

Caracterització espectroscòpica i cromatogràfica de sistemes d'alliberament controlat preparats mitjançant tecnologies supercrítiques

Anna Argemí Garcia

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.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

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

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



UNIVERSITAT DE BARCELONA



FACULTAT DE QUÍMICA

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

Programa de doctorat:

QUÍMICA ANALÍTICA DEL MEDI AMBIENT I LA POL·LUCIÓ

(BIENNI: 2005-2007)

**CARACTERITZACIÓ ESPECTROSCÒPICA I CROMATOGRÀFICA DE
SISTEMES D'ALLIBERAMENT CONTROLAT PREPARATS MITJANÇANT
TECNOLOGIES SUPERCRÍTIQUES**

Memòria presentada per Anna Argemí Garcia per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Setembre 2010

Director:

Dr. Javier Saurina Purroy

Javier Saurina Purroy, professor titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

FAIG CONSTAR:

Que la present memòria titulada “CARACTERITZACIÓ ESPECTROSCÒPICA I CROMATOGRÀFICA DE SISTEMES D’ALLIBERAMENT CONTROLAT PREPARATS MITJANÇANT TECNOLOGIES SUPERCRÍTIQUES” ha estat realitzada sota la meva direcció per la Sra. Anna Argemí Garcia en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats en ella són fruit dels experiments realitzats per la doctoranda prèviament mencionada.

Barcelona, Setembre 2010

Dr. Javier Saurina Purroy

Professor titular del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

ACRÒNIMS

5-AZA	5-Azacitidina
5-FU	5-Fluorouracil
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AINE	Antiinflamatoris no esteroïdals
ARN	Àcid ribonucleic
ASES	<i>Aerosol solvent extraction system</i>
ATR-FTIR	<i>Attenuated total reflection - Fourier transform infrared</i>
DMSO	Dimetilsulfòxid
BCS	Sistema de classificació biofarmacèutica
CAF	Cafeïna
DSC	<i>Differential scanning calorimetry</i>
EC	Etilcel·lulosa
EFA	Anàlisi de factors evolutius
EVA	Etilè vinil acetat
FDA	<i>Food and drug administration</i>
FSC	Fluid supercrític
FTIR	Espectroscòpia infraroja amb transformada de Fourier
GAS	<i>Gas antisolvent</i>
GI	Gastrointestinal
GMS	Monoestearat de glicerol
GSH	Glutatió
HCO	<i>Hydrogenated castor oil</i>
HTB	Àcid 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoic
KET	Ketoprofèn
LOD	Límit de detecció
L-PLA	Àcid poli(L-làctic)
MCR-ALS	Resolució multivariant de corbes mitjançant mínims quadrats alternats
MEC	Mínima concentració efectiva
MeOH	Metanol
MTC	Mínima concentració tòxica

NAP	Naproxèn
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PGSS [®]	<i>Particles from gas-saturated solutions</i>
PLGA	Àcid poli(làctic- <i>co</i> -glicòlic)
PMMA _{BP}	Poli(metacrilat de metil) en boles de Bonar Polymers
PMMA _{GF}	Poli(metacrilat de metil) en barra de Goodfellow
PVP	Polivinilpirrolidona
PVP-VA	Polivinilpirrolidona- <i>co</i> -vinilacetat
RESS	<i>Rapid expansion of supercritical solutions</i>
RGU	1- β -D-ribofuranosil-3-guanilurea
RGU-CHO	N-formil-N'- β -D-ribofuranosilguanilurea
RMN	Ressonància magnètica nuclear
RP-HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució en fase invertida
SAS	<i>Supercritical fluid antisolvent</i>
scCO ₂	Diòxid de carboni supercrític
SEDS	<i>Solution enhanced dispersion by supercritical fluids</i>
SEM	<i>Scanning electron microscopy</i>
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
SIMPLISMA	<i>Simple to use interactive self-modelling mixture analysis</i>
SLP	Partícules lipídiques sòlides
SVD	<i>Singular value decomposition</i>
T_g	Temperatura de transició vítria
T_m	Temperatura de fusió
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometà
TRF	Triflusal
USP	Farmacopea dels Estats Units
UV	Ultraviolat
Vis	Visible

Capítol 1. Objectius i estructura de la tesi	1
1.1. Objectius	3
1.2. Estructura de la tesi	4
1.3. Relació de treballs científics presentats en la memòria	4
Capítol 2. Introducció general	7
2.1. Sistemes d'alliberament de fàrmacs	9
2.1.1. Definició terminològica	9
2.1.2. Passat, present i futur de l'alliberament de fàrmacs	9
2.1.3. Innovacions	13
2.2. Fàrmacs emprats en sistemes d'alliberament	14
2.3. Polímers emprats en sistemes d'alliberament	16
2.4. Introducció als fluids supercrítics	21
2.5. L'ús de diòxid de carboni pressuritzat o supercrític en aplicacions farmacèutiques	23
2.5.1. Tècnica d'expansió ràpida de solucions supercrítics (RESS)	26
2.5.2. Tècnica d'antisolvent supercrític (SAS)	26
2.5.3. Tècnica de generació de partícules a partir de solucions de gas saturades (PGSS [®])	27
2.5.4. Tècnica d'impregnació discontinua	27
2.5.5. Revisió d'aplicacions farmacèutiques recents	28
2.6. Caracterització de sistemes d'alliberament de fàrmacs	32
2.6.1. Test de dissolució per a compostos sòlids	32
2.6.2. Cel·la de difusió de Franz	35
2.6.3. Models matemàtics per al seguiment d'alliberament de fàrmacs	36
2.6.4. Altres mètodes d'anàlisi	38
2.7. Quimiometria	42
2.7.1. Tipus de mesures instrumentals: univariants i multivariants	42
2.7.2. Resolució multivariant de corbes basada en mínims quadrats alternats	44
2.7.3. Aplicació de models físicoquímics	49
2.7.4. Resolució simultània de diverses matrius de dades	51
2.7.5. Pretractament de dades espectrals amb filtres de Savitzky-Golay	52
2.7.6. Disseny d'experiments	52
2.8. Bibliografia	54

Capítol 3. Part experimental	61
3.1. Productes químics	63
3.2. Mètodes d'anàlisi de les mostres	65
3.2.1. Anàlisi calorimètrica diferencial	65
3.2.2. Microscòpia electrònica de rastreig	66
3.2.3. Microscòpia confocal de fluorescència	66
3.2.4. Espectrofotometria ultraviolada visible	66
3.2.4.1. Sistema amb parada de flux per al seguiment de processos cinètics	67
3.2.4.2. Sistema en flux continu per a estudis àcid-base	68
3.2.4.3. Sistema en flux continu per al seguiment de processos d'alliberament de fàrmacs	69
3.2.4.4. Sistema en flux continu per al seguiment de processos d'alliberament controlat de fàrmacs inestables	69
3.2.5. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) amb detecció UV i fluorescència	70
3.3. Elaboració dels sistemes d'alliberament controlat	72
3.3.1. Equip d'impregnació en mode discontinu	72
3.3.2. Equip de formació de partícules basat en la tècnica antisolvent	73
3.3.3. Equip de generació de partícules a partir de solucions de gas saturades	75
3.3.4. Equip d'impregnació per a la preparació de pegats transdèrmics	76
Capítol 4. Caracterització d'un sistema d'alliberament controlat del fàrmac triflusal mitjançant tècniques espectroscòpiques i cromatogràfiques	79
4.1. Introducció	81
4.2. <i>Spectroscopic and chromatographic characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation technologies</i>	83
4.3. Altres estudis i discussió de resultats	93
4.3.1. Establiment de mètodes analítics (espectroscòpic i cromatogràfic)	93
4.3.2. Caracterització de les mostres preparades	96
4.4. Bibliografia	100

Capítol 5. Preparació i caracterització de fàrmacs inestables mitjançant sistemes en flux continu i cromatografia de líquids: fàrmac model, 5-azacitidina	103
5.1. Introducció	105
5.2. <i>Study of the degradation of 5-azacytidine as a model of unstable drugs using a stopped-flow method and further data analysis with multivariate curve resolution</i>	109
5.3. <i>Characterization of acid-base properties of unstable drugs using a continuous-flow system with UV-vis spectrophotometric detection</i>	119
5.4. <i>Characterization of azacytidine/poly(L-lactic) acid particles prepared by supercritical antisolvent precipitation</i>	129
5.5. Altres estudis i discussió de resultats	137
5.5.1. Estudis d'estabilitat	137
5.5.2. Determinació dels valors de pK _a de l'azacitidina	141
5.5.3. Optimització del mètode cromatogràfic per a la caracterització dels processos d'alliberament de l'azacitidina	144
5.5.4. Caracterització dels sistemes d'alliberament controlat de 5-AZA/L-PLA	147
5.5.5. Caracterització del sistema d'alliberament 5-AZA, 5-FU/L-PLA, PLGA	149
5.6. Bibliografia	152
Capítol 6. Preparació i caracterització de fàrmacs amb aplicacions tòpiques i transdèrmiques: cel·la de difusió de Franz	155
6.1. Introducció	157
6.2. <i>Development of a polymeric patch impregnated with naproxen as a model of transdermal sustained release system</i>	161
6.3. <i>Evaluation of release profiles of ketoprofen entrapped in solid lipid particles as a model of topical formulation using a Franz diffusion cell</i>	173
6.4. Altres estudis i discussió de resultats	197
6.4.1. Desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a la determinació de ketoprofèn i naproxèn	197
6.4.2. Estudis d'impregnació del pegat de naproxèn	200
6.4.3. Estudi d'altres sistemes preparats amb PGSS®	203
6.5. Bibliografia	207
Capítol 7. Conclusions	209

CAPÍTOL 1

Objectius i estructura de la tesi

1.1. Objectius

Aquesta tesi doctoral recull part de la recerca realitzada en un projecte europeu (*Sustainable surface technology for multifunctional materials, Surface-T, NMP2-CT-2005-013524*) sobre el desenvolupament de nous materials multifuncionals en el camp de la nanotecnologia i la nanociència. Així doncs, els objectius principals d'aquesta tesi estan directament relacionats amb l'esmentat projecte.

En els últims 40 anys s'han desenvolupat noves tecnologies relacionades amb el recobriment o immobilització de compostos químics dins estructures polimèriques. A part de la seva utilització com a biomaterials i fàrmacs, també tenen aplicació en els camps dels pigments i dels plàstics. En el camp dels medicaments, el polímer pot protegir el fàrmac del medi fisiològic i, per tant, permet millorar la seva estabilitat *in vivo*. Tanmateix, el recobriment i la impregnació de fàrmacs són molt atractius en l'elaboració de sistemes d'alliberament controlat.

Els objectius principals de la tesi doctoral són el desenvolupament i establiment de metodologies per a la preparació i caracterització de fàrmacs, ja sigui com a principis actius purs o immobilitzats en matrius polimèriques. Els estudis de caracterització es desenvoluparan principalment al nostre grup de recerca i en la preparació de sistemes d'alliberament de fàrmacs es realitzarà en col·laboració amb altres grups de recerca.

En una primera etapa, l'objectiu és la caracterització fisicoquímica preliminar de diversos fàrmacs model seleccionats per a la posterior preparació dels sistemes d'alliberament controlat. En aquesta part s'estableixen mètodes analítics adients basats en la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) i l'anàlisi en flux continu amb detecció espectrofotomètrica. Complementàriament, s'utilitzen tractaments quimiomètrics per analitzar les dades generades per tal d'augmentar la qualitat de la informació obtinguda. L'extracció de la informació analítica d'aquests sistemes ens pot portar a la utilització de mètodes de resolució multivariant de corbes per mínims quadrats alternats (MCR-ALS).

La segona etapa consisteix en la preparació i caracterització d'alguns dels sistemes model d'alliberament controlat amb els fàrmacs candidats. S'explora l'aplicabilitat de les tecnologies netes basades en fluids supercrítics (particularment del CO₂) per a l'elaboració d'aquests productes. Posteriorment, la investigació va dirigida a estudiar les propietats fisicoquímiques de les noves formulacions. Així doncs, es pretén estudiar les morfologies de les mostres a nivell macroscòpic, determinar les temperatures característiques dels sistemes i obtenir els perfils cinètics de l'alliberament. Les tècniques emprades amb

aquestes finalitats són la microscòpia electrònica de rastreig, la microscòpia confocal de fluorescència, l'anàlisi calorimètrica diferencial i la cromatografia de líquids amb detecció ultraviolada (UV) i de fluorescència.

1.2. Estructura de la tesi

La memòria està dividida en set capítols. En el primer capítol s'introdueix la tesi, es presenten els objectius i es detalla l'estructura de la memòria.

En el segon capítol s'introdueixen bibliogràficament els sistemes d'alliberament de fàrmacs i es descriuen breument els tipus de fàrmacs i l'aplicabilitat dels polímers que s'utilitzen en aquests sistemes. A continuació s'expliquen les diferents tècniques per a l'elaboració d'aquests mitjançant l'ús de fluids supercrítics (i en concret, el CO₂) i es presenta un resum de les metodologies analítiques que es fan servir per a caracteritzar aquests tipus de sistemes. En aquest capítol també es comenten aspectes generals dels mètodes quimiomètrics emprats.

En el tercer capítol es recullen els productes químics i els instruments emprats en els diferents mètodes que es descriuen a continuació.

Posteriorment es presenten els resultats obtinguts per a l'estudi dels sistemes triflusal/poli(metacrilat de metil) (capítol 4), 5-azacitidina/àcid poli(L-làctic) (capítol 5), naproxèn/etilè vinil acetat, Eudragit[®] E100 i ketoprofèn/monoestearat de glicerol, oli de ricí hidrogenat (capítol 6). Tots ells són sistemes preparats amb diferents tecnologies supercrítics per a aplicacions ben diverses: via cardiovascular, oral, transdèrmica i tòpica. Aquests tres capítols comencen amb una breu introducció, continuen amb la presentació dels articles científics publicats i finalitzen amb la descripció de resultats addicionals conjuntament amb una discussió global d'aquests.

Per últim, les conclusions globals de la memòria s'exposen en el capítol 7.

1.3. Relació de treballs científics presentats en la memòria

1. Spectroscopic and chromatographic characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation technologies

Autors: A. Argemí, A. López-Periago, C. Domingo, J. Saurina

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 456-462.

Enllaç: [doi:10.1016/j.jpba.2007.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.005)

2. Study of the degradation of 5-azacytidine as a model of unstable drugs using a stopped-flow method and further data analysis with multivariate curve resolution

Autors: A. Argemí, J. Saurina

Talanta 74 (2007) 176-182.

Enllaç: [doi:10.1016/j.talanta.2007.05.053](https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.05.053)

3. Characterization of acid–base properties of unstable drugs using a continuous-flow system with UV–vis spectrophotometric detection

Autors: A. Argemí, J. Saurina

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007) 859-866.

Enllaç: [doi:10.1016/j.jpba.2007.03.028](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.028)

4. Characterization of azacytidine/poly(L-lactic) acid particles prepared by supercritical antisolvent precipitation

Autors: A. Argemí, A. Vega, P. Subra-Paternault, J. Saurina

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 847-852.

Enllaç: [doi:10.1016/j.jpba.2009.07.006](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.07.006)

5. Development of a polymeric patch impregnated with naproxen as a model of transdermal sustained release system

Autors: A. Argemí, J.L. Ellis, J. Saurina, D.L. Tomasko

Journal of Pharmaceutical Sciences (acceptat).

Enllaç: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jps.22346/abstract>

6. Evaluation of release profiles of ketoprofen entrapped in solid lipid particles as a model of topical formulation using a Franz diffusion cell

Autors: A. Argemí, C. Domingo, J. Saurina, A.R. Sampaio de Sousa, C.M.M. Duarte, C.A. García-González

(Enviat per a la seva publicació).

CAPÍTOL 2

Introducció general

2.1. Sistemes d'alliberament de fàrmacs

2.1.1. Definició terminològica

Es defineix un sistema d'alliberament de fàrmacs com una formulació o un dispositiu que permet la introducció d'una substància terapèutica al cos i millora la seva eficàcia i seguretat mitjançant el control de la velocitat, el temps i el lloc d'alliberament del fàrmac al cos [1]. Segons la Farmacopea dels Estats Units (USP) aquesta definició correspondria al terme d'alliberament modificat o extens. D'altra banda trobem sovint termes com alliberament controlat, alliberament prolongat, alliberament sostingut, alliberament retardat i de llarga actuació, però tots ells són sinònims d'alliberament extens. L'ús d'un o altre terme s'elegeix en funció de petites variacions en les característiques de l'alliberament.

2.1.2. Passat, present i futur de l'alliberament de fàrmacs

En les últimes dècades hi ha hagut un gran augment en el desenvolupament de nous fàrmacs. Les empreses farmacèutiques intenten millorar els seus productes sintetitzant compostos nous o amb estructures semblants a d'altres ja existents, o bé desenvolupant noves formes farmacèutiques amb característiques terapèutiques millorades.

Així doncs, va ser cap al 1970 quan es va produir un gran salt en benefici de la teràpia farmacèutica i es van començar a desenvolupar els primers fàrmacs en els quals s'intentava controlar la velocitat d'alliberament d'un principi actiu [2, 3]. Mentre que l'activitat i l'especificitat segueixen sent els principals objectius per a futurs desenvolupaments, avui en dia es treballa intensament en la creació de nous sistemes per intentar modular la duració i la intensitat en l'acció del fàrmac. Les formulacions més avançades que es troben actualment en el mercat farmacèutic són aquelles que responen a algun tipus de demanda fisiològica o patològica. No obstant això, els sistemes pràctics desenvolupats es limiten a alentir o augmentar la velocitat d'alliberament de manera controlada. Són moltes les vies d'administració explorades amb aquests nous sistemes: oral, rectal, parenteral, tòpica, etc. Per suposat, la via oral és la que domina aquest mercat.

Avui en dia en el camp farmacèutic s'empren molts tipus de biomaterials i fàrmacs amb composicions molt complexes, generalment formats per un compost actiu combinat amb excipients ben diversos. A banda d'això, també s'intenta que aquests fàrmacs actuïn

d'una manera més ràpida i eficient sobre les fonts que produeixen la malaltia o infecció. Un dels principals objectius d'aquesta teràpia és el d'aconseguir que el fàrmac actui terapèuticament durant un llarg període de temps. Tot i això, la metodologia per al transport d'aquests segueix sent un problema a resoldre, ja que per arribar a un òrgan o teixit en concret han de recórrer certes distàncies pel torrent sanguini. Normalment les concentracions dels fàrmacs són més elevades que les realment requerides per tal de mantenir la concentració terapèutica necessària. És per això que s'intenta evitar que s'assoleixin pics que superin la mínima concentració tòxica (MTC) en el torrent sanguini durant l'administració de dosis successives (Figura 2.1 a). La situació ideal seria la d'aconseguir mantenir l'alliberament entre nivells de mínima concentració efectiva (MEC) i de MTC durant un llarg període de temps (Figura 2.1 b) [4]. Aquest temps depèn del tipus d'aplicació farmacològica i pot durar des d'unes hores fins a 5 anys.

Troblem uns quants exemples de sistemes comercials d'alliberament de fàrmacs que han suposat grans avenços en el camp de la farmacologia: el pegat transdèrmic d'escopolamina per prevenir la cinetosi o mareig del viatger [5], el sistema terapèutic gastrointestinal (GI) de nifedipina per a l'alleujament de l'angina de pit i per a la hipertensió arterial [6], el pegat transdèrmic de fentanil emprat com a analgèsic i anestèsic [7], el sistema d'alliberament controlat de metilfenidat per al tractament del trastorn per dèficit d'atenció [8], el pegat transdèrmic de nitroglicerina usat com a vasodilatador i l'implant subdèrmic anticonceptiu de levonorgestrel de 5 anys de durada.

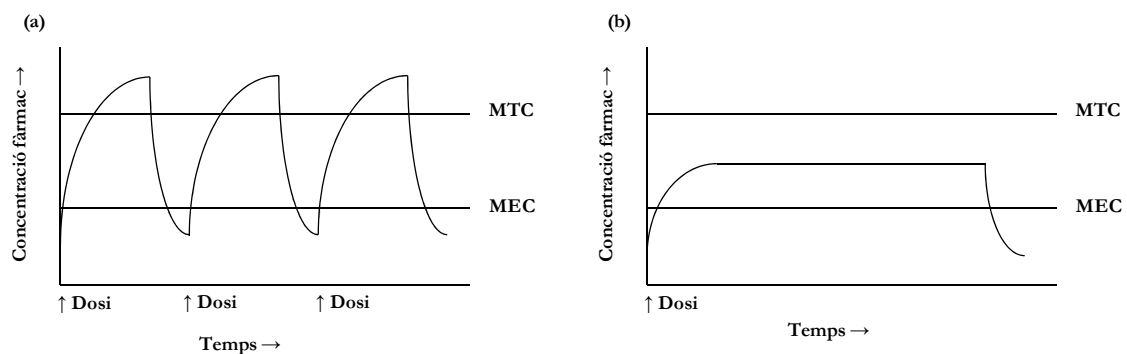


Figura 2.1. Perfils de concentració del fàrmac en sang mitjançant (a) l'administració tradicional i (b) l'alliberament controlat. MTC = mínima concentració tòxica; MEC = mínima concentració efectiva.

