gran en trencar-se la pel·lícula de fase contínua que separa les gotes (Walstra, 1996). Hi ha dos possibles mecanismes que expliquen aquest procés (Deminiere, 1998). D'una banda, s'assumeix un trencament espontani de la pel·lícula interfacial de les gotes que es produeix, com a únic factor limitant, quan el gruix de la pel·lícula cedeix al contacte molecular entre gotes. Per una altra banda, segons la teoria Kabalnov-Wennerström (Kabalnov, 1996; 1998) les fluctuacions tèrmiques que hi ha en les monocapes de tensioactiu poden produir un petit forat en la pel·lícula interfacial, que, o bé, pot evolucionar tancant-se de nou, o bé es pot propagar al llarg del film donant lloc a la seva ruptura i, per tant, a la coalescència de les gotes.

La coalescència pot prevenir-se mitjançant la presència de fases de cristall líquid en la nano-emulsió que formen una gruixuda pel·lícula multilaminar de tensioactiu adsorbit en la interfície (Suzuki, 1989; Rang, 1999). A més, s'ha descrit que les gotes de les nano-emulsions poden assimilar-se a esferes 'dures' (Katsumoto, 2000) difícils de deformar, prevenint-se també la coalescència.

La velocitat de coalescència, ω , en un sistema dispers concentrat pot calcular-se segons la següent equació, desenvolupada per Deminiere (Deminiere, 1998):

$$\frac{1}{r^2} = \frac{1}{r_0^2} - \frac{8\pi}{3} \omega t \quad \text{Equació 1.7}$$

on r és el radi promig de les gotes, r_0 és el radi a temps 0, t és el temps. Aquesta expressió prediu una relació lineal de la inversa del radi al quadrat ($1/r^2$) en funció del temps.

1.1.6.2. MADURACIÓ D'OSTWALD

La maduració d'Ostwald és un procés irreversible que consisteix en la difusió de fase dispersa de les gotes petites a gotes més grans d'una emulsió. S'origina degut a una diferència entre la pressió de Laplace, p , (Equació 1.2) de gotes de mida diferent. A conseqüència d'aquesta diferència, segons l'equació de Kelvin (Equació 1.8) (Hunter, 1993), la solubilitat d'una gota esfèrica augmenta amb la disminució de la seva mida.

$$C(r) = C(\infty) \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{rRT}\right) \quad \text{Equació 1.8}$$

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

D'aquesta manera, es produeix un augment global de la mida de gota de la nano-emulsió i una disminució de l'àrea interfacial. Teòricament, el procés de maduració d'Ostwald acabaria amb la unió de totes les gotes en una de sola, sent poc probable a la pràctica ja que, juntament amb l'augment promig de la mida de gota, es produeix també una disminució de la velocitat del procés.

Per a dues gotes de radi r_1 i r_2 , on r_1 és inferior a r_2 , la diferència en la pressió de Laplace és la següent:

$$\frac{RT}{V_m} \ln \frac{C(r_1)}{C(r_2)} = 2\gamma \left(\frac{1}{r_1} - \frac{1}{r_2} \right) \quad \text{Equació 1.9}$$

Segons aquesta equació es dedueix que com a més gran sigui la diferència entre els radis (r_1 i r_2), més gran és la velocitat d'Ostwald.

La teoria LSW, desenvolupada per Lifshitz i Slezov (Lifshitz, 1961) i, independentment per Wagner (Wagner, 1961), descriu una equació per la velocitat d'Ostwald (Equació 1.10):

$$\omega = \frac{dr^3}{dt} = \frac{8 C(\infty)\gamma V_m D}{9 \rho RT} \quad \text{Equació 1.10}$$

on ρ és la densitat de l'oli i D és la difusió de la fase dispersa en la contínua. La teoria LSW prediu una relació lineal entre r^3 i el temps, t . Aquesta teoria assumeix unes quantes premisses: les gotes estan separades per distàncies més grans que els seus diàmetres; el moviment de la fase dispersa és només degut a la difusió molecular i la concentració d'espècies dissoltes és constant excepte als voltants de les interfícies fase dispersa/fase contínua. La segona premissa es veu afectada pel moviment Brownià de les petites gotes de fase dispersa, el qual indueix una difusió convectiva que accelera la velocitat de difusió. A més, hi ha investigadors que han descrit que la presència de gotes de microemulsió (Taisne, 1998), així com altres agregats tensioactius, com ara micel·les (Kabalnov, 1994; Taylor, 1995) en la fase contínua, acceleren la velocitat de difusió entre gotes petites i grans. Tot i això, en diverses publicacions s'ha descrit que la maduració d'Ostwald és el principal mecanisme que indueix la inestabilitat en nano-emulsions (Taylor, 1994; Katsumoto, 2000; Izquierdo, 2001).

Hi ha diferents maneres de minimitzar la maduració d'Ostwald. L'addició d'un segon component formant part de la fase dispersa que sigui totalment insoluble en la fase contínua pot aturar el procés en el sistema (Higuchi, 1962). En un sistema amb dos components en la fase dispersa es produeix una transferència de masses del component més soluble en la fase contínua deguda a la diferència en la pressió de Laplace entre gotes. Així, la composició de les gotes canvia, de manera que augmenta la concentració del component menys soluble en les gotes de radi més petit i disminueix en les gotes grans. Quan la diferència en el potencial químic entre gotes de mida diferent es compensa per la variació en el potencial químic resultant de la

transferència de masses dels dos components s'estableix l'equilibri. Si el component menys soluble en la fase contínua és totalment insoluble en ella, la distribució en la mida de gotes en un temps determinat no varia respecte la inicial, és a dir, no es produeix maduració d'Ostwald. En canvi, si no és totalment insoluble en la fase dispersa, la distribució en la mida de gotes ve donada per l'Equació 1.10. Walstra va suggerir que mitjançant l'ús de tensioactius que s'adsorbissin fortament a la interfície oli/aigua la velocitat d'Ostwald podria reduir-se significativament (Walstra, 1996).

1.2. APLICACIONS DE LES NANO-EMULSIONS

Les aplicacions tecnològiques de les nano-emulsions estan relacionades amb les seves propietats característiques: petita mida de les gotes de fase dispersa, elevada àrea interfacial, elevada capacitat de solubilització, aspecte transparent o translúcid, baixa viscositat i elevada estabilitat cinètica enfront la sedimentació/cremat, la floculació i, en certs casos, la coalescència.

Les nano-emulsions s'utilitzen, principalment, en els camps farmacèutic, cosmètic i químic. No obstant, no ha estat fins fa pocs anys que s'han estudiat en més profunditat els diferents mecanismes de formació de les nano-emulsions i el paper dels tensioactius, els processos a nivell col·loidal i interfacial implicats en la seva formació i els principals mecanismes que afecten la seva estabilitat, principalment, la maduració d'Ostwald.

1.2.1. APLICACIONS EN FARMÀCIA

En el camp farmacèutic, les nano-emulsions han estat utilitzades en nutrició parenteral i com a sistemes d'alliberació de principis actius. Les propietats de les nano-emulsions fan que puguin ser administrades per diverses vies: parenteral, oral, cutània, transdèrmica, oftàlmica, rectal i nasal. S'està estudiant el seu ús com a sistemes d'alliberació de gens (Chung, 2000; Pan, 2003; Bivas-Benita, 2004) i de vacunes (Lidgate, 1989; Bivas-Benita, 2004; Tamilvanan, 2004; Hilgers, 2005). Els mètodes més utilitzats per a la preparació de nano-emulsions destinades a aplicacions farmacèutiques són els d'elevada energia, i, entre ells, els homogeneïtzadors d'alta pressió.

1.2.1.1. ADMINISTRACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER VIA PARENTERAL

Les nano-emulsions administrades per via parenteral s'utilitzen com a nutricions parenterals totals, en les que s'aporten els lípids, aminoàcids, vitamines i electròlits (Demorest, 1992; Lucks, 2000). També s'utilitzen a través d'aquesta via com a vehicles per l'alliberació controlada de principis actius i per a l'alliberació de principis actius directament a òrgans específics del cos (Klang, 1998; Tamilvanan, 2004).