En els últims 40 anys s'han desenvolupat i registrat en la *food and drug administration* (FDA) de 20 a 50 nous fàrmacs (nous principis actius) d'ús en humans per any i un nombre semblant de diferents sistemes d'alliberament de fàrmacs recoberts o immobilitzats en

estructures polimèriques [9]. Aquests productes són, en realitat, noves formulacions de fàrmacs ja comercialitzats com a formes galèniques convencionals. Al començament del seu desenvolupament eren considerats exòtics, costosos o ornaments tecnològics; però actualment han esdevingut molt útils en el camp de la medicina, encara que el seu ús segueixi sent escàs.

Si es fa una cerca bibliogràfica al MEDLINE amb les paraules *drug delivery systems* ens podem adonar de com d'extens és aquest camp. Podem trobar-hi des de les primeres invencions associades a la medicina tradicional fins a un nombre enorme de noves patents farmacèutiques. Aquests materials biològicament compatibles es poden classificar en dos tipus diferents segons la seva composició. Així doncs, els orgànics estan formats per dos polímers, o bé una mescla d'un polímer i compostos orgànics de baix pes molecular, i els híbrids estan formats per una mescla de components orgànics i inorgànics. A partir d'aquests dos tipus de materials es poden obtenir estructures ben diverses com per exemple: (a) partícules amb superfícies modificades, (b) sistemes porosos impregnats internament i (c) materials dispersos en matrius polimèriques (Figura 2.2).

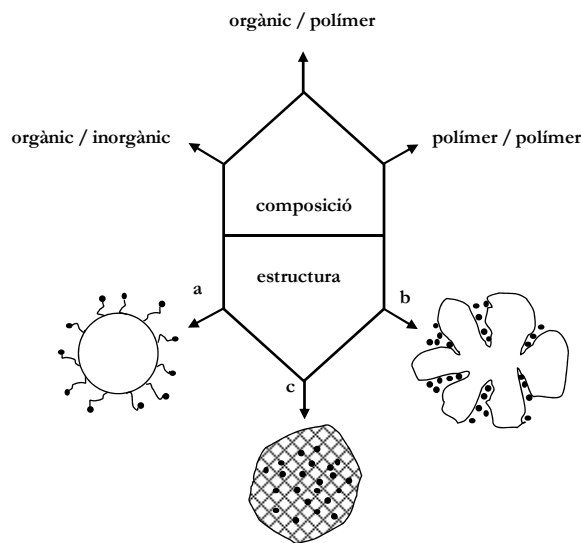


Figura 2.2. Esquema resum dels diferents tipus de materials biològicament compatibles i estructures freqüents que s'obtenen com a sistemes d'alliberament de fàrmacs: (a) partícules amb superfícies modificades, (b) sistemes porosos impregnats internament i (c) materials dispersos en matrius polimèriques.

Les finalitats d'aquestes noves tecnologies són ben diverses. Com a exemple, en citarem algunes amb les seves aplicacions. En primer lloc, s'intenta prolongar l'alliberament dels fàrmacs, com és el cas de les teràpies hormonals. En segon lloc, es prova

d'incrementar la biodisponibilitat de fàrmacs hidrofòbics com són alguns principis actius de baix pes molecular. I en tercer lloc, es volen incorporar pèptids i proteïnes en matrius per tal de protegir-los de degradacions enzimàtiques i afavorir d'aquesta manera el reconeixement i localització molecular del fàrmac en els receptors actius quan es duen a terme teràpies antitumorals o per al tractament de la síndrome d'immunodeficiència adquirida (SIDA).

Es troben amb freqüència fàrmacs que presenten inestabilitat un cop introduïts al cos humà. En molts casos es formen metabòlits tant actius com inactius, a conseqüència d'un procés de biotransformació.

Justament en aquest sentit, i en d'altres citats prèviament, va enfocat el desenvolupament de nous sistemes polimèrics bioactius amb incorporació de fàrmacs específics. El polímer protegeix el fàrmac del medi fisiològic i per tant, millora la seva estabilitat *in vivo*. Aquesta característica és molt atractiva en l'alliberament de compostos làbils.

A més a més, en molts casos s'introdueixen excipients dins de la matriu polimèrica per tal d'estabilitzar el fàrmac o de modular la cinètica del procés de degradació del polímer. En alguns estudis, s'utilitzen sals bàsiques com a excipients estabilitzants [10, 11]. En canvi, els excipients hidròfils poden accelerar el procés d'alliberament.

Malgrat els molts avantatges que presenten aquests sistemes, no podem oblidar-nos de certs desavantatges o limitacions que es poden produir en alguns casos, com són: la possible toxicitat, la bioincompatibilitat, la formació de productes de degradació indesitjats i l'alt cost de fabricació comparat amb el de les formulacions farmacèutiques tradicionals. També s'ha de tenir en compte que es poden produir variacions en els perfils d'alliberament quan s'ingereix menjar i en el cas de persones diferents a causa d'un metabolisme divers per a cada individu.

El sistema ideal hauria de ser inert, biocompatible, mecànicament fort, confortable per al pacient, capaç d'allotjar altes quantitats del fàrmac, segur de cara a alliberaments accidentals, simple d'administrar i de retirar i fàcil de fabricar i d'esterilitzar.

El futur d'aquests fàrmacs pot ser predit fins a cert punt. Alguns dels fàrmacs que es troben actualment al mercat desapareixeran i se'n descobriren d'altres. Algunes de les malalties actuals seran eliminades i apareixeran noves variants, segurament infeccioses. És per això que és difícil saber quins mètodes s'utilitzaran per alliberar uns fàrmacs que possiblement encara no coneixem.

2.1.3. Innovacions

En les passades dècades la recerca s'ha enfocat cap a rutes alternatives per a l'administració de nous medicaments que no poden ser alliberats en les tradicionals administracions orals i parenterals. Cada vegada més s'intenta que els alliberaments es produeixin de manera no invasiva. Així doncs, les rutes alternatives més prometedores en els últims anys han estat les nasal, bucal/sublingual, pulmonar i transdèrmica. Són considerades útils bàsicament perquè permeten eliminar les clàssiques deficiències trobades en noves formulacions moleculars (metabolismes de primer pas massa llargs, propietats fisicoquímiques desfavorables, efectes GI secundaris) o en alliberaments amb farmacocinètiques no òptimes en estudis preclínic. Les noves propostes es basen en la millora de: la fiabilitat de l'alliberament, la toxicitat en el lloc específic i, sobretot, el potencial per poder-los desenvolupar fàcilment. Algunes de les vies d'administració tradicionals i alternatives més comunes es troben resumides en la Taula 2.1 [1]. A més a més, per a cada via d'administració trobem diferents formes farmacèutiques. L'elecció d'una via d'administració depèn de diversos factors com poden ser el tipus de malaltia, l'efecte desitjat i la disponibilitat del producte.

Taula 2.1. Comparació de les principals vies d'administració d'alliberament de fàrmacs per absorció sistèmica.

CARACTERÍSTIQUES	VIA D'ADMINISTRACIÓ					
	Oral	Intravenosa	Intramuscular/ subcutània	Nasal	Transdèrmica	Inhalatòria/ pulmonar
Alliberament al torrent sanguini	Indirecte, a través del tracte GI	Directe	Absorció indirecta des dels teixits	Indirecte	Indirecte	Indirecte
Inici de l'acció	Lent	Ràpid	Moderat a ràpid	Ràpid	Moderat a ràpid	Ràpid
Biodisponibilitat	Baixa a alta	Alta	Alta	Moderada	Baixa	Moderada a alta
Control de la dosi	Moderat	Bo	Moderat	Moderat a bo	Pobre	Moderat a bo
Administració	Un mateix	Professional	Un mateix o un professional	Un mateix	Un mateix	Un mateix
Comoditat del pacient	Alta	Baixa	Baixa	Alta	Moderada	Alta
Efectes adversos	Malestar GI	Reacció aguda	Reacció aguda	Quasi negligibles	Irritació de la pell	Quasi negligibles
Ús per a proteïnes i pèptids	No	Sí	Sí	Sí	No	Sí

També s'han assolit considerables avenços en la millora dels temps d'alliberament. Actualment trobem en el mercat farmacèutic composicions d'una sola dosi en un dia fins a teràpies realment extenses. A més a més, s'ha fet un gran pas en la teràpia genètica i l'alliberament de proteïnes terapèutiques. Algunes millores en teràpies contra el càncer també podrien ser atribuïdes a aquestes noves formulacions.

Aquestes innovacions es reflecteixen en la creació de nous sistemes amb característiques diverses, com per exemple els sistemes intel·ligents o multifuncionals d'alliberament de fàrmacs, els polímers conjugats amb fàrmacs o els compostos híbrids (components orgànics i inorgànics). Els sistemes intel·ligents d'alliberament de fàrmacs són realment prometedors perquè presenten un augment en la capacitat de dirigir-se al lloc específic d'actuació o diana i a la vegada augmenten l'eficiència i l'eficàcia de les teràpies produint els mínims efectes secundaris [12]. Els polímers conjugats amb fàrmacs presenten el gran avantatge de prolongar la circulació del fàrmac pel torrent sanguini i retardar les velocitats de metabolisme, degradació i excreció del compost conjugat [13]. Els polímers emprats en conjugacions poden ser sensibles a algun tipus d'estímul, així proporcionen unes característiques úniques al fàrmac conjugat. Un sistema multifuncional d'alliberament de fàrmacs té dues o més funcions [14]. Els sistemes intel·ligents i els polímers conjugats podrien ser considerats multifuncionals, ja que a banda d'alliberar el fàrmac, poden desenvolupar una altra funció com respondre a un estímul o hidrolitzar-se a l'interior d'una cèl·lula. Un exemple de compostos híbrids en estudi actualment són els formats per partícules de metalls i polímers hidròfils que s'utilitzen per a fer diagnòstic de malalties amb tècniques d'imatge i també com a marcadors de biomolècules [15, 16].

2.2. Fàrmacs emprats en sistemes d'alliberament

La recerca de nous fàrmacs ha evolucionat extraordinàriament al llarg dels últims anys. Avui en dia s'empen rutinàriament tècniques de cribratge d'alt rendiment, que són mètodes de recerca sistemàtica indiscriminada de molècules per al descobriment de nous fàrmacs. Aquestes aproximacions han portat a un augment sistemàtic de compostos d'elevat pes molecular, lipòfils i hidròfobs i a una disminució en la investigació amb compostos solubles en aigua [17].

Per tal que un fàrmac sigui disponible oralment, el compost s'ha de poder dissoldre i ser absorbit a través de l'intestí per tal d'assolir uns nivells de concentració del fàrmac adients al lloc actiu farmacològicament, i, en conseqüència, que l'acció desitjada s'obtingui

de forma reproducible. Certs estudis han demostrat que més d'un 40 % dels fracassos en el desenvolupament de nous fàrmacs és a causa de les pèssimes propietats biofarmacèutiques que presenten, com ara una baixa solubilitat en aigua o una baixa permeabilitat. La FDA i altres organismes reguladors de fàrmacs han creat un sistema de classificació biofarmacèutica (BCS, de l'anglès *biopharmaceutics classification system*) en el qual els compostos es troben subdividits en 4 classes diferents en funció de la solubilitat i de les característiques de permeabilitat [18, 19].

Els fàrmacs de classe 1 són solubles i permeables amb una biodisponibilitat oral bona i només estan limitats per la seva habilitat d'arribar als llocs específics d'absorció en el tracte GI. Els de classe 2 són poc solubles, però permeables a través de l'intestí, la qual cosa significa que la seva biodisponibilitat oral estarà limitada per la velocitat de dissolució. Els compostos de classe 3 són solubles, però poc permeables, així que la seva biodisponibilitat està limitada per les propietats barrera del tracte GI. Per últim, els de classe 4 són insolubles i poc permeables i per tant, combinen les limitacions dels compostos de classe 2 i 3. Les farmacèutiques han vist un gran potencial en els compostos de classe 2 i estan realitzant estudis per tal de vèncer les dificultats que aquests presenten. Cal recordar, però, que no tots els compostos de classe 2 tenen les mateixes característiques sinó que a vegades una baixa solubilitat en aigua pot ser conseqüència de causes ben diverses. Són precisament aquest factors els que poden marcar la diferència i fer que certes modificacions en la formulació d'un nou fàrmac el facin esdevenir un sistema biodisponible oralment [17]. La solubilitat ve marcada per l'habilitat d'una molècula en distribuir-se entre una fase aquosa i una lipòfila o hidròfoba, expressada com a coeficient de partició o $\log P$. Així doncs, tots aquells mètodes que millorin la capacitat de mullar-se d'un sistema seran de suma importància. D'altra banda, una solubilitat baixa també pot ésser associada amb un punt de fusió elevat, del qual són responsables les forces de la xarxa cristal·lina d'un sòlid. Els compostos de classe 3 també són de gran interès, sobretot les proteïnes i els pèptids.

Les tecnologies de dispersió sòlida o de solucions, de les quals parlarem més endavant, són estratègies realment útils a l'hora de millorar les característiques d'aquestes noves formes farmacèutiques. Algunes de les millores són, per exemple que: (a) el principi actiu s'obté sovint en estat amorf i aleshores la problemàtica amb les forces de la xarxa cristal·lina s'elimina i la solubilitat és augmentada, (b) la mida de partícula del fàrmac és disminuïda a la mida més petita possible i (c) l'elecció d'un polímer transportador adient aporta un augment en la capacitat per mullar-se i contribueix així a la generació d'un procés de dissolució. En l'ús d'aquestes tecnologies també existeixen certs desavantatges, com és

L'estabilitat física del fàrmac en el transportador polimèric escollit. L'estat amorf és un estat d'energia alta comparat amb l'estat cristal·lí i és per això que amb el temps té una tendència a recristal·litzar. L'estabilització és possible, però cada mètode ha de ser específic per a cada tipus de formulació en estudi.

2.3. Polímers emprats en sistemes d'alliberament

Durant els últims 40 anys s'han utilitzat gran varietat de materials com a transportadors de fàrmacs. La gran majoria d'aquests sistemes transportadors són matrius polimèriques d'origen tant sintètic com natural, el més semblants possibles a components del cos humà per tal que siguin biocompatibles i, si és possible, biodegradables.

Així doncs, en moltes de les aplicacions d'alliberament controlat de fàrmacs, el polímer és degradat o desgastat per fluids biològics al llarg del temps i forma productes sense toxicitat els quals s'eliminen un cop finalitzat l'alliberament.

Moltes vegades el sistema d'alliberament controlat es dissenya de tal manera que només s'allibera el compost actiu quan es troba en un medi apropiat. Els sistemes polimèrics són inicialment sòlids, estan completament secs i quan s'introdueixen al cos humà absorbeixen aigua i es mullen [4]. A partir d'aquí, el polímer es comença a inflar cada vegada més i permet així l'alliberament del fàrmac al medi. Aquest alliberament pot tenir diferents comportaments, des de cinètiques d'ordre zero fins a seguir models pulsatius i sigmoïdals.

Aquesta capacitat que té el polímer de mullar-se és de gran interès, ja que es pot desencadenar també mitjançant algun canvi en el seu medi exterior. Depenent del polímer, es canvia el pH, la temperatura o la força iònica i el fàrmac s'allibera o no. Aquests materials són ideals per preparar formes farmacèutiques d'administració oral, en les quals l'alliberament no es produeix a pH baixos en l'estómac i sí al pH de l'intestí prim (~ 6,8). En general, els preparats farmacèutics es poden classificar en dos tipus de sistemes polimèrics i en la Figura 2.3 es mostren exemples d'aquests:

a) Sistemes de reserva (recoberts). El fàrmac es troba al centre del sistema i està recobert pel polímer. Normalment presenten una geometria esfèrica.

b) Sistemes matricials hidròfils, hidròfobs o inerts. El principi actiu es troba dissolt (formant agregats) o molecularment dispers en una matriu polimèrica que controla la velocitat de l'alliberament. Aquests acostumen a tenir una geometria irregular.

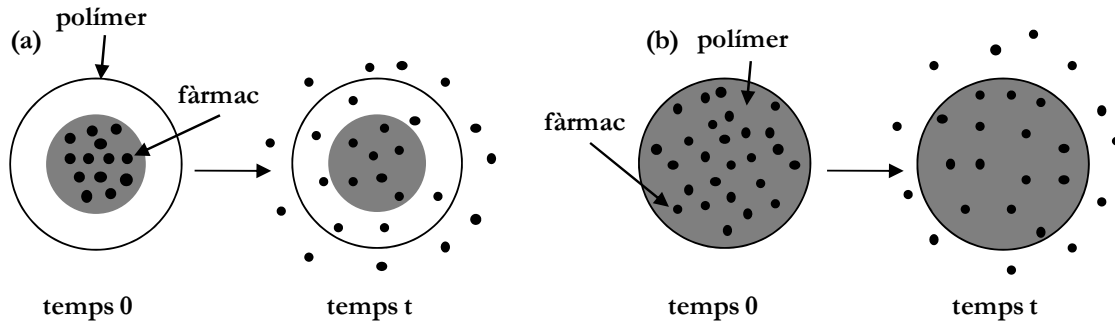


Figura 2.3. Alliberament controlat del fàrmac en (a) un sistema de reserva i (b) en un sistema matricial.

Actualment s'utilitzen una gran varietat de polímers amb aplicacions biomèdiques ben diverses. Al començament es van usar molècules orgàniques petites com la urea, l'àcid cítric o el manitol, però avui en dia les investigacions van més enfocades a l'ús de transportadors polimèrics solubles en aigua com per exemple, la polivinilpirrolidona (PVP) o el seu copolímer polivinilpirrolidona-*co*-vinilacetat (PVP-VA) [20, 21]. També s'estudien polímers derivats de la cel·lulosa [22], l'etilè vinil acetat (EVA) [23, 24] o polímers dependents del pH, com els copolímers de l'àcid acrílic i metacrílic coneguts amb el nom d'Eudragit® [25]. Aquests són un clar exemple de polímers sensibles al pH del medi, ja que contenen àcids carboxílics responsables de les respostes a diferents valors de pH.

Els polímers biodegradables més usats acostumen a ser polièsters alifàtics sintètics com l'àcid poli(L-làctic), l'àcid poliglicòlic i la policaprolactona, així com copolímers d'aquests. S'utilitzen també copolímers de compostos degradables i no degradables com són el poli(metacrilat de metil), el polietilè, l'alcohol polivinílic i el policarbonat. Tots han estat aprovats per la FDA per a aplicacions *in vivo*.

A continuació es descriuen cada un dels polímers seleccionats per a aquesta tesi doctoral, així com també algunes de les seves propietats fisicoquímiques.

El poli(metacrilat de metil) o PMMA (Figura 2.4) és un polímer vinílic que es forma per polimerització vinílica de radicals lliures a partir del monòmer metacrilat de metil. En medicina s'utilitza per a la fabricació de pròtesis òssies i dentals i com a additiu en pols en la formulació de molts fàrmacs de via oral. En aquest cas actua com a retardant a l'acció del medicament per tal que aquesta sigui progressiva. El PMMA és higroscòpic, però no es dissol en aigua. A més a més, presenta un ampli interval de temperatures de transició vítria (T_g) des de 85 fins a 165 °C. Les diferents T_g del PMMA li proporcionen diferents propietats elàstiques i de capacitat de deformació plàstica.

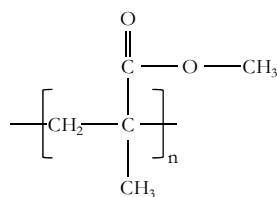


Figura 2.4. Estructura química del PMMA.

L'àcid poli(L-làctic) o L-PLA (Figura 2.5) és un polièster alifàtic i biodegradable que s'obté de la polimerització de molècules d'àcid L-làctic. S'utilitza actualment en un gran nombre d'aplicacions biomèdiques, com per exemple en sutures i en sistemes d'alliberament de fàrmacs. També s'està investigant el seu ús com a material en enginyeria de teixits. Normalment té un percentatge de cristalls del 37 %, una T_g de 60 a 65 °C i una temperatura de fusió (T_m) de 173 a 178 °C [26].