Les nano-emulsions resulten sistemes molt avantatjosos per ser administrats per via parenteral ja que la mida de fase dispersa és suficientment petita com per a que no s'obturin els petits capil·lars sanguinis (Benita, 1993). Les partícules de mida superior a 5 micres podrien provocar embolismes en la circulació sanguínia (Wretling, 1964). La via intravenosa requereix que les formulacions, a part dels requisits sobre la mida de gota (inferior a 5µm), siguin estèrils, isotòniques, apirògenes, no tòxiques, biodegradables i estables (Benita, 1993). Les nano-emulsions, formulades amb els excipients adequats i esterilitzades, poden complir tots aquests requisits. D'altres avantatges sobre l'ús d'aquest tipus de sistemes per administració parenteral són l'estabilització de principis actius susceptibles a hidrolitzar-se, la reducció dels efectes adversos i la toxicitat dels principis actius, la possible alliberació controlada de principis actius i l'alliberació a llocs específics del cos (Lucks, 2000).

Els tensioactius més utilitzats en la formulació de nano-emulsions per aquesta via són els fosfolípids, derivats d'ou o de soja. També s'utilitzen els derivats d'oli de ricí polioxietilenats, alguns copolímers en bloc, com el Synperonic[®] F68 i alguns polisorbats, com el Tween[®] 80. La concentració de tensioactiu usada és, aproximadament, de 0,2 al 2%. Els components oliosos més utilitzats són els olis vegetals, com l'oli de soja, l'oli d'oliva, l'oli de ricí, etc., així com els triglicèrids de cadena mitja i llarga constituent, normalment, el 10 al 30% del pes total de l'emulsió (Demorest, 1992, Lucks, 2000).

Algunes de les nano-emulsions O/W comercialitzades com a sistemes d'alliberació de principis actius contenen diazepam, prostaglandines (PGE₁), les vitamines A, D₂, E i K₁, propofol, dexametasona i flurbiprofè, entre d'altres (Klang, 1998).

El diazepam utilitzat per via intravenosa en anestèsia i per al tractament de convulsions epilèptiques s'administrava, en un principi, dissolt en una mescla propilenglicol/aigua degut a la seva baixa solubilitat en aigua. No obstant, quan la solució arribava a la circulació sanguínia el diazepam precipitava, donant lloc a dolor i, en alguns casos, a un procés infecció. En solubilitzar el principi actiu en una nano-emulsió es va observar una notable reducció en la freqüència d'aparició dels efectes adversos (Dardel, 1983; Kronevi, 1983).

Pel que fa als principis actius administrats en nano-emulsions per via parenteral, cal destacar la ciclosporina A, agents citotòxics com el paclitaxel (Constantinides, 1999), i la rizoxina, antifúngics com l'Amfotericina B (Tabosa do Egito, 1994) i el miconazol, antibiòtics com la penicil.lina (Santos-Magalhaes, 2000). També, han estat objecte d'estudi la solubilització d'antiinflamatoris com el naproxè (Nasirideen, 1998), antimalàrics com la mefloquina i l'halofantrina (Mbela, 1998) i ansiolítics com el diazepam (Levy, 1991) i el lorazepam (Yalin, 1997; Medina, 2001), entre d'altres.

L'amfotericina B s'utilitza per via intravenosa per al tractament de les micosis disseminades en pacients immunodeprimits (SIDA, transplantaments d'òrgans, quimioteràpia, etc.). S'ha demostrat que la solubilització del principi actiu en nano-emulsions disminueix els efectes adversos (nefrotoxicitat, etc.) provocats per la formulació injectable comercial, Fungizone, que conté deoxicolat com a tensioactiu (Tabosa do Egito, 1994).

L'agent citotòxic paclitaxel s'administra per via intravenosa en solució en una mescla etanol:tensioactiu:solució salina. Nombrosos estudis han posat de manifest que la solubilització del principi actiu en nano-emulsions disminueix la toxicitat del principi actiu, augmenta la seva solubilitat i millora la seva eficàcia (Constantinides, 1999). L'elevada concentració de tensioactiu emprat en algunes formulacions pot donar lloc a efectes secundaris (Weiss, 1990; Rowinsky, 1993; Eisenhauer, 1994).

1.2.1.2. ADMINISTRACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER VIA ORAL

Les nano-emulsions O/W s'utilitzen per a l'administració oral de principis actius insolubles o poc solubles en aigua, per augmentar-ne la seva biodisponibilitat, aconseguint una alliberació controlada de principis actius.

S'ha observat que l'absorció d'un principi actiu administrat per via oral augmenta quan es incorpora en emulsions O/W, respecte una solució aquosa del mateix (Kimura, 1989; Ilan, 1996). L'absorció d'una emulsió en el tracte gastrointestinal ha estat relacionada amb la mida de gota de la fase

dispersa, de manera que aquesta augmenta en disminuir la mida de gota (Toguchi, 1990; Nicolaos, 2003; Smidt, 2003).

Un procediment utilitzat per millorar la biodisponibilitat del principi actiu en ser administrat per via oral és el recobriment de les gotes de fase dispersa amb polímers, de manera que es forma una nano-emulsió 'mucoadhesiva' que s'adhereix per més temps a la mucosa intestinal, aconseguint, d'aquesta manera, una alliberació controlada del principi actiu. Els polímers més usats per aquesta finalitat són el carbopol i el quitosà. Alguns principis actius formulats en nano-emulsions 'mucoadhesives' han estat la dermopressina (Ilan, 1996) i l'hormona calcitonina (Baluum, 1997). Ambdós principis actius estan incorporats en nano-gotes recobertes de Carbopol® 940.

La cefpodoxima (Nicolaos, 2003), la penclomedina (Smidt, 2004), el diazepam (Gajewska, 2001), la indometacina (Kim, 2000) i la ciclosporina (Bhalani, 1999) són d'altres principis actius solubilitzats en nano-emulsions O/W per ser administrats per via oral.

L'agent immunosupressor ciclosporina s'administra per via oral encapsulat en càpsules de gelatina (Bhalani, 1999). El principi actiu està dissolt en un sistema tensioactiu que conté un lípid polar com a component oliós. Aquest sistema s'autoemulsifica quan està en contacte en medi aquós amb l'ajut d'agitació suau. Així, quan la càpsula de gelatina arriba al tracte gastrointestinal el pH del medi desfà la càpsula i el medi aquós del tracte així com l'agitació produïda per la mobilitat gastrointestinal donen lloc a la formació d'una nano-emulsió. S'ha estudiat que la incorporació d'indometacina en un sistema tensioactiu autoemulsificant augmenta la biodisponibilitat del principi actiu (Kim, 2000).

1.2.1.3. ADMINISTRACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER VIA CUTÀNIA I TRANSDÈRMICA

L'ús de nano-emulsions per via cutània pot millorar la penetració i la permeació de principis actius a través de la pell sense necessitat d'incorporar un excipient promotor de la permeació en la formulació (Amselem, 1998).

S'ha trobat un augment en l'activitat d'antiinflamatoris esteroïdics i no esteroïdics (Friedman, 1995), d'ansiolítics com el diazepam (Shwarz, 1995) i d'anestèsics locals (Friedman, 1993), entre d'altres, quan són alliberats sobre la pell a través d'una nano-emulsió en comparació amb una emulsió convencional. De tota manera, la majoria d'estudis es realitzen comparant formulacions de composicions diferents.

La durada de l'activitat analgèsica (mesurada *in vivo* mitjançant una punxada en l'avantbraç de quatre voluntaris) d'un 4% de lidocaïna incorporada en una nano-emulsió amb un diàmetre mig de gota de 160nm va ser superior comparada amb la d'una emulsió de 50µm de diàmetre de gota. El temps de latència de l'acció analgèsica va ser més curt per la nano-emulsió que per l'emulsió convencional. Tot i que ambdues formulacions tenien la mateixa concentració de principi actiu, la composició era diferent (Amselem, 1998).

Shwarz et al. van postular una potenciació en la penetració de principis actius a través de la pell quan estaven incorporats en emulsions de mida de gota inferior a 200 nm (Shwarz, 1995). De la mateixa manera, Amselem et al. van posar de manifest que l'activitat antiinflamatòria de diclofenac incorporat en una nano-emulsió (diàmetre de gota entre 100 i 200 nm) va ser més efectiva que quan es va incorporar en una emulsió convencional d'igual composició (Amselem, 1998).

Youenang et al. van estudiar la penetració de dos principis actius amb activitat antifúngica, l'econazol i el miconazol, des de nano-emulsions amb diferent càrrega elèctrica. Els resultats de l'estudi van mostrar que la penetració dels principis actius des de nano-emulsions amb càrrega positiva era més efectiva que en les emulsions carregades negativament (Youenang Piemi, 1999).

Wu et al. han observat una potenciació en l'alliberació per via tòpica d'inulina, utilitzada com a solut hidrofílic model (Wu, 2001a), així com en la transmissió d'ADN (Wu, 2001b) també per via tòpica en incorporar-se en nano-emulsions de tipus W/O.