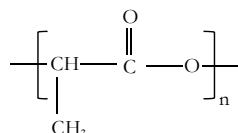


Figura 2.5. Estructura química del PLA.

L'àcid poli(làctic-co-glicòlic) o PLGA (Figura 2.6) és un copolímer de l'àcid làctic i l'àcid glicòlic i és un polièster alifàtic de cadena lineal [27]. S'usa molt sovint en sistemes d'alliberament de fàrmacs, ja que és biodegradable i biocompatible. El PLGA és més amorf que cristal·lí i té una T_g de 40 a 60 °C. A diferència dels homopolímers d'àcid làctic i glicòlic, pot ser dissolt en diversos solvents comuns com el tetrahidrofurà, l'acetona o l'acetat d'etil.

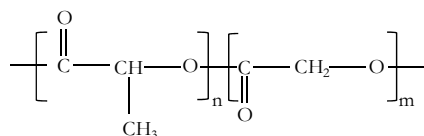


Figura 2.6. Estructura química del PLGA.

L'etilcel·lulosa (EC) 20 cP (de baixa viscositat, de 20 centipoise), un etil èter de la cel·lulosa, és un polímer de cadena llarga derivat de la β -anhidroglucosa [25]. El polímer es prepara tractant cel·lulosa purificada amb una solució alcalina, seguit per un procés d'etilació amb cloroetà. L'EC (Figura 2.7) és pràcticament insoluble en aigua, però és soluble en bastants dissolvents orgànics depenent del grau de grups etoxi substituïts. És un polímer semicristal·lí amb una T_g aproximadament de 130 °C i una T_m de 180 °C. S'utilitza principalment com a capa fina de recobriment.

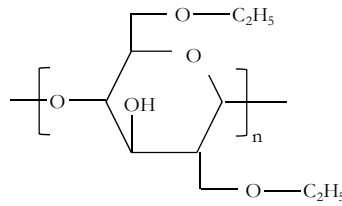


Figura 2.7. Estructura química de l'EC 20 cP.

La PVP-VA 64 (Figura 2.8) és un polímer format per 6 parts de vinil pirrolidona i 4 parts de vinil acetat. La PVP-VA 64 és soluble en aigua i en bastants dissolvents orgànics, tals com l'etanol, l'isopropanol, el butanol i el clorur de metilè [20]. És un polímer amorf amb una T_g al voltant dels 130 °C i una temperatura de descomposició de 225 °C. S'utilitza com a lligant o excipient en moltes preparacions farmacèutiques, ja que és completament inert en humans. Com no és absorbit, simplement passa a través del tracte digestiu quan és ingerit oralment.

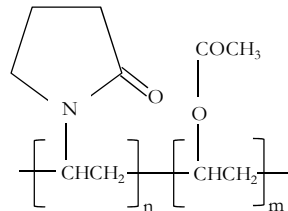


Figura 2.8. Estructura química de la PVP-VA 64.

L'Eudragit® E100 (Figura 2.9) és un polimetacrilat copolímer del 2-dimetil aminoetil metacrilat, el metil metacrilat i el n-butil metacrilat. L'Eudragit® E100 és soluble en solucions àcides fins a pH 5,0 [25] i s'infla en solucions per sobre d'aquest pH. El polímer és soluble en dissolvents orgànics com l'isopropanol, l'acetona, el metanol i l'etanol. Es comença a degradar per sobre dels 200 °C. És un polímer amorf i biocompatible amb una T_g de 52 °C aproximadament.

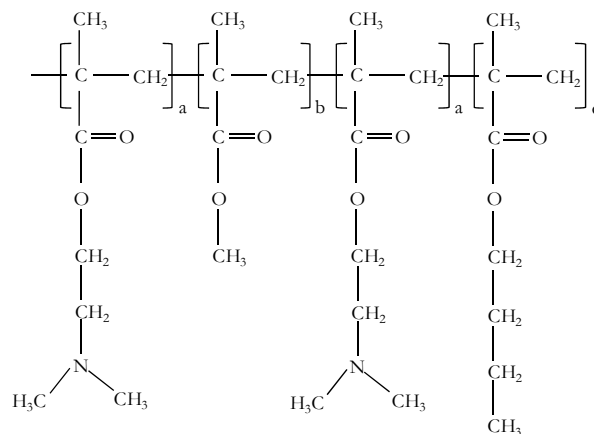


Figura 2.9. Estructura química de l'Eudragit® E100.

L'EVA (Figura 2.10) és un copolímer d'etilè i vinil acetat. S'empra principalment en el camp dels materials per les seves propietats com a elastòmer amb una alta flexibilitat, i també perquè pot ser processat de la mateixa manera que molts termoplàstics. El material és clar i brillant, té propietats tipus barrera, baixa temperatura de tenacitat, resistència a l'estrès i propietats adhesives a la vegada que és impermeable a l'aigua (depenent de la quantitat d'acetat ho serà més o menys).

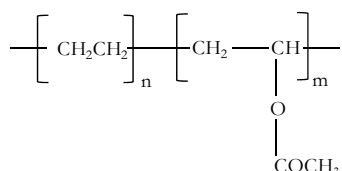


Figura 2.10. Estructura química de l'EVA.

Lumulse[®] GMS (Figura 2.11) és un monoestearat de glicerol amb una cadena alquímica de 18 carbonis. S'utilitza en productes farmacèutics dèrmics i en cosmètica com a agent tensioactiu lipòfil, agent humectant i emulsionant [28].

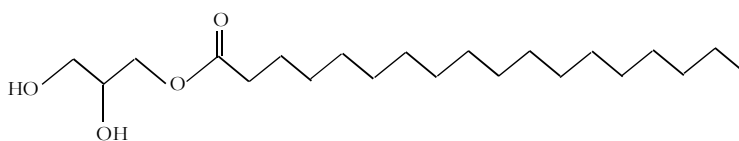


Figura 2.11. Estructura química del GMS (monoestearat de glicerol).

Cutina[®] HR (oli de ricí hidrogenat o HCO, de l'anglès *hydrogenated castor oil*) és un triglicèrid esterificat amb tres àcids grassos de 18 carbonis altament hidròfil i de tipus cerós (Figura 2.12). Aproximadament el 90 % dels àcids grassos són d'àcid ricinoleic i altres components significants són l'àcid oleic i el linoleic. Normalment s'usa com a transportador de fàrmacs en aplicacions tòpiques [29, 30].

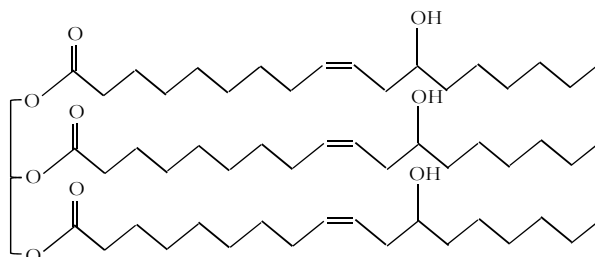


Figura 2.12. Estructura química del compost majoritari de l'oli de ricí.

En l'elecció de la quantitat de polímer i fàrmac que es vol utilitzar cal evitar relacions fàrmac/polímer massa baixes o massa altes per tal de prevenir ruptures accidentals de l'estructura polimèrica (i subsegüent alliberament incontrolat). En alguns estudis, s'usen agents plastificants. Si aquests s'afegeixen en grans quantitats a vegades es produeixen formes farmacèutiques molt adhesives o enganxoses, mentre que en baixes quantitats s'obtenen formes fràgils o trencadisses. Una possibilitat per solucionar aquestes restriccions és l'ús de mescles de dos tipus de polímers que no siguin tòxics i exhibeixin diferents propietats fisicoquímiques.

2.4. Introducció als fluids supercrítics

A conseqüència de la problemàtica amb la utilització de solvents orgànics convencionals en l'àmbit farmacèutic, han sorgit noves tecnologies en el procés de fabricació de medicaments en les quals s'utilitzen fluids supercrítics (FSC) com a alternativa [31]. Un fluid esdevé supercrític quan es troba en condicions de pressió (P) i temperatura (T) superiors al valor del seu punt crític. En la Figura 2.13 podem observar el diagrama de fases d'una substància pura on es projecten els eixos de P i T . Aquest gràfic ens mostra els límits entre els diferents estats d'un compost (sòlid, líquid i gas), en el qual podem observar que les tres fases coexisteixen al punt triple. Si seguim la corba de coexistència gas-líquid cap amunt, la pressió i la temperatura augmenten. D'una banda, el líquid esdevé menys dens quan la temperatura augmenta i de l'altra, el gas esdevé més dens quan la pressió augmenta. Les coordenades del punt crític presenten valors discrets i són característiques per a cada substància en particular. En la Taula 2.2 es mostren, a tall d'exemple, els valors de diversos FSC. Alguns d'aquestes fluids s'utilitzen més que altres per la facilitat d'assolir els seus valors crítics. A l'hora d'escollir-los per a dur a terme qualsevol procés experimental també es té en compte el nivell de perillositat, ja que alguns d'ells poden ser inflamables o tòxics.

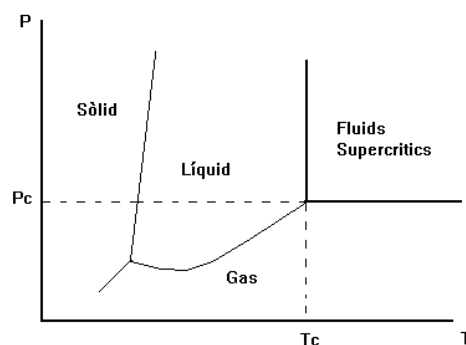


Figura 2.13. Diagrama de fases d'una substància pura qualsevol.

Taula 2.2. Punts crítics d'alguns fluids seleccionats.

Substància	Temperatura crítica (°C)	Pressió crítica (bar)
Nitrogen	-146,9	33,9
Xenó	16,7	58,4
Diòxid de carboni	31,0	73,8
Età	32,4	48,8
Propà	96,8	42,5
Amoníac	132,5	113,5
Acetona	235,1	47,0
Metanol	240,9	79,9
Etanol	243,9	63,8
Aigua	374,3	221,2

A mesura que ens acostem al punt crític d'una substància el seu volum molar o densitat canvia dramàticament. Per tant, un FSC presenta algunes propietats físiques pròpies d'un líquid i d'un gas, és un bon solvent i bon difusor a causa de la proximitat als dos estats. És per això que sovint trobem descrits els FSC com a gasos densos o pressuritzats. Els paràmetres fisicoquímics que demostren aquestes propietats específiques d'un FSC es mostren en la Taula 2.3.

Taula 2.3. Comparació dels paràmetres fisicoquímics característics per un líquid, un fluid supercrític i un gas.

	Líquid	FSC	Gas
Densitat (kg/m ³)	1000	100 – 800	1
Viscositat (Pa·s)	10 ⁻³	10 ⁻⁵ – 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
Coefficient de difusió (m ² /s)	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁵

La densitat d'un gas pressuritzat augmenta amb la pressió a temperatura constant (vegeu Figura 2.14). D'altra banda, la densitat disminueix quan s'augmenta la temperatura a una pressió constant. A més a més, la capacitat de difusió d'un gas pressuritzat augmenta quan incrementem la temperatura i/o disminuïm la pressió. Així doncs, la viscositat d'un gas pressuritzat tindrà un comportament semblant al de la seva densitat.

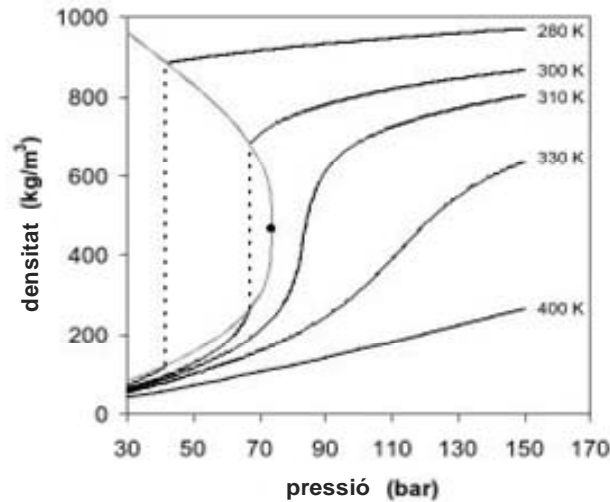


Figura 2.14. Densitat del diòxid de carboni en funció de la pressió i la temperatura [32].

2.5. L'ús de diòxid de carboni pressuritzat o supercrític en aplicacions farmacèutiques

El diòxid de carboni supercrític (scCO_2) és un dels FSC més utilitzats en aplicacions farmacèutiques, ja que és un solvent de baix cost, és inert i no és tòxic ni inflamable. A més a més, presenta unes propietats que faciliten el processament de materials. Entre les moltes característiques del CO_2 com a FSC, destaquem:

- Baixa temperatura crítica (31 °C), que permet el processament de molts compostos termolàbils.
- Productes finals lliures de solvents orgànics, ja que el scCO_2 retorna a l'estat gasós quan s'allibera la P en un sistema qualsevol.
- Facilitat de canviar el seu poder solvent amb petits canvis de pressió i/o temperatura.
- Capacitat de difusió elevada que augmenta la transferència de massa i ajuda a reduir el temps de processament o el nombre d'etapes d'un procés.
- Tensió superficial baixa, característica absent en els solvents tradicionals.

A banda d'aquestes característiques, el CO_2 és considerat un compost segur per la FDA. Un altre dels atractius que presenta el CO_2 és que s'obté de fonts de recursos naturals

o com a subproducte en processos industrials [33]. Per tant, l'ús del scCO₂ no contribueix a l'efecte hivernacle global.

Els principals desavantatges del scCO₂ són: (a) la necessitat d'una pressió relativament alta (73.8 bar), (b) el reciclatge del CO₂ és car i requereix uns equips complexos i (c) l'aplicació a la indústria farmacèutica és relativament nova i aleshores el cost dels equips i la inversió corresponent són encara bastant elevats.

El CO₂ és una molècula de polaritat baixa a conseqüència del seu moment quadrupolar. En general, doncs, les molècules petites i relativament apolars són bastant solubles en el CO₂. A mesura que augmenta la complexitat o la polaritat de les molècules, la solubilitat disminueix i en el cas de moltes biomolècules esdevé negligible fins i tot a pressions elevades. Aquestes dificultats es poden solucionar amb la introducció de petites quantitats de solvents polars en el CO₂, formant-se una estructura híbrida. En aquest sentit, la solubilitat del solut augmenta mitjançant forces intermoleculars de tipus pont d'hidrogen. Per tant, la solubilitat d'un compost en scCO₂ vindrà determinada principalment pel mètode utilitzat en el procés de fabricació. D'altra banda, en el cas de molècules que presentin una solubilitat molt baixa en scCO₂, aquest podrà actuar també com a antisolvent. En la següent Taula 2.4 es mostren els valors de solubilitat en scCO₂ dels fàrmacs estudiats en aquesta tesi doctoral i en condicions experimentals similars als estudis realitzats.

Taula 2.4. Valors de solubilitat en scCO₂ dels diferents fàrmacs estudiats.

Compost	Temperatura (°C)	Pressió (bar)	Solubilitat en fracció molar	Referència
5-Azacitidina	40	110	no determinada	–
5-Fluorouracil	35	145	$9,5 \times 10^{-7}$	[34]
Cafeïna	40	138	$1,4 \times 10^{-4}$	[35]
Glutatió	72	130	no determinada	–
Ketoprofèn	58	130	$1,6 \times 10^{-5}$	[36]
Naproxèn	40	90	$2,0 \times 10^{-6}$	[37]
Triflusal	40	190	$3,0 \times 10^{-2}$	[38]

En el projecte europeu (*Sustainable surface technology for multifunctional materials, Surface-T*, NMP2-CT-2005-013524) es volia utilitzar el CO₂ en aplicacions diverses, entre elles la farmacèutica. Així doncs, es va intentar millorar les característiques dels productes actuals. I també es va intentar dissenyar nous materials amb funcions específiques i d'alt rendiment.

La utilització industrial dels FSC ha augmentat molt i actualment es fan servir en una llarga llista de processos com són: l'enginyeria de partícules i cristalls [39], la formació de complexos amb ciclodextrines, els recobriments, l'enginyeria de teixits i escumes, les reaccions enzimàtiques en medi supercrític, l'extrusió, la producció de liposomes i compostos biotecnològics [40], la purificació d'excipients farmacèutics [41], l'esterilització, l'eliminació de solvents [42], les separacions enantioselectives [43] i, com no, la purificació i extracció de principis actius de matèries primeres, productes naturals o de medis de reacció sintètics.

Pel que fa referència a l'enginyeria de partícules [44, 45], es poden diferenciar tres àrees de recerca: (a) la preparació de sòlids de substàncies actives per millorar o modificar la seva acció terapèutica o augmentar-ne la solubilitat, (b) la producció de polímers com a matrius per a la impregnació de fàrmacs i (c) la preparació de sistemes polimèrics transportadors com a sistemes d'alliberament controlat biocompatibles o d'alliberament sostingut.

En general, l'extracció de compostos bioactius de mescles (purificació de reaccions, quantificació d'un enantiòmer actiu, extraccions de matrius naturals, etc.) o de matrius és l'ús més important dels FSC. En aquest cas, els processos de cristal·lització i formació de partícules han experimentat un enorme desenvolupament en els últims anys. Així doncs, s'extreuen o fraccionen productes naturals, com per exemple solvents residuals o altres impureses, com pesticides, els quals són extrets de compostos actius a gran escala [46]. Una altra aplicació interessant és el fraccionament de proteïnes i pèptids utilitzant diòxid de carboni en fase vapor [47]. També la cromatografia de fluids supercrítics preparativa ha estat utilitzada en un gran nombre d'aplicacions [48], com per exemple el fraccionament d'àcids grassos poliinsaturats.

Actualment trobem descrites en la literatura diferents metodologies que utilitzen FSC per al processament de compostos farmacèutics i que s'especifiquen a continuació [49]. La majoria han estat utilitzades durant la tesi doctoral.

2.5.1. Tècnica d'expansió ràpida de solucions supercrítiques (RESS)

Durant el procés d'expansió ràpida de solucions supercrítiques (RESS, de l'anglès *rapid expansion of supercritical solutions*) s'utilitza el FSC com a solvent. Així doncs, es fa precipitar un solut dissolt en scCO_2 mitjançant l'expansió ràpida de la solució supercrítica quan és polvoritzada en un reactor a baixa pressió, en el qual el solvent esdevé un gas. En algunes aplicacions, la tovera d'entrada del CO_2 s'escalfa per evitar-ne l'obstrucció a causa de la possible congelació del CO_2 com a conseqüència de la sobtada reducció de la P. La solubilitat del solut en el scCO_2 ha de ser bastant alta, i per tant, aquesta aplicació queda limitada a compostos de baixa polaritat. Aquesta solubilitat del solut depèn principalment de la densitat experimental del FSC i de l'estructura molecular del fàrmac. Un dels avantatges que presenta és l'obtenció de partícules molt fines de mida controlable sense utilitzar solvents orgànics. La mida i distribució de les partícules es modula mitjançant la concentració del solut en el FSC i les condicions d'expansió (T , P , geometria i mida de la tovera). Com més alta és la concentració, més petita és la mida de les partícules. El principal desavantatge és la necessitat d'una proporció elevada de gas/compost com a conseqüència de la baixa solubilitat del compost i la necessitat d'un equipament de pressurització de gran volum. Tot i això, és un dels processos de formació de partícules menys costosos quan funciona correctament.

2.5.2. Tècnica d'antisolvent supercrític (SAS)

En aquest procés, el FSC actua com a antisolvent. Es pot aplicar a molècules que són poc solubles en scCO_2 però solubles en un ampli interval de solvents orgànics. El sòlid es dissol en un solvent orgànic i a continuació s'afegeix el scCO_2 com a antisolvent. Així es crea un gran volum d'expansió i reducció de la densitat del solvent i per tant, una sobresaturació que porta a la precipitació o recristal·lització del compost. Quan la injecció de la solució líquida ha finalitzat, es duu a terme un procés de rentat (mantenint el flux de CO_2) per tal d'eliminar el solvent orgànic i prevenir d'aquesta manera la seva condensació durant el procés de descompressió. L'avantatge d'aquesta tècnica és l'obtenció de partícules molt fines de mida controlable. La mida i morfologia de les partícules es pot modificar mitjançant la geometria de la tovera, el cabal de la solució líquida, la P del CO_2 i el tipus de solvent emprat. En canvi, el desavantatge és l'ús de solvents orgànics. Però per altra banda, és adequada per processar sòlids especialment sensibles com són els pèptids i les proteïnes [50].