1.2.1.4. ADMINISTRACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER VIA OFTÀLMICA, RECTAL I NASAL

S'ha observat una millora en la biodisponibilitat de principis actius administrats per via ocular quan s'incorporen a través d'una nano-emulsió. Estudis realitzats per Bar-Ilan, et al., 1994 i Beilin, et al., 1995 mostren que la indometacina (Bar-Ilan, 1994) i la pilocarpina (Beilin, 1995) incorporades en una nano-emulsió estan en contacte durant temps més llargs en la capa còrnia de l'ull, potenciant, d'aquesta manera, la seva penetració.

La via rectal és una via d'administració d'elecció quan es requereixen efectes terapèutics ràpids (Sznitowska, 2001), resultant ser menys invasiva que la via parenteral. S'ha vist que l'absorció de diazepam és més ràpida quan s'administra per via rectal en solució que mitjançant supositoris. En aquest sentit, Sznitowska et al. han estudiat l'alliberació per via rectal de diazepam incorporat en una nano-emulsió O/W i en una solució aquosa. Els autors han conclòs que el diazepam s'absorbeix ràpid i de manera similar en la nano-emulsió que en la solució, tot i que la nano-emulsió presenta l'avantatge que per solubilitzar el principi actiu no són necessaris solvents orgànics, al contrari del que succeeix amb la solució (Sznitowska, 2001).

La mucosa nasal presenta una permeabilitat més gran i una menor activitat enzimàtica que la mucosa intestinal. Per aquest motiu aquesta via és una bona alternativa a la via oral. A més, en comparació amb la via parenteral, la via nasal és una via menys invasiva. La testosterona és una hormona insoluble en aigua que resulta inactiva quan s'administra per via oral degut a que sofreix un fort efecte de primer pas hepàtic. La seva biodisponibilitat per via nasal quan es va incorporar en nano-emulsions O/W de mida de gota de 400nm carregades positiva, negativament o sense càrrega va ser del 55, 51 i 37 %, respectivament. Els resultats obtinguts suggereixen que les nano-emulsions poden ser prometedors sistemes alliberadors de principis actius per via nasal (Ko, 1998).

1.2.2. APLICACIONES EN COSMÉTICA

En els últims anys els productes d'higiene i cura personal d'aspecte clar (transparent o translúcid) estan adquirint gran importància per al consumidor. Un aspecte transparent o translúcid en una formulació està associat a certes sensacions com netedat, frescor i lleugeresa. Aquestes característiques es consideren importants en determinats productes, per exemple, en protectors solars, maquillatges, netejadors facials, xampús, suavitzants i màscares capil·lars, entre d'altres. En aquest sentit, les propietats de les nano-emulsions fan aquests sistemes adequats per cobrir aquests tipus de necessitats en la indústria cosmètica.

Les nano-emulsions utilitzades en el sector cosmètic són exclusivament per ús extern o en la cavitat bucal. Tot i que les formulacions cosmètiques no són medicaments poden contenir principis actius amb acció hidratant i antioxidant (vitamina A, vitamina E, urea, α -hidroxiàcids), protectors solars (3-benzofenona, oxibenzona), coenzims antioxidants (coenzim β 10), despigmentants (5,15-diacetil-3-benzoilatirol), etc. Aquests es poden solubilitzar tant en la fase aquosa com en l'oli, depenent de la seva natura. Per tant, depenent de l'aplicació s'utilitzen nano-emulsions W/O o O/W.

En productes capil·lars i facials són preferibles les nano-emulsions de fase externa aquosa, que aporten una més gran sensació de frescor. Per ús corporal, pot ser preferible emprar una dispersió de fase externa oliosa que formi una capa lipídica en la pell, evitant-se així l'evaporació d'aigua. L'aigua alliberada per l'estrat corni s'emulsifica amb la capa oliosa formada, afavorint la hidratació de la pell.

En la literatura hi ha un nombre extens de publicacions a revistes, patents, etc. sobre nano-emulsions per aplicacions cosmètiques. Entre elles es troben protectors solars (Fernandez, 2000; Johncock, 2000; George, 2002), acondicionadors capil·lars (Douin, 2001; Simonnet, 2000a, 2000b), xampús (Douin, 2001), hidratants corporals (Simonnet, 2000a, 2000b; Jeong Su, 2003), despigmentants facials (Seung Gi, 2003) i maquillatges (Sonneville, 2000; Simonnet, 2000c).

Els mètodes d'emulsificació més utilitzats en aquest camp d'aplicació són, en quant a mètodes d'elevada energia, els homogeneïtzadors d'alta pressió (Nakajima, 1997; Beckman, 1997) i, en quant a mètodes de baixa energia, el mètode PIT (Förster, 1995; Wadle, 1997), tot i que en la literatura també es descriuen nano-emulsions per ús cosmètic formades variant la composició a temperatura constant (Sagitani, 1991).

1.2.3. APLICACIONS EN TECNOLOGIA QUÍMICA

Les nano-emulsions s'utilitzen en tecnologia química, principalment, per a la preparació de nanopartícules polimèriques utilitzant un monòmer com a fase dispersa (Antonietti, 2002; Asua, 2002). S'ha posat de manifest que el mecanisme predominant en la polimerització en nano-emulsions és la nucleació en la gota possibilitant la conservació de la mida i la composició de cada gota durant la formació de partícules de làtex (Antonietti, 2002). D'aquesta manera, les gotes de les nano-emulsions són considerades com a petits nanoreactors.

Els tensioactius que contenen grups polimeritzables, surfòmers, s'utilitzen en la polimerització en nano-emulsions perquè protegeixen, estableixen i funcionalitzen les partícules de polímer. En aquest sentit, s'han obtingut nanopartícules que contenen fluorur mitjançant la polimerització amb la presència d'un monòmer-surfòmer fluorat (Pich, 2005). Aquest surfòmer a més d'estabilitzar les nanogotes de monòmer i les nanopartícules polimèriques, també funcionalitza la superfície de les nanopartícules amb grups fluorats.

Una altra aplicació important de la polimerització en nano-emulsions és la producció de làtxs amb una elevat contingut de sòlid i de baixa viscositat. Alguns treballs han descrit la formació d'aquests tipus de làtxs utilitzant monòmers acrílics. Els autors postulen que la mida de partícula es controla, principalment, per la mida de gota de la nano-emulsió la qual depèn del tipus i la concentració de tensioactiu utilitzat (Asua, 2002; Do Amaral, 2004).

La síntesi específica de partícules complexes és una altra aplicació interessant de la polimerització en nano-emulsions. Liu et al. han preparat

nanoesferes polimèriques magnètiques en presència de partícules d'òxid de ferro (Liu, 2004). Mitjançant la polimerització en nano-emulsions es poden encapsular i alliberar de manera controlada principis actius, perfums, pigments inorgànics, etc. (Bedri, 2000; Clemens, 2000).

Alguns autors han estudiat la polimerització inversa, de manera que nanoemulsifiquen monòmers hidròfils en una fase contínua no polar (Landfester, 2000; Antonietti, 2002). S'ha descrit que l'efecte plantilla de les gotes a partícules i l'eficiència del tensioactiu és més gran mitjançant la polimerització inversa en nano-emulsió que en altres tècniques de polimerització heterofàsiques. També s'ha descrit la preparació de nanopartícules per dispersió d'un polímer preformat en nano-emulsions (mètodes *salting-out* i d'emulsificació-difusió) (Galindo-Rodríguez, 2004).

1.3. ADMINISTRACIÓ DE PRINCIPIS ACTIUS A TRAVÉS DE LA PELL

1.3.1. CONCEPTES GENERALS SOBRE PERMEACIÓ CUTÀNIA

La pell és l'òrgan més gran del cos; pesa, aproximadament, 7 kg i representa més del 10 % de la massa total de l'organisme humà (Schaefer, 1999; Walters, 2002). És un òrgan protector enfront agressions mecàniques i químiques i, també, enfront les agressions provocades per radiacions i per organismes patògens (Mezei, 1994).

La pell està constituïda per diferents capes: l'epidermis, que és la capa més superficial, la dermis i la hipodermis (Figura 1.5). La hipodermis és la capa més profunda de la pell i uneix aquesta als teixits adjacents. Està formada, principalment, per adipòcits que són cèl·lules encarregades d'emmagatzemar greix. La dermis és una capa gruixuda de teixit connectiu que conté capil·lars, glàndules sebàcies i sudorípares, fol·licles pilosos i nervis. Principalment, està formada per fibroblasts. L'epidermis, en canvi, és una capa avascular però amb terminacions nervioses. La seva estructura és multilaminar disposada segons els diferents estadis de diferenciació cel·lular. De les capes més interiors a les més exteriors es distingeix la membrana basal que és l'origen de les cèl·lules de l'epidermis, passant per diferents estrats, des de cèl·lules metabòlicament actives i amb capacitat de dividir-se, fins cèl·lules queratinitzades afuncionals i més denses i aplanades, anomenades corneòcits. Aquestes últimes cèl·lules estan envoltades per bicapes lipídiques multilaminars i constitueixen la part més externa de l'epidermis, anomenada l'estrat corni (Barry, 1983).

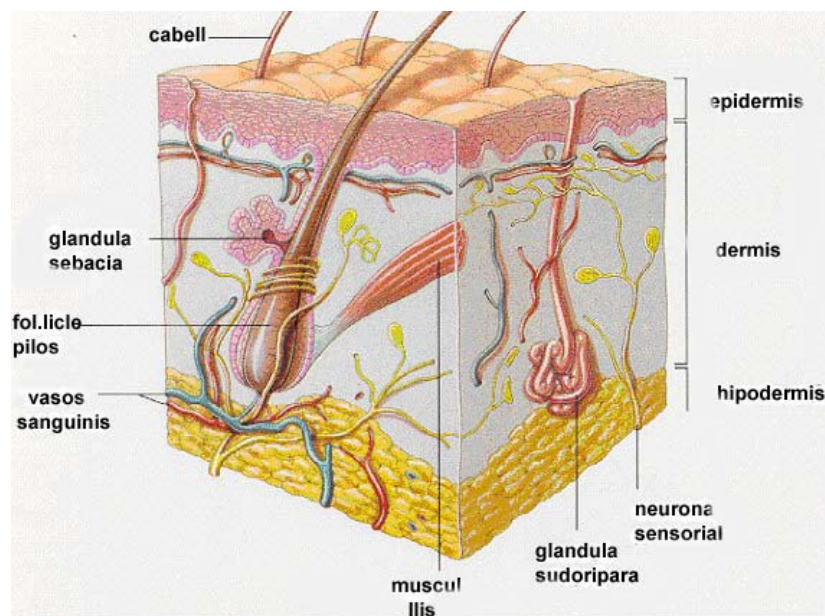


Figura 1.5. Estructura de la pell.

L'estrat corni, amb un gruix de 10–20 μm , és la principal barrera de la pell dels mamífers (Scheuplein, 1971). La funció de barrera s'atribueix al contingut i la composició dels lípids de l'estrat corni, i, sobretot, a l'estructura que adquireix la matriu lipídica intercel·lular així com la dels lípids que envolten els corneòcits (Potts, 1990, Roberts, 1998). L'específica i ordenada estructura dels lípids en forma de bicapa i els corneòcits s'explica, de manera metafòrica, com el model 'dels maons i el ciment', en el que els maons representen els corneòcits que estan envoltats dels lípids que fan de ciment (Wertz, 1989; Elias, 1991). Els lípids intercel·lulars són, principalment, ceramides, colesterol, èsters de colesterol, àcids grassos i una petita fracció de sulfat de colesterol. Els canvis en la composició dels lípids intercel·lulars i en l'organització estructural de l'estrat corni, així com l'extracció de lípids mitjançant solvents orgànics contribueixen a augmentar-ne la permeabilitat.

L'estrat corni és la capa de la pell on es produeix l'absorció percutània, és a dir, el trànsit de substàncies a través de la pell. Aquest procés engloba tres etapes. En primer lloc, la *penetració* o entrada de substàncies en una capa o estructura particular, com ara l'estrat corni. En segon lloc, la *permeació* que és la difusió del compost d'una capa a una altra. I finalment, la *reabsorció* que es defineix com la recaptació de substàncies a través del sistema

vascular. Un compost que ha penetrat en l'estrat corni no es considera necessàriament que s'hagi absorbit dins l'organisme (Schaefer, 1999).

L'alliberació d'un principi actiu a través de la pell pot tenir diferents objectius. Pot donar lloc a una acció local sobre la superfície de la pell, com seria el cas dels antisèptics tòpics, els protectors enfront les radiacions solars, els desodorants i els cosmètics. Els vehicles d'elecció per donar lloc a una acció local contenen excipients de caràcter hidròfil, com ara polietilenglicols, o lipòfils, com la parafina. Els excipients lipòfils són molt oclusius i resulten aptes per incorporar principis actius poc lipòfils. Són adequats per tractaments superficials perquè tenen una cèssió lenta i constant del principi actiu, sobretot si aquest és poc lipòfil. El principi actiu també pot penetrar en l'epidermis, produint-se una acció localitzada en l'estrat corni. Exemples d'acció en aquesta capa són les substàncies amb acció hidratant, com els àcids grassos, els glicols, els poliols o l'urea, o queratolítica, com l'àcid salicílic i els α -hidroxiàcids que actuen solubilitzant l'espai intercel·lular i facilitant la descamació. Els vehicles formulats per tenir una acció hidratant formen una pel·lícula oclusiva. Es solen usar olis vegetals i emulsions O/W amb olis vegetals. El principi actiu també pot permear a través de l'epidermis fins arribar a la dermis. Un exemple de substàncies que actuen en aquest nivell són els antiinflamatoris no-esteroídics, la vitamina E i la cafeïna, aquests dos últims utilitzats en els tractaments cosmètics. Vehicles d'elecció per una acció en aquest nivell són les emulsions W/O i les O/W en els que el tensioactiu i el component oliós poden influir en la penetració del principi actiu. A aquest nivell es poden incorporar promotors de la penetració. També es pot produir una acció a nivell dels apèndix cutanis, com seria el cas dels antitranspirants que es solen formular incorporats en emulsions W/O i les locions capil·lars que s'incorporen en solucions o suspensions hidroalcohòliques amb propilenglicol (Díez, 2001). Un cop situat a la dermis, el principi actiu pot reabsorbir-se pels capil·lars sanguinis i distribuir-se per l'organisme, donant lloc a una acció sistèmica. Els sistemes que aplicats en la pell donen lloc a una acció sistèmica s'anomenen sistemes d'alliberació transdèrmica. Alguns principis actius utilitzats per aquest fi són l'escopolamina, la nitroglicerina, la nicotina i l'estradiol. Com a vehicles per a l'alliberació transdèrmica es poden utilitzar ungüents, tot i que, la tendència dels últims anys és l'ús de sistemes adhesius (Walters, 2002).

La permeació de substàncies a través de la pell pot tenir lloc per tres vies diferents: la via apendicular, la via transcel·lular i la via intercel·lular (Hadgraft, 2003) (Figura 1.6). La via apendicular es basa en el pas de compostos a través, principalment, dels fol·licles pilosos (Illel, 1991). En la via transcel·lular el pas de substàncies es produeix a través dels corneòcits i dels lípids de l'estrat corni. En la via intercel·lular, en canvi, el pas de substàncies a través de l'estrat corni es produeix entre els corneòcits. Es considera que l'espai lipídic intercel·lular és l'únic domini continu en l'estrat corni (Potts, 1992; Fartasch, 1993). Així doncs, la majoria de compostos que penetren l'estrat corni ho fan a través de la via intercel·lular. La resta de vies, tot i ser minoritàries, també contribueixen en la permeació de certes substàncies.

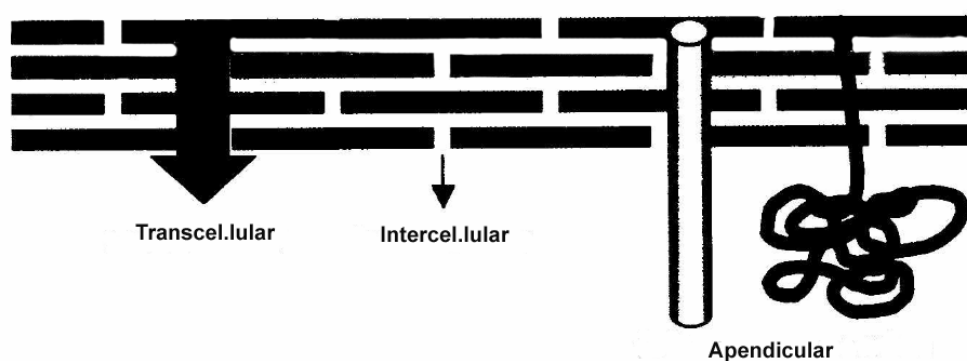


Figura.1.6. Principals vies de permeació de substàncies a través de la pell (adaptada de Hadgraft, 2001).