Segons la morfologia que es desitja obtenir, es poden trobar diverses modificacions derivades de la tècnica SAS: antisolvent gas (GAS, *gas antisolvent*), dispersió millorada de la solució mitjançant fluids supercrítics (SEDS, *solution enhanced dispersion by supercritical fluids*) i sistema d'extracció del solvent en aerosols (ASES, *aerosol solvent extraction system*).

2.5.3. Tècnica de generació de partícules a partir de solucions de gas saturades (PGSS[®])

El procés de generació de partícules a partir de solucions de gas saturades (PGSS[®], de l'anglès *particles from gas-saturated solutions*) fa servir el scCO₂ com a solut. Aquesta tècnica consisteix en la dissolució de scCO₂ en el si d'un compost fos (o substrat líquid) i a continuació l'expansió ràpida a través d'una agulla o capil·lar, que porta a l'evaporació completa del gas i la solidificació del líquid en partícules fines. Els avantatges en aquest cas són la formació de partícules fines amb una distribució estreta de mida de partícula i l'extremadament baix consum de gas. Cal destacar que ens permet treballar a baixes pressions i que no és necessari l'ús de cosolvents orgànics.

2.5.4. Tècnica d'impregnació discontinua

El procés d'impregnació es basa en una alta difusió i un poder de solvatació controlat del CO₂. Les matrius polimèriques no poroses acostumen a inflar-se quan s'exposen a fluids supercrítics i d'aquesta manera la penetració del solut a través del sòlid és augmentada. En la Figura 2.15 es mostra un esquema de les diferents etapes que tenen lloc en un procés d'impregnació. Realment existeixen un gran nombre de processos per tal de dispersar un fàrmac en un transportador polimèric utilitzant FSC. Alguns d'aquests processos es diferencien en petites variacions. Els avantatges d'aquest procés inclouen una distribució uniforme del solut en el sòlid (gràcies a l'alta difusió del CO₂), una reducció d'etapes del procés i la facilitat d'eliminar el solvent. Aquesta àrea d'investigació és relativament nova i encara s'estan desenvolupant nous mètodes per dispersar fàrmacs, sobretot en grups de recerca farmacèutica. Per aquest motiu, en aquesta tesi doctoral es va decidir explorar i investigar més extensament l'ús de processos d'impregnació de fàrmacs.

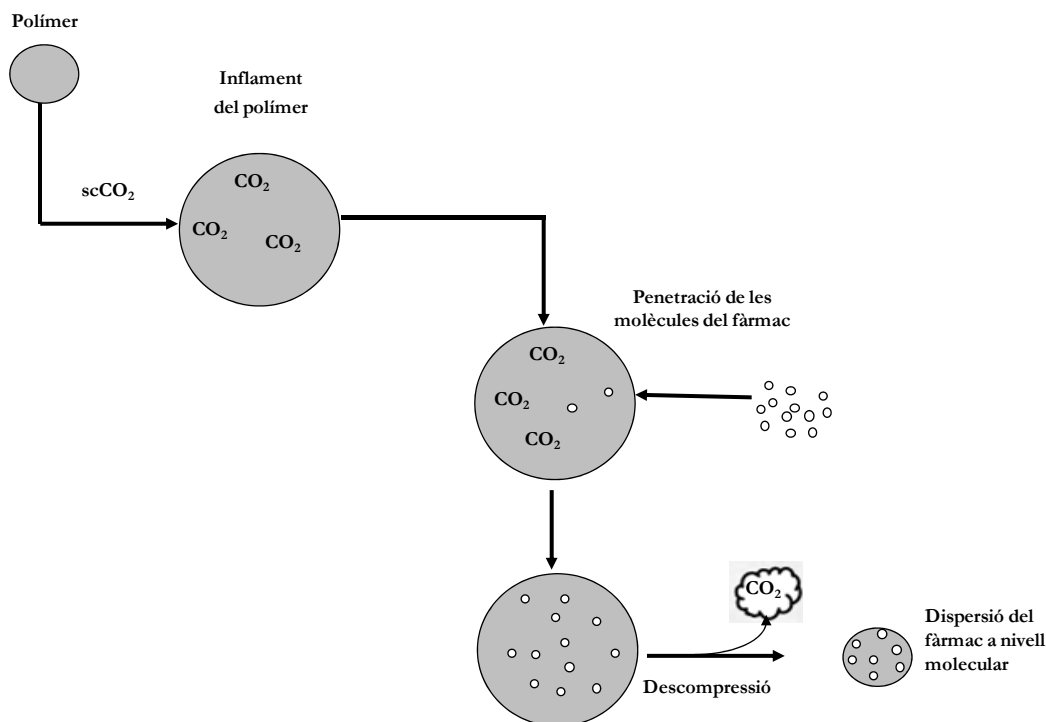


Figura 2.15. Esquema d'un procés d'impregnació per inflament.

2.5.5. Revisió d'aplicacions farmacèutiques recents

Tal i com s'ha comentat prèviament, en els últims anys es poden trobar en la bibliografia un gran nombre d'articles de revisió sobre aquests processos que utilitzen FSC [39, 42, 51] i també sobre nous desenvolupaments originals de medicaments [52-60].

La cristallització és una de les tècniques de purificació més usades després d'un procés de síntesi química. Aquesta purificació i cristallització fraccionada es pot aconseguir també mitjançant la utilització del mètode GAS, on s'afavoreix gràcies al canvi bruscat del poder de solvatació que es produeix quan el solvent s'expandeix. A diferència dels processos convencionals de cristallització, la sobresaturació mitjançant aquest procés de cristallització depèn de la pressió. És per això que diferents soluts amb diferent solubilitat precipitaran en diferents etapes de l'expansió. Així doncs, aquesta tecnologia permet l'aïllament de certes impureses de principis actius farmacèutics, com poden ser intermedis de reacció, enantiòmers i additius. Generalment, l'èxit de la precipitació amb GAS depèn de la solubilitat del solvent líquid en el fluid supercrític antisolvent i està basat en el fet que el solut no és soluble en l'antisolvent [51].

Troblem en la bibliografia diversos articles per a l'elaboració i caracterització de sistemes d'alliberament. Per exemple, *Wu et al.* [59] van estudiar la formació de la dispersió sòlida d'un fàrmac poc soluble en aigua com és el piroxicam (un antiinflamatori no

esteroïdal o AINE) en PVP, comparant un procés GAS amb un de clàssic d'atomització en sec. Les propietats fisicoquímiques dels productes, així com les interaccions entre el fàrmac i el polímer van ser caracteritzades a través de la difracció de Raigs X, l'espectroscòpia infraroja amb transformada de Fourier (FTIR), la calorimetria diferencial de rastreig (DSC, de l'anglès *differential scanning calorimetry*) i l'HPLC-UV. Tots els experiments van millorar el poder de dissolució del piroxicam, però el mètode amb FSC va aconseguir que el piroxicam es dissolgués completament. La solució de piroxicam es va introduir a la cambra de precipitació mitjançant un capil·lar intern al mateix temps que el flux estàtic de CO₂ s'introduïa a través d'un injector exterior. Finalitzada la injecció, el CO₂ pressuritzat va fluir a l'interior de la cambra per tal d'extreure el solvent orgànic del producte final. La transformació física que va produir aquesta tècnica al component inicial no va interferir en les interaccions entre fàrmac i polímer. La utilització d'aquest mètode permet controlar la dissolució *in vitro* sense modificar-ne la seva estabilitat.

Salmaso et al. [52] van preparar dispersions homogènies d'insulina i l'hormona recombinant de creixement humà en una mescla de triestearina/lecitina/polietilenglicol mitjançant la microatomització de scCO₂ per tal de produir partícules recobertes amb proteïnes. En aquest estudi, van utilitzar un equip de fabricació pròpia [53], amb el qual van pressuritzar i escalfar el CO₂ a 150 bar i 40 °C. Per a la caracterització de les dispersions obtingudes van utilitzar diferents tècniques analítiques: DSC, microscòpia de transmissió electrònica i l'espectrofotometria UV-vis. La quantitat de proteïna i hormona en les partícules sòlides es va determinar a través de l'extracció amb DMSO i l'anàlisi amb HPLC. Mitjançant aquesta metodologia la insulina podria ser administrada oralment produint un efecte hipoglucèmic significant i comparable al produït amb la injecció clàssica, i amb una biodisponibilitat farmacològica del 7 %. L'interès per trobar vies alternatives en l'administració d'insulina és evident i altres autors com *Kim et al.* [60] també van investigar l'efecte d'estabilitzants en les característiques fisicoquímiques de les partícules d'insulina en aerosols per inhalació produïts amb tecnologies de FSC. Les hormones de creixement elaborades amb FSC [52] i administrades oralment produïen una biodisponibilitat farmacològica petita, concretament del 3,4 %.

Chu et al. [54] van preparar partícules fines de cefpodoxima proxetil emprant el sistema ASES amb scCO₂. Aquest fàrmac és una cefalosporina oral de tercera generació, activa a la majoria d'organismes Gram positius i negatius. En aquest estudi, el grau d'aglomeració es va reduir utilitzant una relació alta entre el CO₂ i la solució del fàrmac i una concentració baixa de la solució. Es van obtenir partícules esfèriques quan la

concentració del fàrmac era d'un 10 % en pes. En realitzar el test de dissolució, quasi el 90 % del fàrmac processat es va alliberar en 10 minuts. En canvi, el percentatge de recuperació de les partícules sòlides va ser aproximadament un 80 %.

La complexació amb ciclodextrines és una de les aproximacions més prometedores per millorar la solubilitat i la velocitat de dissolució dels fàrmacs. Les ciclodextrines són oligòmers cíclics de glucosa amb estructures de tipus conca amb la superfície exterior de les quals té propietats hidròfiles, mentre que l'interior és de naturalesa hidròfoba. Aquestes característiques permeten formar complexos d'inclusió no covalents amb diversos fàrmacs de mida i polaritats apropiades, i això permet canvis en les seves propietats fisicoquímiques i biofarmacèutiques. La millora es produeix en la seva solubilitat, velocitat de dissolució, estabilitat química i biodisponibilitat, que redueix els efectes secundaris i de toxicitat. L'ús de scCO₂ s'ha proposat recentment per a la preparació de diversos complexos d'inclusió de ciclodextrines amb fàrmacs, precisament per les millores mencionades anteriorment. El mètode d'inclusió de ciclodextrines amb scCO₂ s'ha estudiat amb diferents compostos antifúngics com l'itraconazole [61], l'ecconazole i el fluconazole [62]. En tots els treballs científics es van obtenir uns rendiments d'inclusió alts en comparació amb mètodes de coprecipitació o mescla sòlida. Els estudis farmacocinètics *in vivo* van demostrar que el sistema fàrmac/ β -ciclodextrina preparat emparant scCO₂ presentava una biodisponibilitat més alta (en sang, fetge i ronyons de rates) que els compostos preparats amb procediments convencionals. En aquest mètode, el reactor s'omplia amb una mescla sòlida de fàrmac i β -ciclodextrina i es pressuritzava i escalfava a la pressió i temperatura desitjades. Després de deixar el sistema en un mode estàtic durant 3 h a 450 bar i a temperatures de 50 a 130 °C, el CO₂ amb el solvent residual es treia de la cambra. La solubilitat del fluconazole en scCO₂ era significativament més gran que la de l'itraconazole i l'ecconazole. Aquesta elevada solubilitat i la possibilitat de fusió del fluconazole en les condicions del scCO₂ van portar a una interacció més alta entre el fluconazole i la ciclodextrina que en el cas dels altres dos compostos. Aquesta interacció es va verificar amb la DSC, l'FTIR i l'anàlisi per difracció de raigs X. Els estudis farmacocinètics *in vivo* van mostrar que el fàrmac complexat amb scCO₂ era més biodisponible que els compostos obtinguts amb mescla física o mètodes de coprecipitació. A més a més, els complexos antifúngic/ β -ciclodextrina van mostrar un alliberament dels antifúngics als teixits del fetge i els ronyons per almenys 6 hores després de la seva ingestió. Així doncs, la dosi podria ser disminuïda.

Però no només s'han investigat les ciclodextrines per a formar complexos més solubles. Actualment s'està observant un creixent interès per un grup de sistemes d'alliberament de base lipídica, anomenats *pharmacosome*. La seva utilització ha estat revisada per *Semalty et al* [63]. Els *pharmacosome* proporcionen una millora en les propietats biofarmacèutiques del fàrmac, com ara la seva biodisponibilitat. *Li et al.* [64] comparen les característiques fisicoquímiques de complexos fosfolípids de puerarina (un isoflavonoide emprat pel tractament de la febre, el dolor, la diabetis, la diarrea i algunes malalties cardiovasculars) preparats mitjançant mètodes tradicionals amb els de tecnologia supercrítica. Aquests complexos es van preparar de la següent manera: el reactor es va omplir amb solucions de puerarina i fosfolípids i el CO₂ es va afegir a 100 bar i 38 °C durant 3 h. Un cabal de CO₂ pur de 25 ml/min es va mantenir a posteriori per tal d'eliminar per complet el solvent residual. Les interaccions entre el fàrmac i el fosfolípid es van caracteritzar amb FTIR. La microscòpia electrònica de rastreig (SEM, de l'anglès *scanning electron microscopy*) es va usar per determinar qualsevol canvi en la morfologia. L'alliberament es va realitzar mitjançant tests de dissolució amb detecció UV. Els complexos preparats amb aquest protocol van exhibir una dissolució més ràpida i van mostrar més avantatges quant a la mida de partícula i morfologia.

Actualment es troben molts sistemes d'alliberament controlat aprovats per la FDA o el seu homòleg espanyol, l'*Agencia española de medicamentos y productos sanitarios*, i que per tant, es troben comercialitzats per a l'ús en humans. A continuació es mostra una taula resum (Taula 2.4) on s'indiquen els diferents fàrmacs estudiats en aquesta memòria i l'any d'aprovació per a la seva comercialització. El glutatió no apareix a la taula ja que no es troba comercialment com a principi actiu de cap medicament, sinó que es troba únicament en coformulació. En la taula es mostra informació referent als medicaments que contenen els fàrmacs com a principis actius i en cap cas es mostren coformulacions d'aquests.

Taula 2.4. Estat actual de comercialització i formes farmacèutiques dels fàrmacs estudiats.

Fàrmac	Nom comercial	Companyia	Any aprovació	Forma farmacèutica
5-Azacitidina	Vidaza	Celgene	2004	Suspensió injectable
5-Fluorouracil	Fluorouracil	Valeant Pharm Intl	1962	Crema, suspensió injectable, solució, via tòpica
5-Fluorouracil	Carac	Sanofi Aventis	2000	Crema, via tòpica
5-Fluorouracil	Efudex	Valeant Pharm Intl	1970	Crema, solució, via tòpica
5-Fluorouracil	Fluoroplex	Allergan Herbert	1971	Crema, solució, via tòpica
Cafeïna	Caffeine citrate	Paddock Labs	2006	Solució oral i intravenosa
Cafeïna	Cafcit	Mead Johnson	1999	Solució oral i intravenosa
Ketoprofèn	Ketoprofen	Elan Pharm	1997	Càpsula, alliberament extens, via oral
Naproxèn	Naproxen	Sandoz	1998	Pastilla, alliberament retardat, via oral
Naproxèn	EC-Naprosyn	Roche Palo	1994	Pastilla, alliberament retardat, via oral
Triflusal	Disgren	Palau Pharma	1981	Càpsula i solució oral

2.6. Caracterització de sistemes d'alliberament de fàrmacs

Els estudis *in vitro* inclouen procediments de control de qualitat com ara assajos d'uniformitat dels continguts i de les característiques de la solubilització i alliberament dels principis actius que es troben a l'interior d'un polímer o matriu lipídica. Si el sistema en estudi conté polímers biodegradables, aquests també s'acabaran dissolent en el medi.

2.6.1. Test de dissolució per a compostos sòlids

Aquest test pretén determinar el compliment dels requisits de dissolució necessaris per a formes farmacèutiques sòlides. Per tal de realitzar un test de dissolució és necessari triar el tipus d'aparell que es farà servir, el medi de dissolució i les condicions experimentals (velocitat d'agitació, temperatura, intervals de temps de presa de mostra, etc.).

Es troben descrits en la farmacopea espanyola [65] tres tipus d'aparells que es diferencien entre ells pel tipus d'element que produeix l'agitació de la solució

d'alliberament. El primer (aparell 1) conté una cistella cilíndrica on s'introdueix el compost sòlid per tal que es vagi alliberant al medi de dissolució (Figura 2.16 a). S'agita mitjançant un motor i un arbre de transmissió. Els components de la cistella i l'arbre de transmissió han de ser d'acer inoxidable o equivalent. El vas d'alliberament s'ha de cobrir per evitar evaporacions i ha de ser de vidre o d'algun material transparent inert. La mostra es col·loca a l'interior de la cistella completament seca al començament de cada test. A part d'aquestes diferents especificacions també es dona una llista amb les diferents mides i distàncies que han de complir els diferents components de l'aparell.

El segon (aparell 2) conté una pala amb dos aspes i un eix que agita el medi de dissolució on prèviament s'havia introduït el sòlid (Figura 2.16 b). El muntatge és el mateix que l'aparell 1. En aquest cas les aspes de la pala i l'eix també han de ser rígides i estar recobertes adequadament per un material metàl·lic o inert. La mostra es col·loca al fons del vas d'alliberament abans de començar l'agitació.

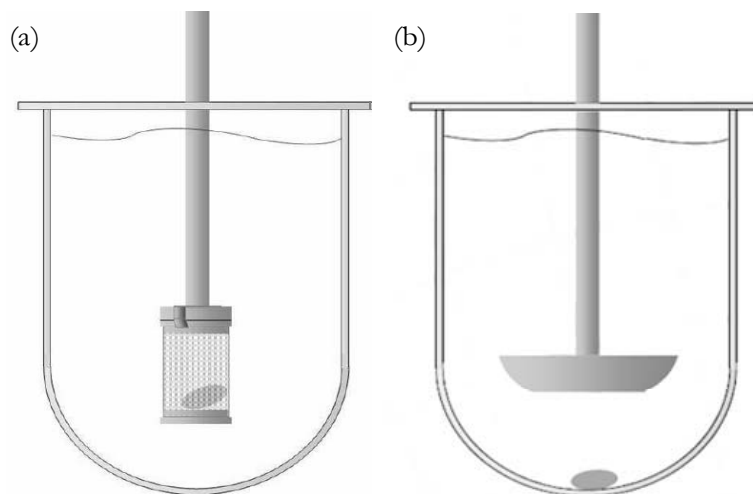


Figura 2.16. Aparell de tipus cistella (a) i aparell de tipus pala (b), descrits en la farmacopea.

L'últim (aparell 3) consisteix en una cel·la de flux continu on el pas de la solució es regula amb una bomba (veure Figura 2.17). La cel·la de flux continu ha de ser d'un material transparent i inert i ha de disposar d'un sistema de filtració a la sortida de la cel·la per tal d'evitar el pas de partícules que no s'hagin dissolt. S'ha de fixar adequadament amb una pinça per evitar que es mogui. La bomba se separa de la unitat de dissolució també per evitar possibles vibracions i aquesta no es pot trobar mai per sobre del nivell dels dipòsits amb la solució d'alliberament o el col·lector de la mostra. Es recomana emprar tubs inerts, com el politetrafluoroetilè, amb un diàmetre intern de 1,6 mm.

L'aparell 1 és idoni per a comprimits i càpsules sòlides que floten en solució. L'aparell 2 s'utilitza per seguir l'alliberament de comprimits i càpsules que no floten. L'aparell 3 per a formulacions sòlides, semisòlides i líquids que es poden desintegrar en solució.

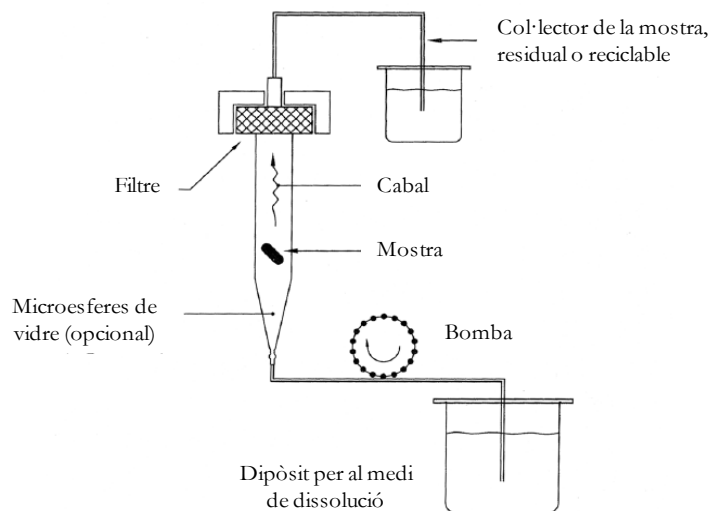


Figura 2.17. Aparell 3 de tipus flux continu, descrit en la farmacopea.

A part de les diferents formes d'agitació, és important el pH del medi de dissolució que es fixa generalment entre pH 1 i 8, depenent del lloc on es vulgui administrar aquesta formulació. El pH s'ha d'ajustar amb una aproximació de $\pm 0,05$ unitats del valor prescrit. Es recomana la utilització d'aigua com a medi de dissolució només quan s'ha demostrat que les variacions de pH no influeixen en les característiques de dissolució. Existeixen també certes recomanacions sobre els medis de dissolució. Per a un pH de 1,5 es recomana l'ús d'àcid clorhídric diluït; per a pH de 6,8 es recomana l'ús de tampó fosfat o d'acetat i també el tampó fosfat per a pH entre 7,2 i 7,5.

Per últim, cal fixar les condicions experimentals. La velocitat d'agitació escollida ha de ser entre 50 i 100 rpm ± 4 per cent i no pot excedir mai les 150 rpm. La temperatura ha de ser de $37 \pm 0,5$ °C, que correspon a la temperatura habitual del cos humà. Per fixar la temperatura s'utilitzen normalment banys d'aigua circulant o estàtics o dispositius que produeixen calor, com les camises calefactores. Finalment, els intervals de temps de presa de mostra dependran del tipus de formulació i seran d'intervals de minuts, d'hores o fins i tot de dies. El volum de mostra extret ha d'ésser corregit afegint un volum igual de medi de dissolució o s'ha de fer la corresponent correcció numèrica.

En aquesta tesi doctoral s'han utilitzat aparells modificats de tipus 2 i 3, substituint alguns dels components per d'altres disponibles en els laboratoris de recerca.

2.6.2. Cel·la de difusió de Franz

La majoria dels articles publicats en els últims anys per estudiar alliberaments *in vitro* de formulacions transdèrmiques o tòpiques utilitzen cel·les de Franz verticals. Franz va descriure un nombre de tècniques per controlar l'alliberament d'aquestes formulacions basades en una cel·la de difusió estàtica d'una cambra [66]. Les deficiències de les cel·les originals de Franz es van identificar i s'han anat millorant amb el temps, sobretot per aconseguir solucions hidrodinàmiques adequades amb una bona eficiència d'agitació i control de la temperatura. Així doncs, la cel·la de difusió de Franz que es troba comercialment és de vidre i està formada per una cambra receptora envoltada d'una camisa calefactora i una cambra donadora (veure Figura 2.18). Es fabriquen cambres receptores de diferents volums i totes elles disposen d'una obertura lateral per a la presa de mostra. La membrana es col·loca horitzontalment entre aquesta cambra i la cambra donadora, a sobre de tot. La membrana i les dues cambres estan fixades mitjançant una pinça metàl·lica i s'ha d'evitar la formació de bombolles d'aire. La mostra es col·loca uniformement distribuïda a sobre la membrana i a continuació es cobreix la cambra donadora amb un film per minimitzar l'evaporació del medi de dissolució. La solució s'agita contínuament amb un agitador magnètic i a una velocitat constant (entre 50 i 100 rpm) per tal de mantenir l'homogeneïtat del sistema. La temperatura en el si del medi receptor es manté a través de la camisa d'aigua circulant al voltant d'aquest compartiment, que prové d'un bany d'aigua de temperatura controlada. Aquesta temperatura es manté a $32 \pm 0,5$ °C, que correspon a la temperatura habitual de la pell.

La membrana que s'utilitzi per fer el test de dissolució pot ser de diferents materials, normalment de tipus artificial, però també animal, humana o sintètica. Aquesta hauria de ser, sobretot, porosa i inerta de manera que no afecti la cinètica d'alliberament del principi actiu en la formulació transdèrmica o tòpica. A més a més, la membrana ha de ser suficientment lliure de qualsevol substància que pugui interferir al procés (com per exemple greix).

Durant el test de dissolució es pipeteja una petita quantitat de mostra a intervals de temps predeterminats i a continuació s'introdueix el mateix volum amb el mateix medi de dissolució i a la T experimental (32 °C). Si durant els assajos es produeixen pèrdues de volum, s'han d'anar corregint quan sigui necessari.

A part de la cel·la de Franz també trobem descrits en la farmacopea espanyola tres equips més per seguir alliberaments de tipus transdèrmic o tòpic. Tots són modificacions

dels equips descrits per a dissolucions sòlides. Resumidament, el primer (aparell 4) conté una pala d'agitació sobre un disc que conté la mostra. El segon (aparell 5) està format per un cilindre rotatori on es troba la mostra. I l'últim (aparell 6) consisteix en un recipient oscil·latori que conté la mostra.

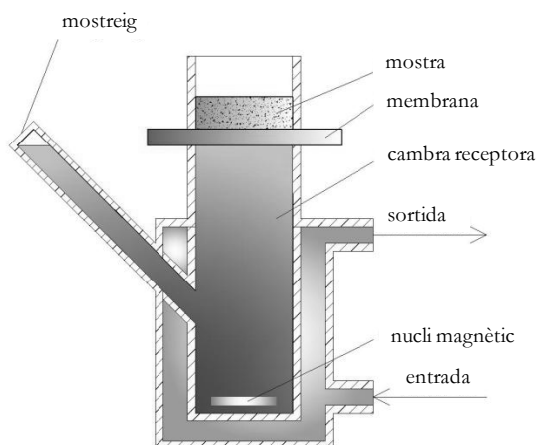


Figura 2.18. Dibuix d'una cel·la de difusió de Franz.

2.6.3. Models matemàtics per al seguiment d'alliberament de fàrmacs

Els mecanismes que descriuen l'alliberament de fàrmacs són complexos, però fonamentalment es basen en un primer procés de difusió del fàrmac a través de la matriu i la posterior erosió de la matriu per tal de facilitar l'alliberament. Quan s'alliberen fàrmacs solubles en el medi, l'alliberament es produeix per una combinació dels mecanismes de difusió i erosió, mentre que en el cas de fàrmacs insolubles el mecanisme predominant és l'erosió.

Des del descobriment d'aquests sistemes s'han postulat diferents models matemàtics per tal de descriure els perfils d'alliberament de fàrmacs en matrius [67-72]. Un dels models més simples és el que van desenvolupar *Krosmeyer et al.* [73] i és el següent:

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad \text{(equació 2.1)}$$

On M_t/M_∞ és la fracció de fàrmac alliberat, k és la constant de velocitat de difusió, t és el temps d'alliberament i n és l'exponent d'alliberament indicatiu del mecanisme d'alliberament del fàrmac. L'equació va ser modificada per *Ford et al.* [74] per tal de tenir en compte qualsevol temps de retard o efecte *burst* inicial (equació 2.2). L'alliberament ràpid inicial o fase *burst* es defineix com la dissolució ràpida del compost que es produeix a la

superfície entre el sòlid i el líquid. La seva magnitud dependrà de la solubilitat del fàrmac al medi de dissolució i de la distribució i proporció d'aquest a la superfície. A mesura que es va produint la dissolució, la proporció de la superfície ocupada pel fàrmac disminuirà i aleshores s'assumeix que l'àrea de superfície del fàrmac disponible és proporcional a la quantitat de fàrmac no dissolt. La segona fase de l'alliberament és controlada pel mecanisme de degradació del polímer o matriu polimèrica.

$$M_t/M_\infty = k(t-I)^n \quad \text{(equació 2.2)}$$

On I és el temps de retard. D'aquestes dues equacions se'n dedueix que quan l'exponent n és igual a 1, la velocitat d'alliberament és independent del temps. En aquest cas es tracta d'una cinètica d'ordre zero, en la qual la velocitat és controlada per les etapes de relaxació i erosió del polímer [75]. Quan $n = 0,5$, l'etapa de control de velocitat es basa en la difusió de Fick. Els valors intermedis entre 0,5 i 1 indiquen la contribució dels dos processos (difusió i relaxació del polímer) en el control de la cinètica d'alliberament (cinètica anòmala o d'ordre 1).

En el cas de formulacions tòpiques i transdèrmiques, *Higuchi* va descriure l'alliberament del fàrmac com un procés de difusió basat en la llei de difusió de Fick i dependent de l'arrel quadrada del temps [76]. Aquesta relació ha servit per descriure la dissolució d'un fàrmac en diferents tipus de formulacions [77]. Segons *Higuchi*, la dissolució del principi actiu segueix les equacions 2.3 i 2.4, on Q és la quantitat de fàrmac alliberat per unitat d'àrea d'aplicació, h és el gruix de la membrana, C_0 és la concentració inicial de fàrmac en la formulació, D és el coeficient de difusió del fàrmac en la formulació, t és el temps d'alliberament i R és el percentatge de fàrmac alliberat [76, 78].

$$Q = 2C_0 \times (Dt / \pi)^{1/2} \quad \text{(equació 2.3)}$$

$$R = 200 \times (Dt / \pi h^2)^{1/2} \quad \text{(equació 2.4)}$$

Si la velocitat d'alliberament compleix aquesta llei, la quantitat de fàrmac alliberat és funció lineal del $t^{1/2}$ i D es pot calcular a partir del pendent de la recta. Aquestes afirmacions són certes quan el fàrmac és l'únic component que es difon fora de la matriu, les condicions experimentals es mantenen a la cambra receptora i aleshores D és constant en funció del temps [76, 79]. El perfil d'alliberament característic és curvilini i exhibeix una velocitat de difusió relativament alta a valors de temps petits que va disminuint amb el

temps. El camí de difusió esdevé progressivament més tortuós i aleshores es necessita més temps perquè les molècules de fàrmac es difonguin des de la regió de concentració alta en la matriu polimèrica cap a la interfase de la membrana, on es produeix el procés de partició de les molècules. En conseqüència, la velocitat del flux disminueix amb el temps.

Les equacions 2.3 i 2.4 descriuen la difusió d'un fàrmac a través d'una membrana homogènia i s'han fet servir durant aquesta tesi doctoral per tal d'explicar el comportament de les formulacions transdèrmiques i tòpiques estudiades.

2.6.4. Altres mètodes d'anàlisi

Anàlisi calorimètrica diferencial

L'anàlisi calorimètrica diferencial (DSC) és una tècnica termoanalítica que mesura la calor absorbida o generada per una mostra quan se li aplica una rampa de temperatura en una atmosfera determinada (normalment de nitrogen) [80]. Ens permet caracteritzar i analitzar les transicions tèrmiques de productes químics fins a elevades temperatures. La DSC s'utilitza també per determinar el percentatge cristal·lí dels polímers a través de la mesura de les temperatures de fusió (T_m) i de transició vítria (T_g) i les entalpies associades a aquests processos. La fusió és un procés termodinàmic de primer ordre i, a una pressió determinada, depèn únicament de la temperatura. Per aquest motiu la velocitat d'escalfament és crucial en aquests estudis. A velocitats d'escalfament lentes (generalment 10 °C per minut), major temps per observar canvis i transformacions. Quan s'estudien les característiques dels polímers, una de les altres transicions tèrmiques típiques és la de transició vítria.

En els sistemes estudiats durant la tesi doctoral es va fer servir un dispositiu similar al que es mostra en la Figura 2.19. Un calorímetre està format per dues cassoletes d'alumini separades entre elles, en una de les quals es col·loca la mostra i l'altre és la de referència. A continuació es comencen a esclafar elèctricament a través d'un disc termoelèctric i la calor flueix tant en la mostra com en la referència. La relació del flux de calor se segueix mitjançant termoparells. Aquesta relació mesura la diferència de quantitat de calor de la mostra i de la referència quan la temperatura de la mostra augmenta (o disminueix) linealment.

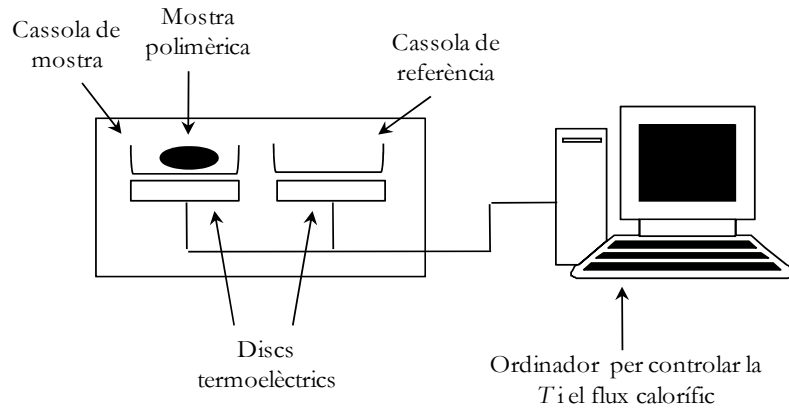


Figura 2.19. Esquema de les diferents parts d'un calorímetre.

Les dades obtingudes mitjançant la DSC s'obtenen en forma de corba. L'eix x correspon a la temperatura aplicada i l'eix y correspon a l'energia d'entrada o flux calorífic, expressat en miliwatts (mW). Un esquema del tipus de corba que s'obté es mostra en la Figura 2.20. En aquesta s'observa que també es dona un altre procés exotèrmic, com és la cristal·lització. En el cas de polímers cristal·lins aquesta es produeix com a conseqüència d'una ordenació del polímer en cristalls una vegada superada la T_g . En aquesta memòria la majoria de polímers estudiats són amorfs i aleshores aquesta transició no s'observa.

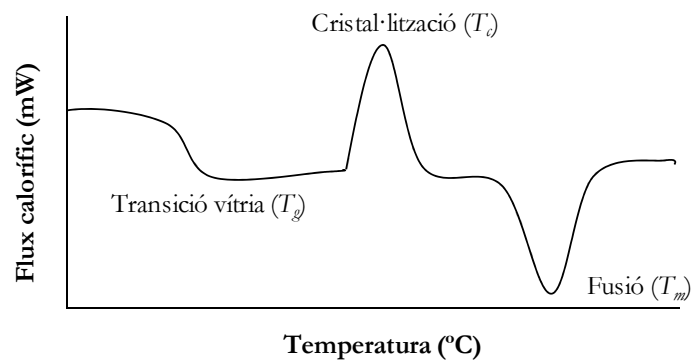


Figura 2.20. Corba DSC típica, on es mostren les diferents transicions que es poden observar.

La DSC ens ha servit per poder determinar les temperatures característiques dels materials elaborats durant aquesta tesi doctoral, com són la T_m i la T_g . Aquesta última és la temperatura a la qual un polímer amorf canvia d'estat rígid i trencadís a tou i mal·leable, ja que s'inicia el moviment simultani de segments llargs de molècules de polímer. Aquesta transició no implica absorció o generació de calor i és per això que la seva entalpia no canvia ($\Delta H = 0$). No observem cap pic a la gràfica DSC, sinó un descens de la línia base a

conseqüència de la disminució de la capacitat calorífica del polímer. Les entalpies de les altres transicions es calculen mitjançant la integració del pic de la gràfica DSC.

En canvi, quan es produeix una fusió s'observa un pic mínim a la gràfica DSC provocat per l'absorció de calor per part de la mostra. Es tracta, doncs, d'un procés endotèrmic.

Microscòpia electrònica de rastreig

El microscopi electrònic de rastreig inicialment pensat per obtenir imatges de gran resolució dels trets topogràfics superficials dels objectes es fonamenta en la interacció d'un feix primari d'electrons amb l'objecte que es pretén estudiar. Aquest feix d'electrons és la característica que el diferencia d'un microscopi òptic convencional, en el qual s'empra un feix de llum. A més a més, està format per lents magnètiques en comptes d'òptiques. Els electrons es poden considerar ones amb longituds d'ona molt més petites que la llum visible. És gràcies a aquest fet que es poden obtenir imatges d'objectes molt petits amb una elevada resolució, perquè no es produeixen efectes de difracció. Es mostra en la Figura 2.21 un esquema de les diferents parts d'un microscopi electrònic.

Una de les característiques principals de la microscòpia electrònica de rastreig és la gran versatilitat en les aplicacions tant en el camp de les ciències de materials com biomèdiques.

Un feix molt fi, intens i estable d'electrons interacciona amb la superfície de la mostra, i origina senyals diversos que, convenientment tractats, permeten obtenir-ne informació tant morfològica com estructural i microanalítica. Les mostres es recobreixen amb una capa molt prima (~ 10 nm) de metall pesant, com ara or o platí. El recobriment fa que la mostra sigui conductora i evita que els electrons hi penetrin, amb la qual cosa la imatge obtinguda és més clara.

Durant l'estudi dels diferents sistemes es van realitzar fotografies amb el microscopi electrònic de rastreig per tal de comprovar l'eficiència de la impregnació o recobriment i la diferent morfològia i mida de les mostres.

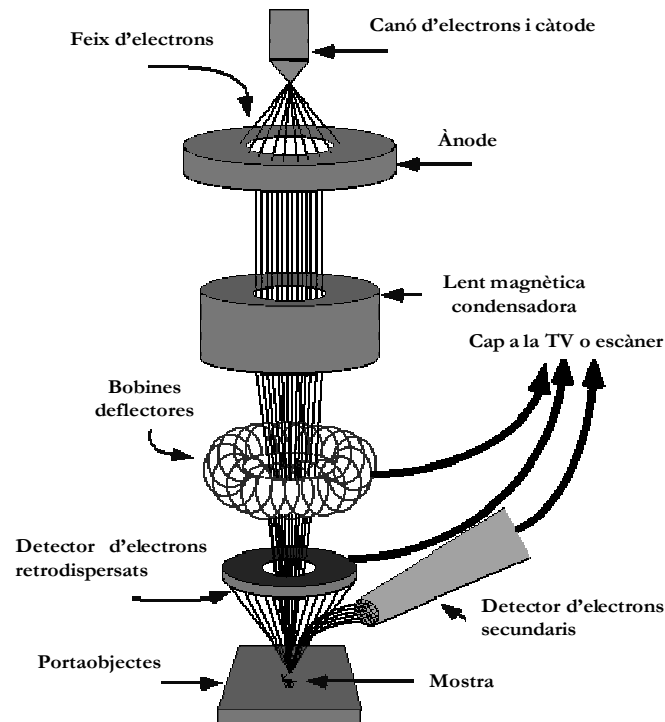


Figura 2.21. Diagrama dels diferents components que formen part d'un microscopi electrònic de rastreig.

Microscòpia confocal de fluorescència

La microscòpia confocal, a diferència de la microscòpia de fluorescència convencional, permet eliminar el senyal fluorescent provinent d'una mostra semitranslúcida i que està fora de focus. Així s'aconsegueixen, de manera no destructiva, seccions òptiques a diferents plans de la mostra. Aquestes seccions poden ser utilitzades per fer-ne una anàlisi tridimensional o per a l'observació d'una part interna de la mostra.

Utilitza mètodes de captació i anàlisi de la imatge que permeten enfocar un únic pla de la mostra i eliminar les radiacions lluminoses que provenen d'altres zones situades en plans diferents al pla d'enfocament. D'aquesta manera es poden veure les molècules fluorescentes situades en un únic pla o focus i s'obté una imatge nítida d'una fina secció de l'objecte, anomenada secció òptica.

La microscòpia confocal produeix un augment significatiu de la resolució òptica i del contrast de les imatges, avantatges que la converteixen en una eina imprescindible en l'obtenció d'imatges d'alta resolució. La microscòpia confocal de reflexió segueix els mateixos principis que l'anterior, però en aquest cas no és necessari cap tipus de marcatge fluorescent, sinó que es recull la llum reflectida per la mostra. Aquesta tècnica és una eina de gran utilitat en l'anàlisi de superfícies.

Les seccions òptiques obtingudes per microscòpia confocal contenen la informació per poder-ne fer posteriorment una anàlisi tridimensional: quantificació volumètrica, distribució de la fluorescència, etc.

Aquesta tècnica va ser utilitzada per observar la morfologia del material polimèric de tipus pegat després d'ésser posat en contacte amb CO₂. També va servir per visualitzar diferents seccions transversals de la mostra i detectar si el procés d'impregnació s'havia produït correctament.

2.7. Quimiometria

La quimiometria es defineix com la disciplina química que utilitza les matemàtiques, l'estadística i la lògica per tal de (a) dissenyar i seleccionar els procediments experimentals òptims, (b) extreure la màxima informació química rellevant mitjançant l'anàlisi de dades químiques i (c) obtenir coneixement d'un sistema químic qualsevol [81]. Aquesta s'utilitza freqüentment en el camp de la química analítica, però també en altres camps com, per exemple, en síntesi orgànica [82, 83] o en control estadístic de processos [84].

En aquesta tesi doctoral s'han utilitzat tècniques quimiomètriques per a l'optimització de procediments i el tractament de dades, utilitzant la resolució multivariant de corbes basada en mínims quadrats alternats.