1.3.2. INFLUÈNCIA DE LA FORMULACIÓ EN LA PERMEACIÓ CUTÀNIA DE PRINCIPIS ACTIUS

Un vehicle es defineix per la seva matriu estructural i pels seus excipients. Diversos estudis han mostrat que la matriu estructural del vehicle influeix en l'alliberació i en la penetració d'un principi actiu a través de la pell i, per tant, en l'efecte terapèutic (Surber, 2002).

Els vehicles més utilitzats per a l'alliberació per via tòpica de principis actius són les emulsions. No obstant, presenten com a inconvenients més

importants el tenir una capacitat limitada de solubilització de principis actius i una baixa estabilitat cinètica. Les solucions, les pomades, els unguents, els gels i els aerosols són d'altres vehicles utilitzats per a l'alliberació de principis actius per aquesta via.

En els últims anys s'ha investigat sobre l'ús de microemulsions (Fevrier, 1991; Trotta, 1991; García, 1997), vesícules (liposomes i niosomes) (Hope, 1993; Schreier, 1994) i nano-emulsions (Amselem, 1998; Solans, 2002) com a nous vehicles per a l'alliberació de principis actius per via tòpica. La majoria dels nous vehicles poden influir en l'alliberació i, d'alguna manera, en la penetració del principi actiu, tot i que, un cop que el principi actiu s'ha alliberat, el vehicle deixa d'influir en la resta de processos que intervenen en l'absorció percutània (Mezei, 1994). A més, amb les formes de dosificació disponibles en l'actualitat per tractar patologies de la pell pot produir-se l'absorció percutània del principi actiu, i, per tant, poden tenir lloc efectes sistèmics tòxics. És el cas dels tractaments de llarga durada amb principis actius com els corticosteroides, els agents citotòxics, els salicilats, entre d'altres. Existeix, doncs, la necessitat de desenvolupar nous sistemes d'alliberació de principis actius per via tòpica que potenciïn la penetració del principi actiu a través de la pell, localitzin la molècula en el seu lloc d'acció i redueixin l'absorció percutània (Mezei, 1994).

La majoria de sistemes col·loïdals contenen tensioactius formant part de la seva estructura que poden actuar com a promotors de la penetració i la permeació de principis actius en la pell. La finalitat dels promotors de la penetració és provocar canvis en la composició i en l'estructura dels lípids de l'estrat corni de manera que augmenti la seva permeabilitat, o bé, la formació de canals per on sigui possible la penetració de substàncies. S'ha estudiat àmpliament l'activitat dels tensioactius com a promotors de la penetració cutània. Estudis realitzats per Anderberg et al. posen de manifest els efectes potenciadors dels tensioactius Tween 80, dodecil sulfat sòdic i taurodihidrofusidat sòdic en la penetració cutània. Els resultats van indicar que la potenciació de l'absorció induïda pels tensioactius és deguda, probablement, a l'acció en les membranes cel·lulars i en els espais intercel·lulars (Anderberg, 1990).

La influència de la mida de gota en la penetració cutània dels principis actius ha estat objecte d'estudi en nombrosos treballs. Amselem *et al.* han estudiat l'activitat antiinflamatòria de dues emulsions amb diclofenac, amb la mateixa composició però diferent mida de gota. L'emulsió convencional té una mida de gota entre 10 i 100µm i la nano-emulsió entre els 100 i els 200nm. Els resultats de l'activitat antiinflamatòria expressada com àrea sota la corba (AUC) durant un període de 6 hores van mostrar que l'emulsió convencional era menys efectiva que la nano-emulsió (Amselem, 1998). L'augment de l'activitat farmacològica pot ser atribuïda a una més gran penetració de les nanogotes d'oli a través de l'estrat corni de la pell. Shwarz *et al.* han demostrat també una relació entre l'activitat farmacològica i la mida de gota de dispersions amb principis actius solubilitzats aplicats per via tòpica. Van observar que una mida de fase dispersa inferior a 0,2µm millorava significativament la penetració de principis actius (Shwarz, 1995). No obstant, Izquierdo *et al.* han constatat que malgrat que la capacitat de solubilització de tetracaïna augmenta considerablement en disminuir la mida de gota, la capacitat de permeació cutània del principi actiu no presenta diferències significatives en funció de la mida de gota per a emulsions amb la mateixa composició (Izquierdo, 2002).

Els efectes dels excipients del vehicle tant en la velocitat com en la quantitat de principi actiu absorbit s'han estudiat més freqüentment en l'administració per via tòpica que en qualsevol altra via d'administració. Les diferències existents en la quantitat de substància absorbida entre diverses formulacions tòpiques són degudes a les complexes interaccions entre el principi actiu, el vehicle i la pell, que controlen el repartiment en l'interior i la difusió a través de l'estrat corni (Surber, 2002).

Els factors que controlen l'absorció percutània en condicions d'equilibri estacionari (quan la concentració de principi actiu en el vehicle és constant i, quan en el compartiment receptor es compleixen condicions *sink*) en les descriuen en l'Equació 1.11:

$$J = \frac{D_m K}{L} C_v \quad \text{Equació 1.11}$$

on J és la velocitat de permeació o flux, D_m és el coeficient de difusió del principi actiu en la membrana (estrat corni), K és el coeficient de repartiment del principi actiu entre l'estrat corni i el vehicle, L és la longitud del recorregut de difusió a través de l'estrat corni i C_v és la concentració del principi actiu en el vehicle. Segons l'Equació 1.11, el flux o velocitat de permeació d'un principi actiu a través d'una membrana pot potenciar-se augmentant D_m , o K , o bé, augmentant C_v , és a dir, augmentant el grau de saturació del principi actiu en el vehicle.

Les dues primeres estratègies impliquen un efecte del vehicle en la funció de barrera de l'estrat corni. En aquest sentit, els promotors de la penetració cutània interaccionen amb l'estrat corni. Depenent del mecanisme d'acció del promotor es poden modificar els paràmetres K , a través de la solubilitat del principi actiu en l'estrat corni, o, D_m , mitjançant la fluidificació de la barrera lipídica de l'estrat corni, o tots dos (Goodman, 1989). Són promotors de la permeació els alcohols (etanol, dodecanol, etc.), els glicols (propilenglicol, etc.), les pirrolidones, els dimetilsulfòxids, els terpens, els tensioactius i les ciclodextrines, entre d'altres (Amselem, 1998). L'inconvenient d'aquest tipus de compostos és que poden produir irritació, toxicitat o hipersensibilització de la pell.

L'augment de C_v es basa en la interacció entre el principi actiu i el vehicle (Moser, 2001). La força que impulsa la difusió d'una substància a través de la pell és l'activitat termodinàmica del principi actiu en el vehicle, la qual està relacionada amb la C_v i el coeficient d'activitat del principi actiu en el vehicle. L'activitat termodinàmica es calcula a partir del producte de C_v i K ja que aquests dos paràmetres controlen les interaccions entre el principi actiu i el vehicle. Com més elevat sigui el valor del producte entre els dos paràmetres, més elevada serà l'activitat termodinàmica i, per tant, la permeació del principi actiu (Surber, 2002). En solucions saturades, aquelles en que el principi actiu en solució està en equilibri amb el principi actiu no dissolt, l'activitat termodinàmica del principi actiu és igual a la de la substància pura, i aquest valor es pren arbitràriament com la unitat. S'ha estudiat que si es mantenen els coeficients de repartiment, K , i de difusió del principi actiu, D_m , constants, els canvis en C_v produeixen canvis lineals en la permeació del principi actiu (Davis, 1991).

Respecte a les propietats fisicoquímiques del principi actiu, la lipofilicitat i la mida molecular són els factors que més influeixen en el coeficient de difusió (D_m) i el coeficient de repartiment (K) (Moser, 2001). L'absorció percutània de molècules molt polars o carregades, o excessivament lipòfiles serà molt lenta. Les substàncies de baix pes molecular, baix punt de fusió i hidrofòbiques, com els salicilats, els nicotinats i la nitroglicerina seran, relativament, ben absorbides (Surber, 2002). Respecte a la mida de les molècules, s'ha observat que els principis actius que difonen a través de la pell tenen pesos moleculars inferiors a 400 (Moser, 2001).

1.3.3. □ UANTIFICACIÓ DE LA PERMEACIÓ CUTÀNIA D'UN PRINCIPI ACTIU

La tècnica estàndard per mesurar la permeació d'un principi actiu *in vitro* a través de la pell és el mètode de les cel·les de difusió. La tècnica de les cel·les de difusió és particularment aplicable per al desenvolupament de sistemes d'alliberació transdèrmics i per la valoració de la seguretat de productes cosmètics (Bech, 1991), així com per la valoració del risc de substàncies potencialment tòxiques (Scott, 1989).

Tot i que mitjançant els sistemes *in vitro* es poden controlar les condicions experimentals amb precisió, l'inconvenient més gran radica en la nul·la o poca informació que es pot extreure sobre el metabolisme, la distribució i els efectes en el flux sanguini (Brain, 2002). En aquest sentit, les tècniques de quantificació de la permeació *in vivo* són les tècniques de referència en aquest tipus d'estudis. Un mètode aplicat recentment és l'espectroscopia d'infraroig amb transformada de Fourier i reflectància total atenuada (ATR-FTIR), en la que es mesura l'absorbància infraroja específica del principi actiu a mesura que va difonent a través de les capes de l'estrat corni en funció del temps (Moser, 2001).

La tècnica de *tape-stripping* és una tècnica de quantificació de la permeació que pot realitzar-se tant *in vivo* com *in vitro* que s'està utilitzant de manera progressiva en els últims anys. Mitjançant aquesta tècnica es pot mesurar tant la concentració de principi actiu com el perfil de la seva concentració a

través de l'estrat corni. Aquesta tècnica, considerada no invasiva, consisteix, en primer lloc, en l'aplicació del vehicle amb la substància a permear. Després, un cop retirada la formulació, es retiren capes successives d'estrat corni amb l'ajuda d'una cinta adhesiva. Finalment, es determina la concentració de principi actiu de les cintes adhesives (Brain, 2002).

Són diversos els sistemes utilitzats per a les mesures *in vitro* de la permeació cutània, des de cel·les de difusió estàtiques de dos compartiments fins a cel·les encamisades de flux continu. Les cel·les de difusió estàtiques més utilitzades són les de tipus vertical (cel·les de Franz) amb compartiments receptors de volums d'entre 2 a 10ml i àries d'exposició a la membrana d'entre 0,2 a 2cm² (Brain, 2002).

Les cel·les de difusió de Franz consten d'un compartiment donador i d'un altre receptor separats entre si per una membrana (Figura 1.7).

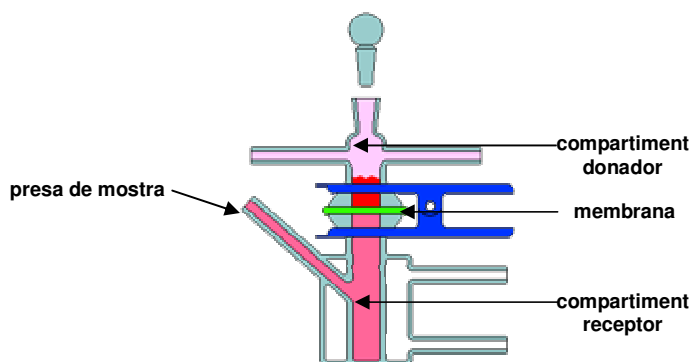


Figura. 1.7. Esquema d'una cel·la de difusió de Franz.

La membrana més adequada per aquests tipus d'experiments és la pell humana. Nombrosos estudis han mostrat que cap altre tipus de membrana prediu perfectament els resultats obtinguts amb la pell humana. No obstant, degut a la dificultat de la seva obtenció es sol utilitzar pell d'animals. D'entre elles, la pell de porc presenta propietats histològiques, bioquímiques i, fins i tot, una permeabilitat similars a la humana (Gray, 1975; Priborsky, 1990). D'altres pells d'animal utilitzades són la de rata, ratolí i conill d'índies, tot i que presenten velocitats de permeació superiors en comparació a la pell humana (Roberts, 1990; Pendlington, 1998). També s'utilitza pell

reconstituïda mitjançant cultius cel·lulars o membranes artificials d'acetat de cel·lulosa, de polidimetilsiloxà, entre d'altres, o sistemes laminars dissenyats per imitar els lípids intercel·lulars de l'estrat corni (Flynn, 1972; Tanaka, 1985). No obstant, les membranes artificials no mesuren velocitats de permeació equivalents a les humanes, ni prediuen interaccions entre els excipients del vehicle i la capacitat de permeació d'un principi actiu.

La secció de pell a utilitzar en aquest tipus d'experiments també resulta de gran importància. Per principis actius lipòfils es recomanable utilitzar només l'epidermis. Tot i que hi ha diverses tècniques per separar l'epidermis de la dermis, una de les més simples és la utilització del dermatoma (Clowes, 1993). En el cas de principis actius polars, la presència o absència de la dermis, de caràcter hidròfil, no afecta la velocitat de permeació, doncs, la barrera que proporciona l'estrat corni resulta un factor prou limitant per la permeació d'aquest tipus de substàncies (Dick, 1992).

La permeació de substàncies a través de la pell es produeix per un procés de difusió passiva (Guy, 1989). Tenint en compte la permeació de principis actius solubilitzats en un vehicle a través de la pell, la situació d'estat d'equilibri més simple es produeix quan la concentració de principi actiu en el vehicle és constant i, quan, en el compartiment receptor es donen condicions *sink*. S'assumeix que les condicions *sink* es mantenen quan la concentració final en la solució receptora no sobrepassa del 10–20% de la concentració a saturació (Hanson, 1982; Guy and Hadgraft, 1989). El compliment de condicions *sink* assegura que la difusió no està limitada per la solubilitat del principi actiu. Quan la concentració de principi actiu en el vehicle és molt elevada es considera que aquesta roman constant ja que la disminució de la concentració durant el procés de permeació no és significativa. És el que s'anomena una solució donadora infinita. Així, en donar-se l'estat d'equilibri el gradient de concentració a través de la membrana és lineal i els paràmetres de permeació es poden calcular segons la primera llei de difusió de Fick (Equació 1.11) (Higuchi, 1960).

$$J = \frac{D_m K}{L} C_v \quad \text{Equació 1.11}$$

La velocitat de permeació del principi actiu d'un compartiment a l'altre a través de la pell es determina mesurant la quantitat de principi actiu permeat en funció del temps mitjançant un mètode analític, per exemple, cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). En representar la quantitat permeada acumulada de principi actiu en funció del temps la velocitat de permeació o flux, J , en estat d'equilibri estacionari es pot calcular a partir de la pendent de la fracció lineal de la corba permeació-temps.

Si s'agrupen els termes D_m , K i L s'obté la següent equació:

$$J = K_p C_v \quad \text{Equació 1.12}$$

on K_p és el coeficient de permeabilitat del principi actiu a través de la pell des del vehicle en el que està solubilitzat.

Mitjançant l'extrapolació de la part lineal de la corba de l'estat estacionari a la intersecció de l'eix *temps* s'obté el temps de latència, t_{lag} (Friend, 1992) (Equació 1.13) (Figura 1.8).

$$t_{lag} = \frac{L^2}{6D_m} \quad \text{Equació 1.13}$$

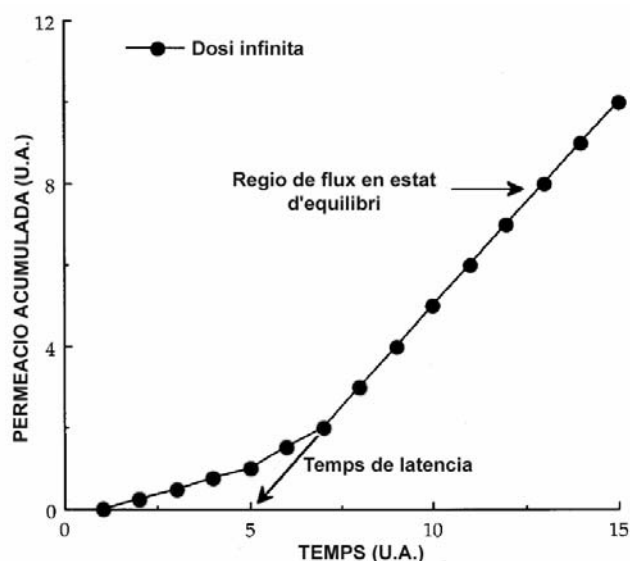


Figura 1.8. Temps de latència calculat a partir d'extrapolar la part lineal de la corba *permeació acumulada-temps* (en estat estacionari) a l'eix *temps*.