2.7.1. Tipus de mesures instrumentals: univariants i multivariants [85]

Mesures univariants. Dades escalars: sensors d'ordre zero

Són mesures de naturalesa univariant en les quals s'obté només un valor numèric o escalar. Es dona, per exemple, en mesures potenciomètriques de pH o d'algun ió determinat mitjançant elèctrodes selectius d'ions o també en les mesures espectrofotomètriques realitzades a una sola longitud d'ona o freqüència.

Les mesures univariants tenen utilitat en determinacions analítiques que presentin selectivitat total, és a dir, que la resposta instrumental sigui conseqüència d'un sol component químic i que, per tant, no hi hagi cap tipus d'interferència ni soroll de fons sobre el senyal instrumental mesurat.

Mesures multivariants. Dades vectorials: sensors de primer ordre

En aquest cas, la resposta instrumental està constituïda per files de valors o vectors de dades. Com a exemples trobem les mesures espectrofotomètriques UV, Vis, IR, NIR, etc. També ho són aquells mètodes instrumentals que proporcionen una informació numèrica vectorial, com és el cas de la successió de respostes univariants o el seguiment de la resposta en funció del temps o del pH.

El gran avantatge és que podem determinar un anàlit en presència d'espècies interferents utilitzant mètodes de calibratge multivariant de primer ordre. D'altra banda, per dur a terme aquesta etapa de calibratge serà necessari disposar de patrons que continguin els possibles interferents.

Mesures multivariants. Dades matricials: sensors de segon ordre

Les respostes instrumentals es donen en forma de taules o matrius de dades. En aquesta taula o matriu hi ha dues direccions, files i columnes, que corresponen a dos tipus diferents de dominis de mesura. Es donen, per exemple, en la cromatografia acoblada a un detector de díodes en sèrie, on cada fila és un espectre a un temps de retenció determinat i cada columna és un cromatograma a una longitud d'ona determinada.

Aquests tipus de dades són similars a les obtingudes en la present memòria en les determinacions espectrofotomètriques. Així doncs, durant el seguiment de processos cinètics s'enregistra l'espectre complet a intervals de temps regulars i durant les valoracions espectrofotomètriques s'obtenen dades espectrals a diferents valors de pH. Per al tractament d'aquests tipus de dades s'han desenvolupat diferents mètodes matemàtics, tals com els derivats de l'anàlisi de factors [86]. En aquest cas es poden determinar les concentracions dels anàlits d'interès, inclús amb patrons sense les possibles interferències.

Mesures multivariants. Dades tensorials: cubs de dades i sensors d'ordre superior

Per últim tenim les dades obtingudes a partir de tres (o més) dominis de mesura que es poden estructurar en forma de cub (o d'arranjaments d'ordre superior). L'agrupació de dades de segon ordre ens porta també a sistemes d'ordre superior. Obtenim dades d'aquest tipus en el seguiment amb el temps d'un procés o reacció química mitjançant l'enregistrament d'espectres de fluorescència d'excitació-emissió, per exemple. Es mostra en la Figura 2.22 una representació dels diferents ordres que poden presentar els diferents tipus de dades.

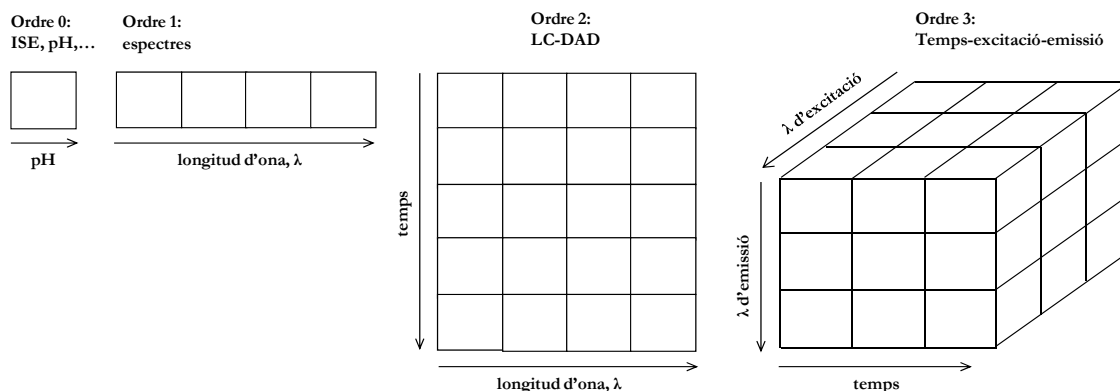


Figura 2.22. Tipus de senyals instrumentals o sensors.

2.7.2. Resolució multivariant de corbes basada en mínims quadrats alternats

El terme resolució es pot definir com la descomposició de la matriu de dades experimentals en les diferents contribucions pures de les espècies químiques, generalment els espectres purs i els perfils de concentració.

El mètode de resolució multivariant de corbes assumeix que les dades segueixen un model de tipus bilineal equivalent a la generalització de la llei de Lambert-Beer per a l'espectroscòpia d'absorció. Per aquest cas particular, és possible expressar en forma matricial la matriu de dades experimental (D), que es descompon de la manera esquematitzada a la Figura 2.23 [85]:

$$\begin{array}{|c|} \hline \text{Variable externa} \\ \hline \mathbf{D} \\ \hline \text{Longitud d'ona} \\ \hline \end{array} = \begin{array}{|c|} \hline \text{Variable externa} \\ \hline \mathbf{C} \\ \hline \text{nc} \\ \hline \end{array} \begin{array}{|c|} \hline \text{nc} \\ \hline \mathbf{S}^T \\ \hline \text{Longitud d'ona} \\ \hline \end{array} + \begin{array}{|c|} \hline \text{Variable externa} \\ \hline \mathbf{E} \\ \hline \text{Longitud d'ona} \\ \hline \end{array}$$

Figura 2.23. Descomposició de la matriu de dades experimentals mitjançant la resolució multivariant de corbes basada en mínims quadrats alternats.

D conté els espectres obtinguts al llarg del procés on es modifica una variable experimental externa (per exemple, la temperatura o el pH), C els perfils de concentració de les diferents espècies químiques presents en el sistema, S^T els perfils espectrals purs corresponents a cadascuna d'aquestes espècies i E és la matriu dels residuals no explicats en

multiplicar les matrius C i S^T . El nombre de components o espècies que participen en el sistema químic i que tenen resposta espectroscòpica és nc .

Per tal de realitzar aquest càlcul, té lloc un procés iteratiu d'optimització per mínims quadrats alternats (mètode MCR-ALS, de l'anglès *multivariate curve resolution based on alternating least squares*). El coneixement previ dels sistemes en els mètodes iteratius és un avantatge, però no és imprescindible necessari. A més a més, aquest mètode presenta l'avantatge de segon ordre. Les principals etapes del mètode MCR-ALS [87] es presenten esquematitzades en la Figura 2.24 i es detallen a continuació.

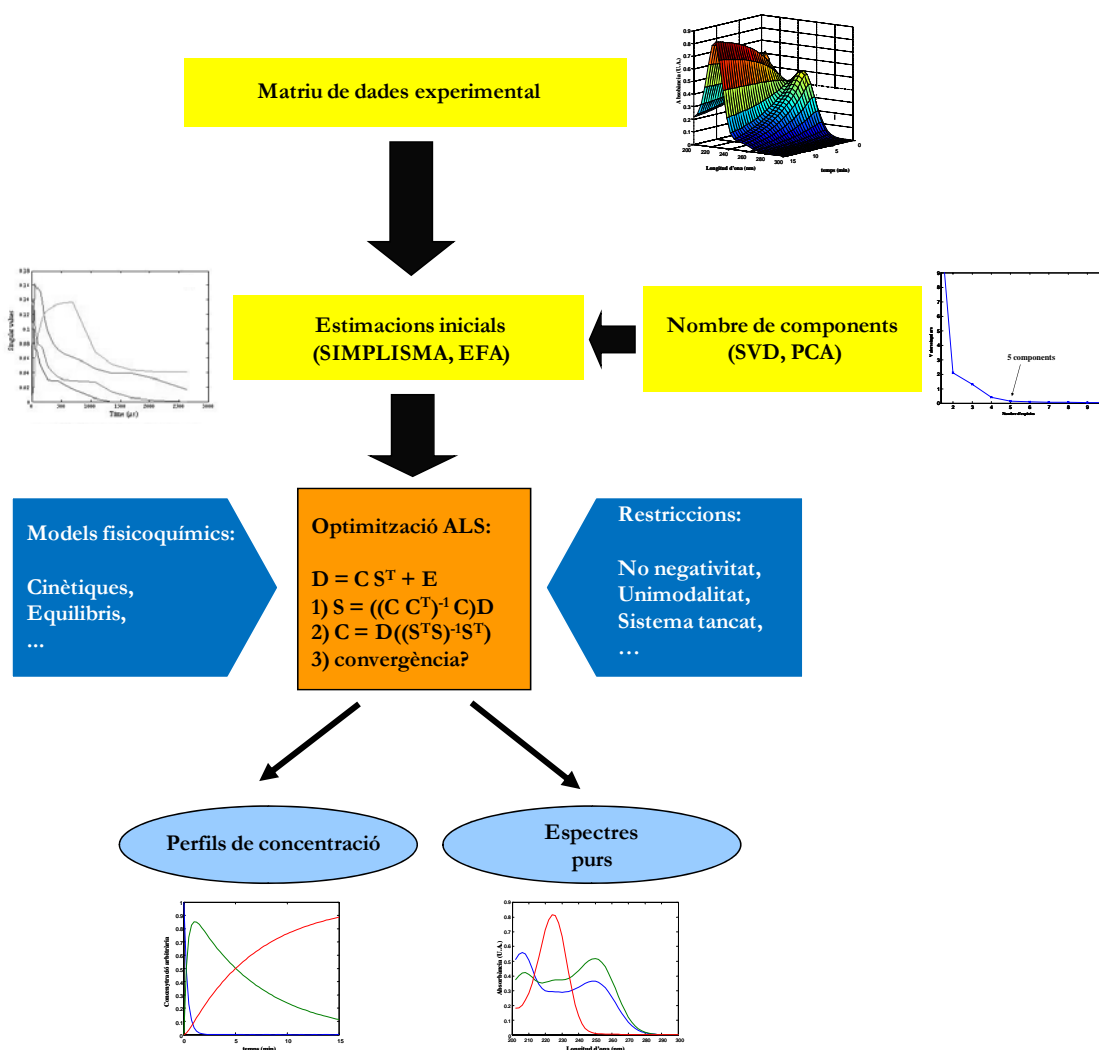


Figura 2.24. Esquema d'aplicació del mètode MCR-ALS.

Etapa 1. Estimació del nombre de components

El primer pas per tal de poder aplicar el mètode MCR-ALS a una matriu de dades experimentals és la determinació del nombre d'espècies o components químics que hi són presents. El rang matemàtic d'una matriu és el nombre més petit entre el nombre de files o

columnes linealment independents d'aquesta. En el cas de matrius de dades d'un sistema químic és útil definir un rang químic de la matriu, de la qual es poden extreure el nombre de components que expliquen la variació produïda per les espècies químiques en absència de soroll experimental. Amb aquesta finalitat s'utilitza, per exemple, la descomposició en valors singulars (SVD, de l'anglès *singular value decomposition*) i l'anàlisi per components principals (PCA, de l'anglès *principal component analysis*) [85, 86]. Els valors singulars són l'arrel quadrada dels valors propis. En la present memòria s'ha utilitzat l'SVD, ja que una representació d'aquests valors dona d'una manera ràpida i senzilla una primera estimació del nombre d'espècies químiques presents. L'anàlisi d'SVD s'obté resolent una equació matemàtica que descompon la matriu de dades en un producte de tres matrius:

$$D_{(m, n)} = U_{(m, nc)} \times S_{(nc, nc)} \times V^T_{(nc, n)} \quad \text{(equació 2.5)}$$

La matriu S és una matriu diagonal que conté els valors singulars de la matriu de dades. Les matrius U i V són matrius ortonormals i per tant, es compleix que (on I és la matriu identitat):

$$U^T \times U = V^T \times V = I \quad \text{(equació 2.6)}$$

Es poden representar gràficament aquests valors singulars en funció del nombre de components, però la seva representació no és conclouent per determinar el nombre d'espècies d'un sistema. Els valors singulars associats a aquestes espècies són normalment més grans que els valors singulars associats a l'error experimental de tipus aleatori. Per aquest motiu, a vegades l'elecció del nombre de components pot ser difícil i aleshores s'estudia la resolució amb diferent nombre de components fins a aconseguir un model que ajusti millor les dades experimentals. És a dir, que proporcioni perfils espectrals i de concentració acceptables i amb significat químic.

Etapa 2. Obtenció de les estimacions inicials

A més a més de conèixer el nombre d'espècies del sistema, és necessària la construcció de la matriu de les estimacions inicials. Aquestes estimacions poden ser tant espectres com perfils de concentració de cada espècie. Existeixen diferents models matemàtics per obtenir aquestes estimacions, els quals es basen en la detecció de variables pures (SIMPLISMA, de l'anglès *simple to use interactive self-modeling mixture analysis*) [88] o en

l'anàlisi de factors evolutius (EFA, de l'anglès *evolving factor analysis*) [89]. De totes maneres, en aquest treball s'ha preferit utilitzar una metodologia basada en la inspecció visual de les dades i selecció dels perfils espectrals més representatius.

Etapa 3. Optimització per mínims quadrats alternats

A continuació s'aplica el procés de resolució basat en un algorisme que descompon de manera iterativa la o les matrius de dades experimentals per mínims quadrats. El procés iteratiu finalitza quan es produeix alguna de les següents situacions: (a) l'error d'ajust en la reproducció de la matriu de dades és més petit que un cert valor fixat prèviament, (b) es sobrepassa un determinat nombre d'iteracions o (c) les iteracions divergeixen 20 vegades consecutivament.

Com ja s'ha comentat, les dades experimentals tenen un significat químic de manera que podem aplicar certes restriccions al mètode que deriven del coneixement previ del sistema per tal d'optimitzar els perfils espectrals i de concentració. El tipus de restriccions aplicables es detallen a continuació:

Restriccions

Existeixen diversos tipus de restriccions a aplicar i és important saber que com més restriccions poden ser aplicades, millor serà la convergència i més ben definits estaran els resultats. En aquesta memòria s'apliquen diverses restriccions útils en l'estudi de les matrius de dades que condueixen a millorar els resultats:

- **No negativitat:** és aplicable normalment als perfils de concentració, ja que una concentració és sempre positiva o igual a zero. Aquesta restricció s'aplica també a perfils espectrals d'absorció molecular UV-vis, on la resposta instrumental és sempre positiva. La no negativitat es pot aplicar de diferents maneres. Es pot forçar que els valors negatius siguin iguals a zero o es pot aplicar l'optimització per a mínims quadrats no negatius. En aquesta memòria els valors negatius s'han forçat a zero.
- **Unimodalitat:** és una condició que s'aplica quan els perfils de resposta tenen un sol màxim o pic. És una situació habitual en els perfils de concentració, però no tant per a espectres. En aquesta memòria s'ha aplicat en les concentracions tant en els estudis cinètics com en les valoracions espectrofotomètriques en continu.

- **Sistema tancat:** s'aplica quan la concentració d'una espècie o la suma de totes les detectables és constant durant tot el procés, condició que es compleix en els diferents estudis realitzats en aquesta memòria.
- **Model químic:** s'utilitza quan es vol imposar determinats models fisicoquímics, com els de tipus cinètics o termodinàmics, durant el procés d'optimització ALS. Permeten obtenir valors tant de constants cinètiques com d'equilibri juntament amb els seus errors associats (vegeu apartat 2.7.3).

El mètode MCR-ALS presenta bàsicament dues variants. La primera està basada solament en el *soft modelling*, en el qual no es força a complir cap tipus de model químic explícit durant el càlcul. En aquest cas, es poden aplicar restriccions en funció de les característiques químiques del sistema o de les contribucions pures (per exemple, les restriccions de no negativitat, unimodalitat i sistema tancat). Interessa que aquestes restriccions s'apliquin només si es té coneixença de la seva validesa, ja que si no, poden conduir a resultats erronis o no desitjats.

La segona, basada en el *hard modelling* o modelització rígida, on la matriu de dades D es descompon i es força a complir un model químic definit per una llei fisicoquímica i una estequiometria que relaciona les concentracions de les espècies en el procés. En aquests casos habitualment també s'apliquen restriccions de *soft modelling*, així aquestes estratègies són conegudes com *hard-soft modelling* i conjunten els avantatges de les dues aproximacions.

Limitacions del mètode MCR-ALS

a) Ambigüitats d'intensitat i de rotació

Tal i com és habitual en tots els mètodes de resolució de corbes, també en MCR-ALS es troben presents les ambigüitats d'intensitat i rotació. Les ambigüitats d'intensitat es refereixen al fet que els perfils recuperats poden estar multiplicats o escalats per algun factor extern desconegut, la qual cosa no és important en l'anàlisi qualitativa, però dificulta l'anàlisi quantitativa. Si s'analitza una única matriu de dades, aquesta ambigüitat generalment es pot resoldre si es pot aplicar la restricció de sistema tancat. Cal aclarir que en aquesta memòria no sembla un problema important, ja que habitualment el sistema és tancat. D'altra banda, aquest tipus d'ambigüitats també es poden evitar amb l'anàlisi simultani de diverses matrius (apartat 2.7.4).

Les ambigüitats rotacionals es produeixen a causa de la superposició de dos o més components linealment independents. Com a conseqüència, els espectres estimats són una combinació lineal dels espectres purs de les espècies implicades [90]. Aquesta ambigüitat es pot evitar si tenim zones on només hi ha present una de les espècies químiques o només una d'elles absorbeix (condicions de selectivitat local).

b) Deficiència de rang

La deficiència de rang és un dels problemes associats a l'anàlisi de les dades de mescles de compostos. En l'apartat d'estimació del nombre d'espècies s'ha vist que es tracta de la tria d'un nombre de components que corresponguin al nombre d'espècies químiques presents en el sistema. Aquesta deficiència es produeix quan el rang total de la matriu de dades és menor que el nombre d'espècies que contribueixen individualment a les dades.

Aquesta deficiència de rang en un sistema es pot resoldre mitjançant l'augment de la matriu de dades [91], analitzant simultàniament matrius linealment independents (per exemple en diferents valors de pH). L'augment pot ser tant per a files com per a columnes de la matriu.

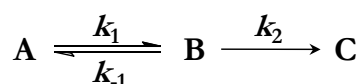
Cal afegir que moltes vegades la disminució del nombre d'espècies que es poden detectar en el sistema també es produeix si els espectres (o perfils de concentració) de les espècies presents en la mostra són pràcticament idèntics i se solapen.

2.7.3. Aplicació de models fisicoquímics

Models cinètics

L'ús de models cinètics ens serveix per ajustar perfils de concentració de les espècies d'un procés químic en funció del temps [87]. En aquests models els perfils de concentració de cada espècie es calculen seqüencialment, és a dir, per tal de resoldre un procés es compleix sempre que la concentració d'una segona espècie és completament dependent de la primera.

Els processos químics es poden explicar per un gran nombre de mecanismes de reacció amb ordres molt diversos. En aquesta memòria ens centrem només en un tipus de mecanisme d'ordre 1, que es mostra a continuació:



Primerament es comença amb l'anàlisi de la matriu de dades experimentals, aplicant el mètode MCR-ALS. Un cop s'han obtingut els perfils de concentració i els espectres purs s'aplica el model cinètic, el qual resol el sistema fent una integració de les equacions matemàtiques diferencials que es mostren a continuació, i ens proporciona així, tant els valors de concentració per a cada espècie en funció del temps com les seves corresponents constants cinètiques:

$$d[A] / dt = k_{-1}[B] - k_1[A] \quad \text{(equació 2.7)}$$

$$d[B] / dt = k_1[A] - (k_{-1} + k_2)[B] \quad \text{(equació 2.8)}$$

$$d[C] / dt = k_2[B] \quad \text{(equació 2.9)}$$

Models àcid-base

Els models àcid-base són molt útils per a la resolució de dades obtingudes en sistemes on es fa una variació del pH al llarg del procés. Per poder aplicar el model és essencial el compliment de la llei d'acció de masses. En alguns casos senzills es poden calcular els valors de les concentracions de cada espècie en cada punt de la valoració a partir d'equacions que relacionen la llei d'acció de masses i les concentracions totals de cada espècie. Si considerem un cas general d'equilibri tal com:



la constant d'equilibri corresponent és:

$$K_a = (a_{H_3O^+} \cdot a_{A^-}) / a_{HA} \quad \text{(equació 2.11)}$$

i a concentracions diluïdes:

$$K_a = [H_3O^+] \cdot [A^-] / [HA] \quad \text{(equació 2.12)}$$

A continuació es desenvolupen les equacions que hauran de complir les concentracions en cada punt experimental i s'ajusta el valor òptim de les constants d'equilibri mitjançant un procés iteratiu. Aquesta optimització es duu a terme a través d'un algoritme i del compliment de la llei d'acció de masses, dels valors inicials de les constants d'equilibri i de les concentracions analítiques de les espècies presents [87]. Lògicament, si es tenen unes estimacions inicials acurades dels valors de les constants d'equilibri, l'optimització serà més ràpida i fiable.

Limitacions dels mètodes de modelització rígida

Els mètodes de modelització rígida també presenten certes limitacions. Cal tenir un coneixement previ del model a optimitzar i s'han de fer estimacions inicials raonables. Tot i això, la majoria de vegades la presència d'ambigüitats quan s'estudien mecanismes complexos és inevitable, així com també la distorsió dels models a causa de la presència d'interferents. Aquestes limitacions s'eviten amb el *hard-soft modelling*.

2.7.4. Resolució simultània de diverses matrius de dades

Tal i com s'ha comentat en l'apartat 2.7.2, l'anàlisi simultani de diverses matrius de dades ens ajuda a minimitzar l'ambigüitat d'intensitat i millorar la qualitat dels resultats. Per tal de poder realitzar aquesta anàlisi és necessari que les matrius de dades analitzades tinguin com a mínim un ordre de mesura en comú. En aquesta memòria, l'augment es duu a terme mantenint les columnes en comú, és a dir, l'interval de longituds d'ona.

També és possible realitzar l'augment matricial mantenint les files en comú, però en aquest cas caldria que els perfils de concentració de cada espècie fossin exactament els mateixos en tots els processos. I inclús es poden augmentar matrius mantenint files i columnes en comú simultàniament, i així es poden seguir diversos experiments mitjançant múltiples tècniques.

Per tal de començar a aplicar l'anàlisi, es necessita una estimació inicial de la matriu de dades augmentada, D_b , construïda a partir de les matrius individuals, tals com es mostra en la Figura 2.25.

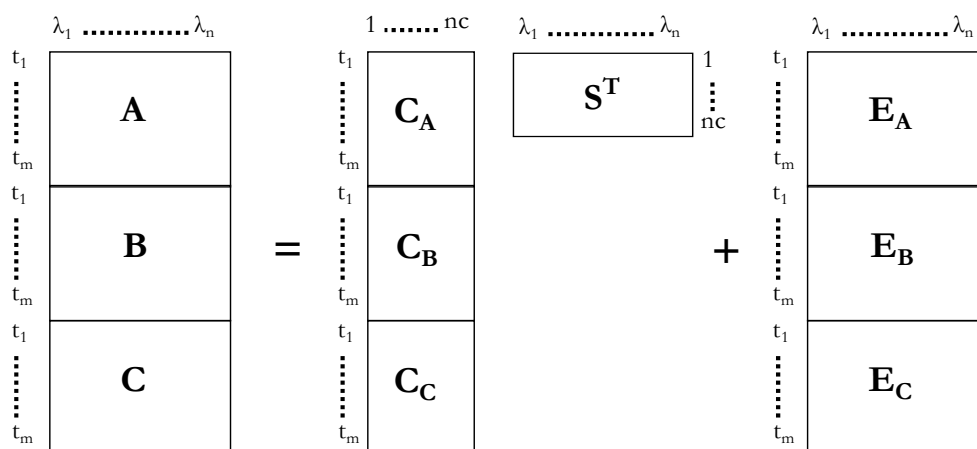


Figura 2.25. Esquema de les matrius de dades augmentades a partir de tres matrius individuals **A**, **B** i **C**. t_m és el nombre de mesures espectrals, λ_m el nombre de longituds d'ona i nc el nombre d'espècies del sistema.

En aquest cas, a més de les restriccions emprades anteriorment per a l'anàlisi individual, també es poden aplicar noves restriccions de manera opcional:

- Es força que les espècies comunes tinguin el mateix espectre en la matriu S^T . Aquesta restricció va implícita en l'augment matricial.
- Components amb concentració zero: si es coneix que una espècie no existeix en un determinat procés, es força la seva concentració perquè sigui igual a zero.
- Correspondència entre espècies: està directament relacionada amb l'anterior. Si se sap que una espècie es troba present o no en una matriu, es pot forçar la seva presència o absència.

2.7.5. Pretractament de dades espectrals amb filtres de Savitzky-Golay

Aquest filtre s'utilitza per tal de minimitzar el soroll en dades experimentals. En tota mesura experimental trobem cert nivell de soroll, que en certs casos es pot corregir [86]. El fet d'aplicar aquest filtre no implica necessàriament una millora dels resultats experimentals, encara que sí que proporciona una millora gràfica.

El filtre substitueix el valor y d'un punt específic de dades experimentals pel valor d'un polinomi que s'ha ajustat a diversos punts de dades experimentals veïnes. El càlcul es repeteix per a totes les dades. Hi ha dos paràmetres que defineixen aquest filtre: el nombre de punts a dreta i esquerra del valor central i el grau del polinomi al qual ajustarem les dades. És crucial escollir aquests paràmetres cuidadosament, ja que han de ser els adequats per al tipus de corbes a ajustar.

2.7.6. Disseny d'experiments

El disseny d'experiments és una eina útil en l'optimització de variables experimentals de processos de síntesi, on s'aplica per tal de determinar eficientment les condicions necessàries per obtenir els productes d'una determinada manera [81].

Consisteix en l'estudi de l'efecte que produeixen els diferents factors en la resposta experimental i també l'efecte d'interacció entre factors. D'aquesta manera es poden determinar els valors òptims per als diferents factors estudiats.

A través del disseny experimental s'intenta entendre l'efecte dels factors i modelar la relació entre aquests i la resposta experimental realitzant un nombre mínim d'experiments.

En la majoria dels dissenys experimentals, el nombre de factors en estudi és més gran que 1. Per poder-los optimitzar tots s'utilitzen aproximacions multivariants que permeten observar interaccions entre els factors, efecte que no es dona quan es realitza un disseny univariant.

En un procés d'optimització s'han d'escollir en primer lloc les respostes a optimitzar i a continuació els factors, que poden ser de tipus qualitatiu o quantitatiu. És important escollir correctament els dominis experimentals, ja que si aquests són molt amplis es realitzaran experiments innecessaris que poden fer disminuir la precisió dels resultats. D'altra banda, si els límits són massa estrets es corre el risc que el valor òptim del factor no es trobi comprés dins l'interval estudiat.

La interacció de les variables experimentals o factors es pot comprovar a través de la inspecció visual dels efectes o mitjançant la determinació de la desviació estàndard dels efectes i la posterior aplicació d'un test t o anàlisi estadístic de la variància (ANOVA).

Disseny factorial complet i fraccionat

Un disseny experimental que combina tots els possibles valors de k factors a S nivells és un disseny factorial complet i suposa la realització d'un total de S^k experiments. Així doncs, un disseny factorial de 2 nivells i tres factors dona lloc a la realització de 8 experiments en total (2^3). Per això el nombre d'experiments per a un nombre determinat de nivells augmenta exponencialment amb el nombre de factors. Per exemple, per un procés de 2 nivells i 8 factors seria necessari fer 256 experiments. En aquests casos és millor optar per un disseny fraccionat, en el qual es realitza només una fracció del total dels experiments. La notació per a aquests dissenys seria S^{k-p} , on p és la mida de la fracció que s'emprarà (per exemple, en un disseny 2^{3-1} es realitzen la meitat dels experiments que correspondrien a un disseny 2^3) [92]. En la Figura 2.26 es mostren exemples de dissenys factorials complets i fraccionats.

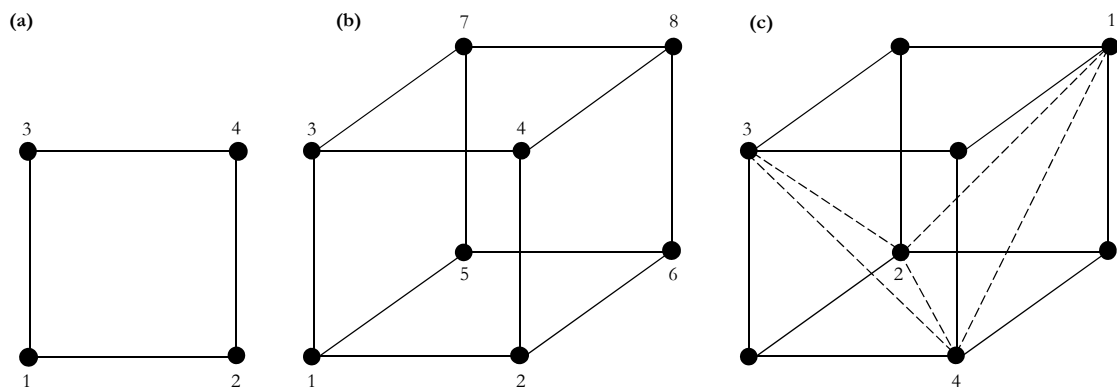


Figura 2.26. Disseny factorial complet: (a) 2^2 i (b) 2^3 i (c) fraccionat 2^{3-1} .

2.8. Bibliografia

1. Jain, K.K., ed. *Drug Delivery Systems*. ed. J.M. Walker. 2008: Hatfield, Herts., UK.
2. Zaffaroni, A., *Bandage for administering drugs*. 1971, US 3598123.
3. Zaffaroni, A., *Time-released drug-delivery system*. 1971, ZA 7007144.
4. Brannon-Peppas, L., Birnbaum, D.T., Kosmala, J.D., *Polymers in controlled release*. *Polymer News*, 1997. **22**(9): p. 316-318.
5. Shaw, J., Urquhart, J., *Programmed, systemic drug delivery by the transdermal route*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1979. **1**(1): p. 208-211.
6. Yukimatsu, K., Nozaki, Y., Kakumoto, M., Ohta, M., *Development of a Trans-Mucosal Controlled-Release Device for Systemic Delivery of Antianginal Drugs Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1994. **20**(4): p. 503-534.
7. Gupta, S.K., Southam, M., Gale, R., Hwang, S.S., *System functionality and physicochemical model of fentanyl transdermal system*. *Journal of Pain and Symptom Management*, 1992. **7**(3, Supplement 1): p. S17-S26.
8. Swanson, J., Gupta, S., Guinta, D., Flynn, D., Agler, D., Lerner, M., Williams, L., Shoulson, I., Wigal, S., *Acute tolerance to methylphenidate in the treatment of attention deficit hyperactivity disorder in children*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 1999. **66**(3): p. 295-305.
9. FDA Web. <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>
10. Zhu, G.Z., Mallery, S.R., Schwendeman, S.P., *Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly (lactide-co-glycolide)*. *Nature Biotechnology*, 2000. **18**(1): p. 52-57.
11. Zhu, G.Z., Schwendeman, S.P., *Stabilization of proteins encapsulated in cylindrical poly(lactide-co-glycolide) implants: Mechanism of stabilization by basic additives*. *Pharmaceutical Research*, 2000. **17**(3): p. 351-357.
12. Hrubý, M., Konák, C., Ulbrich, K., *Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin*. *Journal of Controlled Release*, 2005. **103**(1): p. 137-148.
13. Duncan, R., *Polymer conjugates as anticancer nanomedicines*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(9): p. 688-701.
14. Torchilin, V.P., *Multifunctional nanocarriers*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006. **58**(14): p. 1532-1555.
15. Ho, Y.-P., Chen, H.H., Leong, K.W., Wang, T.-H., *Evaluating the intracellular stability and unpacking of DNA nanocomplexes by quantum dots-FRET*. *Journal of Controlled Release*, 2006. **116**(1): p. 83-89.

16. Michalet, X., Pinaud, F.F., Bentolila, L.A., Tsay, J.M., Doose, S., Li, J.J., Sundaresan, G., Wu, A.M., Gambhir, S.S., Weiss, S., *Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics*. Science, 2005. **307**(5709): p. 538-544.
17. Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
18. Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., *A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification - the correlation of in-vitro drug product dissolution and in-vivo bioavailability*. Pharmaceutical Research, 1995. **12**(3): p. 413-420.
19. Dressman, J., Butler J., Hempenstall J., Reppas C., *The BCS: where do we go from here?* Pharmaceutical Technology, 2001. **25**: p. 68-76.
20. Buhler, V., Filges, U., Schneider, T., *Stabilized polyvinylpyrrolidone formulation*. 2003, BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen, Germany.
21. Weuts, I., Kempen, D., Decorte, A., Verreck, G., Peeters, J., Brewster, M., Van den Mooter, G., *Physical stability of the amorphous state of loperamide and two fragment molecules in solid dispersions with the polymers PVP-K30 and PVP-VA64*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2005. **25**(2-3): p. 313-320.
22. Duarte, A.R.C., Costa, M.S., Simplicio, A.L., Cardoso, M.M., Duarte, C.M.M., *Preparation of controlled release microspheres using supercritical fluid technology for delivery of anti-inflammatory drugs*. International Journal of Pharmaceutics, 2006. **308**(1-2): p. 168-174.
23. Devallencourt, C., Marais, S., Saiter, J. M., Labbe, M., Metayer, M., *Study of transport of small molecules through ethylene-co-vinyl acetate copolymers films. Part A: Water molecules*. Polymer Testing, 2002. **21**(3): p. 253-262.
24. Marais, S., Saiter, J.M., Davallencourt, C., Nguyen, Q.T., Metayer, M., *Study of transport of small molecules through ethylene-co-vinyl acetate copolymers films. Part B: CO₂ and O₂ gases*. Polymer Testing, 2002. **21**(4): p. 425-431.
25. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Weller, P.J., *Handbook of pharmaceutical excipients, 4th edition*. 2003, London: Pharmaceutical Press.
26. Middleton, J.C., Tipton, A.J., *Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices*. Biomaterials, 2000. **21**(23): p. 2335-2346.
27. Astete, C.E., Sabliov, C.M., *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**: p. 247-289.
28. Gopala Krishna, A., *Influence of viscosity on wax settling and refining loss in rice bran oil*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 1993. **70**(9): p. 895-898.
29. Ogunniyi, D.S., *Castor oil: vital industrial raw material*. Bioresource Technology, 2006. **97**(9): p. 1086-1091.

30. Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., *Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(6): p. 734-746.
31. Perrut, M., Clavier, J.Y., *Supercritical fluid formulation: Process choice and scale-up*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2003. **42**(25): p. 6375-6383.
32. Span, R., Wagner, W., *A new equation of state for carbon dioxide covering the fluid region from the triple-point temperature to 1100 K at pressures up to 800 MPa*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1996. **25**(6): p. 1509-1596.
33. Clifford, T., *Fundamentals of Supercritical Fluids*. 1999, New York: Oxford University Press.
34. Guney, O., Akgerman, A., *Solubilities of 5-fluorouracil and β -estradiol in supercritical carbon dioxide*. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 2000. **45**(6): p. 1049-1052.
35. Burgos-Solórzano, G.I., Brennecke, J.F., Stadtherr, M.A., *Solubility measurements and modeling of molecules of biological and pharmaceutical interest with supercritical CO₂*. *Fluid Phase Equilibria*, 2004. **220**(1): p. 55-67.
36. Macnaughton, S.J., Kikic, I., Foster, N.R., Alessi, P., Cortesi, A., Colombo, I., *Solubility of Anti-Inflammatory Drugs in Supercritical Carbon Dioxide*. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1996. **41**(5): p. 1083-1086.
37. Ting, S.S.T., Tomasko, D.L., Foster, N.R., Macnaughton, S.J., *Solubility of naproxen in supercritical carbon dioxide with and without cosolvents*. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 1993. **32**(7): p. 1471-1481.
38. Lopez-Periago, A., Argemi, A., Andanson, J.M., Fernandez, V., Garcia-Gonzalez, C.A., Kazarian, S.G., Saurina, J., Domingo, C., *Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug-matrix interactions*. *Journal of Supercritical Fluids*, 2009. **48**(1): p. 56-63.
39. Byrappa, K., Ohara, S., Adschiri, T., *Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology - towards biomedical applications*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2008. **60**(3): p. 299-327.
40. Meure, L., Foster, N., Dehghani, F., *Conventional and Dense Gas Techniques for the Production of Liposomes: A Review*. *AAPS PharmSciTech*, 2008. **9**(3): p. 798-809.
41. Ashraf-Khorassani, M., Taylor, L.T., Waterman, K.C., Narayan, P., Brannegan, D.R., Reid, G.L., *Purification of Pharmaceutical Excipients with Supercritical Fluid Extraction*. *Pharmaceutical Development and Technology*, 2005. **10**(4): p. 507-516.
42. Pasquali, I., Bettini, R., *Are pharmaceuticals really going supercritical?* *International Journal of Pharmaceutics*, 2008. **364**(2): p. 176-187.
43. Emad, L.I., *Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: An overview*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2007. **96**(7): p. 1659-1676.

44. Jung, J., Perrut, M., *Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey*. Journal of Supercritical Fluids, 2001. **20**(3): p. 179-219.
45. Knez, Z., *High pressure process technology - Quo vadis?* Chemical Engineering Research & Design, 2004. **82**(A12): p. 1541-1548.
46. Kawashima, A., Watanabe, S., Iwakiri, R., Honda, K., *Removal of dioxins and dioxin-like PCBs from fish oil by countercurrent supercritical CO₂ extraction and activated carbon treatment*. Chemosphere, 2009. **75**(6): p. 788-794.
47. Winters, M.A., Frankel, D.Z., Debenedetti, P.G., Carey, J., Devaney, M., Przybycien, T.M., *Protein purification with vapor-phase carbon dioxide*. Biotechnology and Bioengineering, 1999. **62**(3): p. 247-258.
48. Majewski, W., Valery, E., Ludemann-Hombourger, O., *Principle and Applications of Supercritical Fluid Chromatography*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2005. **28**(7): p. 1233 - 1252.
49. Lora, M., Kikic, I., *Polymer processing with supercritical fluids: An overview*. Separation and Purification Methods, 1999. **28**(2): p. 179-220.
50. Caliceti, P., Salmaso, S., Elvassore, N., Bertucco, A., *Effective protein release from PEG/PLA nano-particles produced by compressed gas anti-solvent precipitation techniques*. Journal of Controlled Release, 2004. **94**(1): p. 195-205.
51. Daintree, L.S., Kordikowski, A., York, P., *Separation processes for organic molecules using SCF Technologies*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(3): p. 351-372.
52. Salmaso, S., Bersani, S., Elvassore, N., Bertucco, A., Caliceti, P., *Biopharmaceutical characterisation of insulin and recombinant human growth hormone loaded lipid submicron particles produced by supercritical gas micro-atomisation*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **379**(1): p. 51-58.
53. Salmaso, S., Elvassore, N., Bertucco, A., Caliceti, P., *Production of solid lipid submicron particles for protein delivery using a novel supercritical gas-assisted melting atomization process*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(2): p. 640-650.
54. Chu, J., Li, G., Row, K.H., Kim, H., Lee, Y.-W., *Preparation of ceftioxime proxetil fine particles using supercritical fluids*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **369**(1-2): p. 85-91.
55. Lee, L.Y., Wang, C.H., Smith, K.A., *Supercritical antisolvent production of biodegradable micro-and nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel*. Journal of Controlled Release, 2008. **125**(2): p. 96-106.
56. Barrett, A., Dehghani, F., Foster, N., *Increasing the Dissolution Rate of Itraconazole Processed by Gas Antisolvent Techniques using Polyethylene Glycol as a Carrier*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(6): p. 1274-1289.