L'anàlisi de les dades considerant una solució donadora infinita depèn de que durant l'assaig s'assoleixin les condicions adients per a que es produeixi l'estat d'equilibri. En cas de que no sigui així, s'aplica el model de dosi finita, en el que la corba permeació de principi actiu acumulat enfront temps s'ajusta a la segona llei de difusió de Fick (Albery, 1979; Albery, 1983; Watkinson, 1994). En aquest model es considera que a mesura que el principi actiu permea a través de la pell, la seva concentració a la superfície disminueix. La segona llei de difusió de Fick pot utilitzar-se per analitzar les velocitats d'alliberació des de pegats transdèrmics de tipus matricial, per avaluar la fase de latència anterior a l'establiment de l'estat d'equilibri i per descriure els perfils de concentració a través de la pell fins que evolucionen a la linealitat (Hadgraft, 2003). A més, l'ajust a la segona llei de difusió de Fick és particularment útil en l'anàlisi de dades dels experiments de *tape stripping* (Alberti, 2001; Kalia, 2001). No obstant, s'han observat grans errors dels valors ajustats a la segona llei. Les conclusions obtingudes per *Harrison et al.* en determinar la velocitat de permeació del cianofenol a través de la pell en vehicles amb diferents promotors de la permeació estan limitades, segons els autors, per l'anàlisi de dades, que es van ajustar a la segona llei de difusió de Fick (Harrison, 1996).

1.3.4. IDONEÏTAT DE FORMULACIONS PER A SER ADMINISTRADES SOBRE LA PELL

Algunes substàncies quan estan en contacte amb la pell i penetren l'estrat corni poden causar dany o mort cel·lular. Aquest efecte dona lloc a una dermatitis irritativa que és una reacció inflamatòria local de la pell que es manifesta amb l'aparició d'eritemes i edemes. D'altres substàncies, en penetrar la pell, poden estimular una resposta immunològica. Si es repeteix el contacte amb aquesta substància es produirà una reacció immunològica inflamatòria, amb eritema, edema i vesiculació. Finalment, hi ha substàncies que s'activen amb la incidència de radiacions ultraviolades donant lloc, en contacte amb la pell, a reaccions adverses fototòxiques o fotosensibilitzants (Dykes, 2002).

La Directiva del Consell de la CEE (Council Directive, 1976) obliga a realitzar assaigs per determinar el potencial de substàncies a induir irritació i/o sensibilització al·lèrgica, tot i que no estan establertes les condicions específiques dels assaigs. La majoria dels assaigs predictius s'efectuen en animals, i en menor proporció, en humans. No obstant, la pell humana és única degut a la seva morfologia i funció de barrera, trobant-se molts cops una poca correlació entre les dades obtingudes en experiments realitzats en animals i en humans (Dykes, 2002). Pels motius científics esmentats i per motius morals, la tendència actual va dirigida cap a una menor utilització d'assaigs basats en l'experimentació animal.

1.3.4.1. TEST DE DRAIZE

La tècnica de Draize (Draize, 1944) és el procediment de referència pels assaigs d'irritabilitat des de l'any 1976 segons el Code of Federal Regulations (Code of Federal Regulations, 1976). L'assaig consisteix en l'aplicació oclusiva de la substància a experimentar en la pell prèviament rasurada de conills albins durant 24h. Després d'aquest temps es valoren les lesions de la pell, en funció del grau d'eritema i edema provocats. La valoració és subjectiva i dona una puntuació que permet classificar als

productes segons diferents nivells d'irritació. La pell de conill és més sensible que la pell humana, de manera que mitjançant aquesta tècnica s'identifica tota substància capaç d'irritar la pell humana. A Europa s'està considerant la reducció de la durada de l'assaig de 24 fins a 4 hores o fins i tot menys, perquè té la mateixa eficàcia per estudiar la irritació induïda i és un tractament més suau per als animals.

En el cas de les dermatitis al·lèrgiques la tècnica més utilitzada és una variant de l'assaig de Draize en la que la substància a assajar s'injecta 10 vegades durant 3 setmanes en conills d'índies. No obstant, en aquest tipus de dermatitis, el procediment que dona lloc a una major diferenciació és, probablement, el de Magnusson i Kligman, i es coneix com l'assaig de maximització (Magnusson, 1970; Magnusson, 1980). Aquest es realitza també amb conills d'índies als que s'injecta la substància a assajar juntament amb el coadjuvant de Freund que potencia l'efecte sensibilitzant.

El potencial fotoirritant de substàncies es determina mitjançant una modificació del test de Draize. En aquest cas s'utilitza la pell de conills, conills d'Índies, rates i ratolins rasurada. Després d'aplicar la substància a assajar la pell es sotmesa a una font controlada de llum ultraviolada durant un cert temps. Posteriorment es valora el grau d'irritació per l'aparició d'edema i d'eritema de mateixa que el test de Draize original (Lovell, 1992; Vohr, 2000).

En els últims anys s'han desenvolupat nombrosos mètodes alternatius *in vitro* per suplir els tradicionals. Aquests nous mètodes s'han de validar prèviament per demostrar la seva eficàcia i reproduïbilitat per tal de poder substituir els mètodes amb animals. Un producte irritant en actuar sobre la pell provoca l'alliberació de citoquines, com la IL-1 α , que desencadena una sèrie de respostes que allibera d'altres citoquines, com la IL-6, la IL8, etc. Aquestes últimes provoquen canvis morfològics com la vasodilatació i l'activació de cèl·lules endotelials que es tradueix en símptomes com l'eritema i l'edema (Coquette, 2003). Els dos tipus cel·lulars majoritaris són els que s'utilitzen en els estudis *in vitro*, existint diferents tipus de cultius (primaris, línies cel·lulars i kits comercials). L'assaig de fotoirritació és l'únic d'ells que està totalment validat i acceptat per la legislació. En aquest

mètode es determina la viabilitat cel·lular després de l'aplicació de diferents concentracions de la substància a assajar i es determina el valor de la concentració que provoca una viabilitat del 50% de les cèl·lules (EC50). L'assaig es repeteix però sotmetent les cèl·lules a una font controlada de llum ultraviolada. Si en presència de llum ultraviolada el producte presenta una EC50 inferior que en condicions control es considera que el producte és fotoirritant (Benavides, 2004).

1.3.4.2. PÈRDUA TRANSEPIDÈRMICA D'AIGUA

L'aigua pot evaporar-se a través de la pell, per la difusió constant de vapor d'aigua a través de l'epidermis i a través de la suor. Mitjançant la mesura del primer procés es pot establir la integritat de la funció de barrera de la pell, sempre i quan es controlin d'altres factors que també afecten a la difusió de vapor d'aigua, la temperatura, la humitat i la pressió atmosfèrica. En una pell fisiològicament normal la funció de barrera de l'estrat corni és efectiva i la velocitat de difusió de vapor d'aigua és petita. En canvi, quan la pell sofreix un procés patològic (dermatitis, psoriasi, etc.), o bé, quan està en contacte amb un agent físic o químic (tensioactius, àcids, olis, etc.) la difusió de vapor d'aigua a través de la pell és elevada.

D'aquesta manera, la funció de barrera de la pell pot caracteritzar-se mitjançant la pèrdua transepidermica d'aigua (TEWL). L'evaporímetre és l'aparell més utilitzat per aquest tipus de determinacions (Pinnagoda, 1989) i mesura la quantitat total de vapor d'aigua per unitat d'àrea de pell i per hora, és dir, la velocitat d'evaporació. L'augment de TEWL és proporcional al grau de destrucció de l'estructura de la capa còrnia (Lotte, 1987; Kompore, 1991).

El mètode mitjançant el qual es calcula la velocitat d'evaporació fou desenvolupat per Nilsson (Nilsson, 1977) i està basat en la primera llei de Fick de la difusió. Si es considera que el gradient de pressió de vapor a prop de la superfície de la pell (p. ex. a 1 cm) és proporcional, aproximadament, a la diferència entre la pressió de vapor mesurada entre dos punts fixes i

situats perpendicularment a la superfície de la zona de difusió es pot aplicar la següent equació:

$$\frac{1}{A} \frac{\delta m}{\delta t} = -D \frac{\delta p}{\delta x} \quad \text{Equació 1.14}$$

on A (m²) és l'àrea de la superfície en contacte amb la pell, m (g) és la massa d'aigua transportada, t (h) és el temps, D és una constant relacionada amb el coeficient de difusió i que equival a 0,0877 g/m.h.mmHg, p (mmHg) és la pressió parcial de vapor d'aigua a l'atmosfera i x (m) és la distància des de la superfície fins al punt de medició.

A partir de l'Equació 1.14 es dedueix que la velocitat d'evaporació, dm/dt , és proporcional al gradient de pressió parcial, dp/dx .

La mesura de la TEWL és un mètode ben acceptat actualment i molt utilitzat per quantificar les alteracions de la funció de l'estrat corni (Wilson, 1989; Kompore, 1991; Pinnagoda, 1995; Delgado-Charro, 1997; Fuchs, 2000; Curdy, 2003).

Lehmann et al. han estudiat els efectes irritants sobre la pell de dues emulsions amb composicions diferents que contenen 0,05% de tretinoïna i 3% d'eritromicina enfront d'una emulsió sense cap principi actiu mitjançant mesures de la pèrdua transepidermica d'aigua. Les formulacions es van aplicar de manera oclusiva durant 6 hores en l'avantbraç de 20 voluntaris. Després de 30 minuts de l'extracció de les mostres es va mesurar la TEWL. Els resultats van mostrar que la tretinoïna augmentava els valors de TEWL incorporada en les emulsions com a únic principi actiu o combinada amb eritromicina (Lehmann, 1998).

Boelsma et al. han estudiat els efectes irritants sobre la pell de l'àcid oleic mitjançant determinacions de la TEWL. L'assaig va consistir en l'aplicació oclusiva durant 3 hores d'un 5% d'àcid oleic dissolt en propilenglicol i de propilenglicol com a mesura control en l'avantbraç de 9 voluntaris. Les

mesures de TEWL es van realitzar 3 hores i 24 hores després de l'extracció de la formulació. Els valors de TEWL normalitzats (relació entre el valor de la mesura obtinguda de TEWL dividida pel valor obtingut sense formulació) van ser elevats en les dues determinacions, a les 3 i a les 24 hores, indicant una pertorbació en la funció de barrera de la pell deguda a l'aplicació d'àcid oleic (Boelsma, 1996).

D'altres mètodes utilitzats per predir una irritació cutània són la mesura de la hidratació cutània (Serban, 1981), la mesura d'emissió de CO₂ que augmenta en proporció amb el grau d'irritació (Malten, 1973) i la mesura de la reflectància del color de la pell (Clarys, 1991).

1.3.4.3. □QUANTIFICACIÓ DELS CANVIS DE COLOR DE LA PELL

El color de la pell està determinat, principalment, per pigments com l'hemoglobina, la melanina, la bilirrubina i el caroté. Aquestes substàncies es poden alterar significativament mitjançant radiacions de llum ultraviolada o infraroja, o bé, per l'acció de diverses substàncies (principis actius, irritants, entre d'altres). La quantificació dels canvis del color induïts experimentalment és una tècnica àmpliament utilitzada en el camp cosmètic i dermofarmacèutic com a mesura indicativa de les propietats de la pell relacionades amb la integritat de la barrera de la pell, les propietats dels principis actius relacionades amb la seva concentració i la biodisponibilitat, les propietats del vehicle i propietats protectores, per exemple, dels protectors solars enfront les radiacions ultraviolades (Wheeler, 1976; Agache, 1989). Fins fa poc temps la determinació del color de la pell es realitzava visualment. No obstant, tot i que l'ull humà és molt sensible a la discriminació entre colors li resulta difícil la seva memorització, sent, doncs, inadequat per comparar resultats obtinguts en diferents temps i llocs. Per aquest motiu s'han desenvolupat mètodes estandarditzats per quantificar el color.

Existeixen diversos mètodes per expressar els colors d'un objecte o d'una font lluminosa de manera numèrica. En els últims anys, una organització

internacional relacionada amb la llum i el color, la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage), n'ha desenvolupat alguns. Entre ells, el sistema de colors $L^*a^*b^*$ desenvolupat l'any 1976, també conegut com CIELAB, és un mètode d'indexació de colors internacionalment acceptat i àmpliament utilitzat (Agache, 1989; Weatherall, 1992). En aquesta escala el color s'expressa en un sistema de coordenades tridimensional on L^* representa el grau de lluentor que varia de blanc a negre, i a^* i b^* són les coordenades cromàtiques. Els valors positius d' a^* són indicatius de la direcció del vermell, mentre que els valors negatius d' a^* representen la direcció del verd. En quan a la coordenada b^* , els valors positius són la direcció del groc i els negatius la direcció del blau. La Figura 1.9 mostra el diagrama cromàtic d' a^* i b^* . El centre del diagrama és acromàtic (nombre 0) (Konica Minolta, 2004).

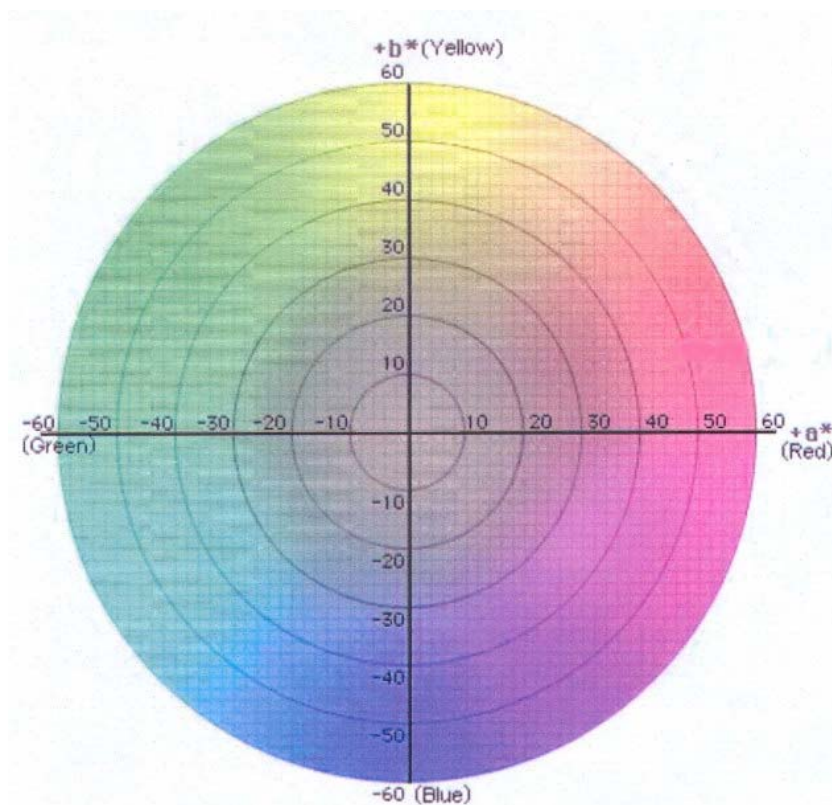


Figura.1.9. Diagrama cromàtic d' a^* i b^* .

El color es pot mesurar mitjançant un colorímetre o bé un espectrofotòmetre. El colorímetre utilitza un mètode de reflectància triestímul en el que el sensor que capta la llum és un conjunt de tres sensors amb tres longituds d'ona diferents. L'espectrofotòmetre, en canvi, gaudeix d'un sensor espectral que consta de múltiples sensors captadors de llum en el rang visible de l'objecte. L'espectrofotòmetre s'utilitza en anàlisis que requereixen una elevada precisió i un tractament acurat dels colors, principalment en àrees d'investigació i desenvolupament (Konica Minolta, 2004).

Nombrosos estudis han constatat que la mesura del paràmetre a^* sembla ser el mètode més fiable per quantificar un eritema mitjançant mesures del color de la pell (Claris, 1993; Lathi, 1993; Treffel, 1993). D'altres tècniques utilitzades, com ara la TEWL i el Lasser Doppler donen lloc a resultats amb major variabilitat que l'obtinguda mitjançant el colorímetre o l'espectrofotòmetre.

Lahti et al. van estudiar la detecció d'eritemes induïts pel contacte per via tòpica d'àcid benzoic 250mM o de nicotinat de metil 10mM en mesclades d'hidrocarburs derivats de petroli aplicats de manera no oclusiva o per radiació ultraviolada en la part superior de l'esquena de 15 voluntaris. Es va mesurar l'eritema aparegut mitjançant l'observació visual, la fluxmetria de làser Doppler, un espectoradiòmetre, un eritemòmetre de dos canals i un espectrofotòmetre de Minolta. Els resultats van mostrar una bona correlació entre l'observació visual i la resta de tècniques utilitzades per les mesures. Mitjançant la fluxmetria per làser Doppler es van obtenir resultats menys repetibles que amb la resta de tècniques utilitzades quan es van mesurar eritemes provocats per radiacions ultraviolades (Lahti, 1993).

Wilhelm et al. van detectar l'aparició d'eritemes induïts per l'aplicació de diferents concentracions de lauril sulfat sòdic en la pell. La irritació es va mesurar mitjançant mesures de la reflectància de la llum, TWEL, fluxmetria de làser Doppler i observació visual. Tots els mètodes utilitzats van detectar una dependència respecte la dosi de lauril sulfat sòdic i el grau de gravetat de l'eritema. Es va observar una bona correlació entre les diferents tècniques assajades (Wilhelm, 1989).