57. Chingunpitak, J., Puttipipatkachorn, S., Tozuka, Y., Moribe, K., Yamamoto, K., *Micronization of Dihydroartemisinin by Rapid Expansion of Supercritical Solutions*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2008. **34**(6): p. 609-617.
58. Hong, H., Suo, Q., Li, F., Wei, X., Zhang, J., *Precipitation and Characterization of Chelerythrine Microparticles by the Supercritical Antisolvent Process*. Chemical Engineering & Technology, 2008. **31**(7): p. 1051-1055.
59. Wu, K., Li, J., Wang, W., Winstead, D.A., *Formation and characterization of solid dispersions of piroxicam and polyvinylpyrrolidone using spray drying and precipitation with compressed antisolvent*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **98**(7): p. 2422-2431.
60. Kim, Y., Sioutas, C., Shing, K., *Influence of Stabilizers on the Physicochemical Characteristics of Inhaled Insulin Powders Produced by Supercritical Antisolvent Process*. Pharmaceutical Research, 2009. **26**(1): p. 61-71.
61. Hassan, H.A., Al-Marzouqi, A.H., Jobe, B., Hamza, A.A., Ramadan, G.A., *Enhancement of dissolution amount and in vivo bioavailability of itraconazole by complexation with β -cyclodextrin using supercritical carbon dioxide*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007. **45**(2): p. 243-250.
62. Al-Marzouqi, A.H., Elwy, H.M., Shehadi, I., Adem, A., *Physicochemical properties of antifungal drug-cyclodextrin complexes prepared by supercritical carbon dioxide and by conventional techniques*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2009. **49**(2): p. 227-233.
63. Semalty, A., Semalty, M., Rawat, B.S., Singh, D., Rawat, M.S.M., *Pharmacosomes: the lipid-based new drug delivery system*. Expert Opinion on Drug Delivery, 2009. **6**(6): p. 599-612.
64. Li, Y., Yang, D.-J., Chen, S.-L., Chen, S.-B., Chan, A., *Comparative Physicochemical Characterization of Phospholipids Complex of Puerarin Formulated by Conventional and Supercritical Methods*. Pharmaceutical Research, 2008. **25**(3): p. 563-577.
65. Dal-Re Saavedra, M.A., Vardulaki Opperman, A., *Real farmacopea española*. 2005, 2005, Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios: Ministerio de la Presidencia. BOE, 2005.
66. Franz, T.J., *Percutaneous absorption. On the relevance of in vitro data*. Journal of Investigative Dermatology, 1975. **64**(3): p. 190-195.
67. Siepmann, J., Kranz, H., Bodmeier, R., Peppas, N.A., *HPMC-Matrices for Controlled Drug Delivery: A New Model Combining Diffusion, Swelling, and Dissolution Mechanisms and Predicting the Release Kinetics*. Pharmaceutical Research, 1999. **16**(11): p. 1748-1756.
68. Siepmann, J., Podual, K., Sriwongjanya, M., Peppas, N.A., Bodmeier, R., *A new model describing the swelling and drug release kinetics from hydroxypropyl methylcellulose tablets*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1999. **88**(1): p. 65-72.

69. Siepmann, J., Peppas, N.A., *Hydrophilic Matrices for Controlled Drug Delivery: An Improved Mathematical Model to Predict the Resulting Drug Release Kinetics (the "sequential Layer" Model)*. Pharmaceutical Research, 2000. **17**(10): p. 1290-1298.
70. Siepmann, J., Peppas, N.A., *Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **48**(2-3): p. 139-157.
71. Siepmann, J., Peppas, N.A., *Mathematical modeling of controlled drug delivery*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **48**(2-3): p. 137-138.
72. Siepmann, J., Streubel, A., Peppas, N.A., *Understanding and Predicting Drug Delivery from Hydrophilic Matrix Tablets Using the "Sequential Layer" Model*. Pharmaceutical Research, 2002. **19**(3): p. 306-314.
73. Korsmeyer, R.W., Gurny, R., Doelker, E., Buri, P., Peppas, N.A., *Mechanisms of potassium chloride release from compressed, hydrophilic, polymeric matrices: Effect of entrapped air*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1983. **72**(10): p. 1189-1191.
74. Ford, J.L., Mitchell, K., Rowe, P., Armstrong, D.J., Elliott, P.N.C., Rostron, C., Hogan, J.E., *Mathematical modelling of drug release from hydroxypropylmethylcellulose matrices: Effect of temperature*. International Journal of Pharmaceutics, 1991. **71**(1-2): p. 95-104.
75. Bajwa, G.S., Hoebler, K., Sammon, C., Timmins, P., Melia, C.D., *Microstructural imaging of early gel layer formation in HPMC matrices*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2006. **95**(10): p. 2145-2157.
76. Higuchi, W.I., *Analysis of data on medicament release from ointments*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1962. **51**(8): p. 802-804.
77. Costa, P., Sousa Lobo, J.M., *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001. **13**(2): p. 123-133.
78. Qvist, M.H., Hoeck, U., Kreilgaard, B., Madsen, F., Frokjaer, S., *Release of chemical permeation enhancers from drug-in-adhesive transdermal patches*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **231**(2): p. 253-263.
79. Ricci, E.J., Lunardi, L.O., Nanclares, D.M.A., Marchetti, J.M., *Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **288**(2): p. 235-244.
80. Clas, S.D., Dalton, C.R., Hancock, B.C., *Differential scanning calorimetry: applications in drug development*. Pharmaceutical Science & Technology Today, 1999. **2**(8): p. 311-320.
81. Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., de Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J., ed. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*. ed. Elsevier. 1997: Amsterdam.

82. Braiuca, P., Ebert, C., Basso, A., Linda, P., Gardossi, L., *Computational methods to rationalize experimental strategies in biocatalysis*. Trends in Biotechnology, 2006. **24**(9): p. 419-425.
83. McKay, B., Hoogenraad, M., Damen, E.W.P., Smith, A.A., *Advances in multivariate analysis in pharmaceutical process development*. Current Opinion in Drug Discovery & Development, 2003. **6**(6): p. 966-977.
84. Chiang, L.H., Colegrove, L.F., *Industrial implementation of on-line multivariate quality control*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2007. **88**(2): p. 143-153.
85. Tauler, R., *Anàlisi de mescles mitjançant resolució multivariant de corbes*. 1997, Barcelona: Institut d'Estudis Catalans. 171.
86. Maeder, M., Neuhold, Y., ed. *Practical Data Analysis in Chemistry*. ed. Elsevier. 2007: Amsterdam.
87. Tauler, R., Smilde, A., Kowalski, B., *Selectivity, local rank, 3-way data-analysis and ambiguity in multivariate curve resolution*. Journal of Chemometrics, 1995. **9**(1): p. 31-58.
88. Windig, W., Guilment, J., *Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*. Analytical Chemistry, 1991. **63**(14): p. 1425-1432.
89. Maeder, M., *Evolving Factor-Analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks*. Analytical Chemistry, 1987. **59**(3): p. 527-530.
90. Tauler, R., Kowalski, B., Fleming, S., *Multivariate curve resolution applied to spectral data from multiple runs and industrial-process*. Analytical Chemistry, 1993. **65**(15): p. 2040-2047.
91. Saurina, J., Hernandez-Cassou, S., Tauler, R., Izquierdo-Ridorsa, A., *Multivariate resolution of rank-deficient spectrophotometric data from first-order kinetic decomposition reactions*. Journal of Chemometrics, 1998. **12**(3): p. 183-203.
92. Morgan, E., *Chemometrics: experimental design*. Published on behalf of ACOL. Vol. XVIII. 1991, London: Wiley. 275.

CAPÍTOL 3

Part experimental

En aquest capítol es dóna detall dels reactius, la instrumentació i els procediments utilitzats en els estudis que es desenvolupen en els següents capítols.

3.1. Productes químics

Reactius generals i solvents

Acetat d'amoni, Panreac, reactiu analític.

Acetat de sodi, Merck, reactiu analític.

Àcid acètic del 96 % w/w, Panreac, reactiu analític.

Àcid bòric, J.T. Baker, reactiu analític.

Àcid clorhídric del 37 % w/w, Merck, reactiu analític.

Àcid fòrmic, Merck, reactiu analític.

Amoníac del 25 % w/w, Panreac, reactiu analític.

Dihidrogenfosfat de potassi, Panreac, reactiu analític.

Dihidrogenfosfat de sodi, Panreac, reactiu analític.

Formiat d'amoni, Panreac, reactiu analític.

Hidrogencarbonat de sodi, Merck, reactiu analític.

Hidrogenfosfat de potassi, Panreac, reactiu analític.

Hidrogenfosfat de sodi, Panreac, reactiu analític.

Hidròxid de sodi, Merck, reactiu analític.

Tris(hidroxi)metilaminometà (TRIS), Merck, reactiu analític.

Acetona, Fluka, reactiu de qualitat HPLC.

Acetonitril, Merck, reactiu de qualitat HPLC.

Clorur de metilè, Merck, reactiu de qualitat HPLC.

Dimetilsulfòxid, Merck, reactiu de qualitat HPLC.

Etanol, Merck, reactiu de qualitat HPLC.

Metanol, Merck, reactiu de qualitat HPLC.

Fàrmacs

Els següents fàrmacs van ser amablement proporcionats per Palau Pharma (Barcelona, Espanya):

Àcid 2-acetoxi-4-trifluorometilbenzoic o triflusal (TRF).

Àcid 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoic (HTB).

La resta de fàrmacs van ser adquirits comercialment:

- 5-azacitidina (5-AZA), Sigma, reactiu analític.
- 5-fluorouracil (5-FU), Aldrich, reactiu analític.
- 6-tioguanina, Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Cafeïna (CAF), Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Didanosina, Fluka, reactiu analític.
- Dopamina, Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Glutatió (GSH), Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Ketoprofèn (KET), Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Naftoquinona-4-sulfonat de sodi, Carlo Ebra, reactiu analític.
- Naproxèn (NAP), Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Pirocatecol, Sigma Aldrich, reactiu analític.
- Tiramina, Fluka, reactiu analític.
- Tirosina, Sigma Aldrich, reactiu analític.

Polímers

- Àcid poli(L-làctic) en boles, massa molar ~ 100 kDa, Biovalley.
- Àcid poli(làctic-*co*-glicòlic) en proporció 50:50, massa molar ~ 60 kDa, Biovalley.
- Etilè vinil acetat amb un 70 % w/w d'acetat, Sigma.
- Eudragit[®] E100 en boles, massa molar ~ 150 kDa, Degussa Röhm.
- Poli(metacrilat de metil) (PMMA_{GF}) en barra, massa molar ~ 300 kDa, Goodfellow.
- Poli(metacrilat de metil) (PMMA_{BP}) en boles, massa molar ~ 300 kDa, Bonar Polymers.
- Polivinilpirrolidona-*co*-vinilacetat 64, massa molar $\sim 45 - 70$ kDa, Basf.
- Etilcel·lulosa amb un grau de viscositat de 20 cP, Keyser & Mackay.

Altres productes químics

- Monoestearat de glicerol o Lumulse[®], proporcionat per Lambert Technologies.
- Oli de ricí hidrogenat o Cutina[®] HR, proporcionat per José M. Vaz Pereira S.A.
- Òxid de titani (TiO₂), Degussa.
- Partícules de TiO₂ modificades amb octilsilà de Degussa (TiO₂-cm).
- Partícules de TiO₂ superficialment tractades amb octiltriethylsiloxà (Me(Me₂)₇Si(OEt)₃), Fluka, preparades al ICMAB-CSIC pel C. García-González.
- Rodamina, Sigma Aldrich, reactiu analític.

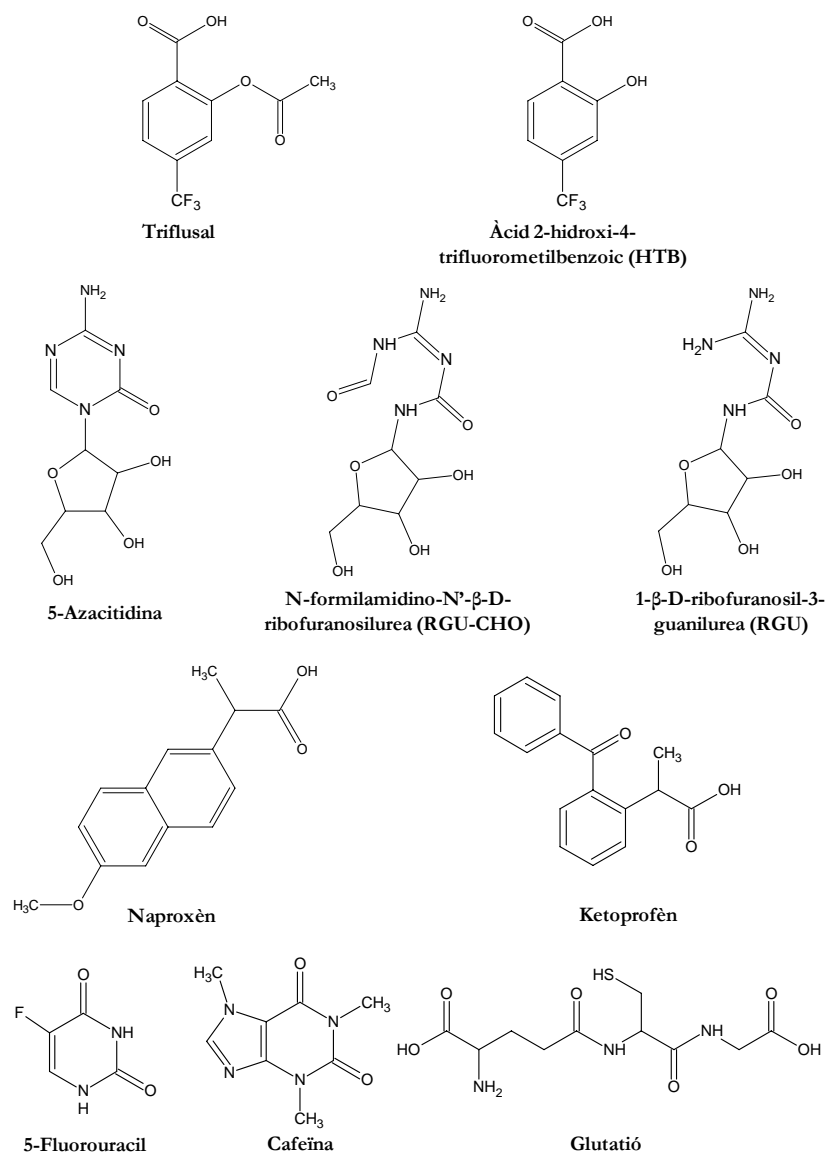


Figura 3.1. Estructura dels fàrmacs model estudiats i els productes de degradació.

3.2. Mètodes d'anàlisi de les mostres

3.2.1. Anàlisi calorimètrica diferencial

Es va usar un calorímetre diferencial d'escombrat (DSC-822e/400 Mettler Toledo) per tal de mesurar les temperatures característiques dels sistemes d'alliberament estudiats. Aquestes temperatures són la temperatura de fusió (T_m) i la de transició vítria (T_g). Els termogrames es van obtenir escalfant les mostres en un gresol estàndard a una velocitat de $10\text{ }^\circ\text{C} \times \text{min}^{-1}$ entre un interval de 30 a $250\text{ }^\circ\text{C}$. El cabal de N_2 es va fixar a $50\text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Normalment la quantitat de mostra que es pesa per a l'anàlisi és de 2 a 3 mg aproximadament.

3.2.2. Microscòpia electrònica de rastreig

Per tal d'estudiar a fons la morfologia de les mostres i comprovar l'eficiència dels recobriments es van realitzar fotografies amb un microscopi electrònic de rastreig Hitachi H-4100FE. Abans de l'anàlisi, les mostres es van sotmetre a un tractament de recobriments amb or amb un aparell Jeol JFC 1100 per tal de fer-les elèctricament conductores.

3.2.3. Microscòpia confocal de fluorescència

La microscòpia confocal de fluorescència és una tècnica molt útil que en la nostra recerca ens va servir per avaluar la morfologia del material polimèric després d'estar en contacte amb el CO₂. Mitjançant l'ús d'aquesta tècnica s'obtenen imatges en 2 dimensions a diverses profunditats de la mostra. Així doncs, ens va permetre visualitzar diferents seccions transversals de la mostra i detectar si el fàrmac havia penetrat en la matriu durant el procés d'impregnació. L'única condició necessària per dur a terme aquests estudis és que les mostres presentin un cert gruix i que siguin fluorescents. Es va utilitzar un microscopi confocal amb detecció espectral Leica SPII, amb el qual es pot treballar alhora en mode de reflectància i fluorescència. L'objectiu utilitzat va ser un 10×/ 0.3 N.A. HCPL FLUOTAR lens (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). L'anàlit va ser excitat amb un làser a 351 i 364 nm i les intensitats de reflectància i fluorescència es van enregistrar entre 400 i 800 nm. Les seccions transversals es van agafar cada 2,4 µm. Les imatges es van processar amb el programa ImageJ (NIH Image; www.rsb.info.nih.gov/ij/) i el software de Photoshop 7.0 (Adobe Corp.).

3.2.4. Espectrofotometria ultraviolada visible

Instrumentació i accessoris

Depenent dels estudis realitzats s'han utilitzat 2 espectrofotòmetres UV-vis:

- Espectrofotòmetre Perkin-Elmer λ-19.
- Detector de díodes en sèrie Hewlett Packard HP8452.

A continuació es detalla un llistat de materials i accessoris utilitzats en aquests estudis:

- Sistema termòstat Agilent 89090A.
- Cubeta Hellma QS de quars adaptada per a flux continu: volum intern = 60 µl, camí òptic = 10 mm.

- pH-metre Eutech Instruments model CyberScan 2500, equipat amb un elèctrode de vidre combinat ORION 9103SC amb un de referència de Ag/AgCl.
- Agitador magnètic SBS A-163 i nucli magnètic.
- Bombes peristàltiques multicanal Watson-Marlow 505 DU.
- Tubs estàndards de bombeig Tygon.

Procediments

3.2.4.1. Sistema amb parada de flux per al seguiment de processos cinètics

Per a la realització dels estudis cinètics d'estabilitat de fàrmacs es va utilitzar el sistema en flux continu que es mostra en la Figura 3.2. El sistema està format per dos canals per tal de bombejar l'anàlit i la solució tampó mitjançant una bomba peristàltica. El procediment experimental consisteix en dues etapes consecutives. En primer lloc, es fan circular les solucions de l'anàlit i el tampó a través del sistema a un cabal de $0,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Aquestes dues solucions convergeixen i s'homogeneïtzen en un petit reactor de mescla ($57 \text{ cm} \times 0,07 \text{ cm}$ d.i.) connectat amb la cel·la de flux continu termostatitzada a la temperatura desitjada. En segon lloc, es para la bomba peristàltica un cop s'ha arribat a l'estat estacionari a la cel·la de detecció. És aleshores quan se segueix espectrofotomètricament el procés cinètic, enregistrant els espectres (de 200 a 300 nm) durant intervals de temps variable segons la velocitat de descomposició de l'anàlit. Les solucions amortidores utilitzades van ser: HCl 0,01 M; $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ 0,01 M; $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 0,01 M; $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{BO}_2^-$ 0,01 M i NaOH 0,1 M.

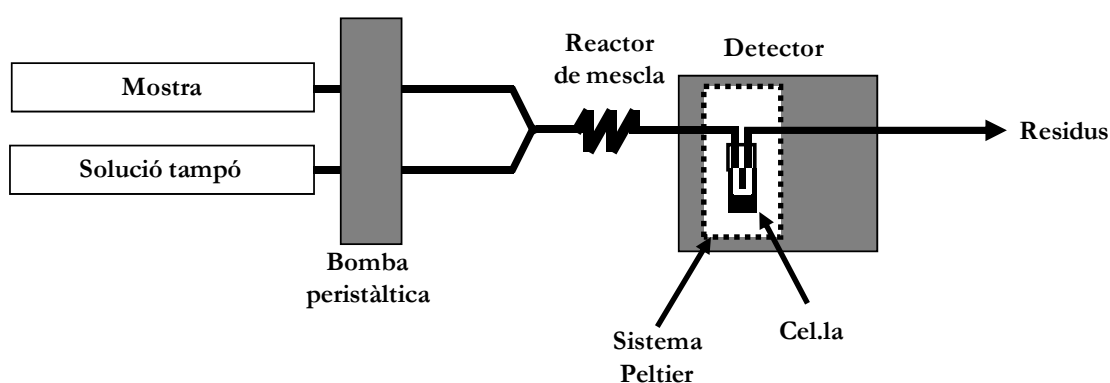


Figura 3.2. Esquema del sistema en flux continu amb parada de flux.

Cal remarcar que en fer els experiments a pH bàsics s'observava una descomposició de la mostra molt ràpida. Per tal de minimitzar la degradació de l'anàlit durant l'homogeneïtzació de les solucions es va treure el reactor de mescla i es va augmentar el

cabal fins a $2 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. En els estudis a pH bàsics els espectres es van enregistrar a intervals de temps menors.

3.2.4.2. Sistema en flux continu per a estudis àcid-base

Per a l'estudi d'equilibris àcid-base es va emprar el sistema que es mostra en la Figura 3.3. El sistema en flux continu està format per tres canals mitjançant els quals es bombeja l'anàlit, la solució àcida i la bàsica, i les dues bombes peristàtiques. La solució valorant es forma en línia en un reactor de mescla a partir de la variació de la proporció de les solucions àcida i bàsica (vegeu la composició a la Figura 3.3). A continuació, l'anàlit es mescla amb la solució valorant en un reactor de reacció, de manera que el temps de contacte entre l'anàlit i la solució valorant és de només 9 s. Després de cada modificació del cabal de la bomba 2, s'enregistra el corresponent espectre i al mateix temps es recull un petit volum de la solució resultant a la sortida del detector per tal de mesurar-ne el pH.

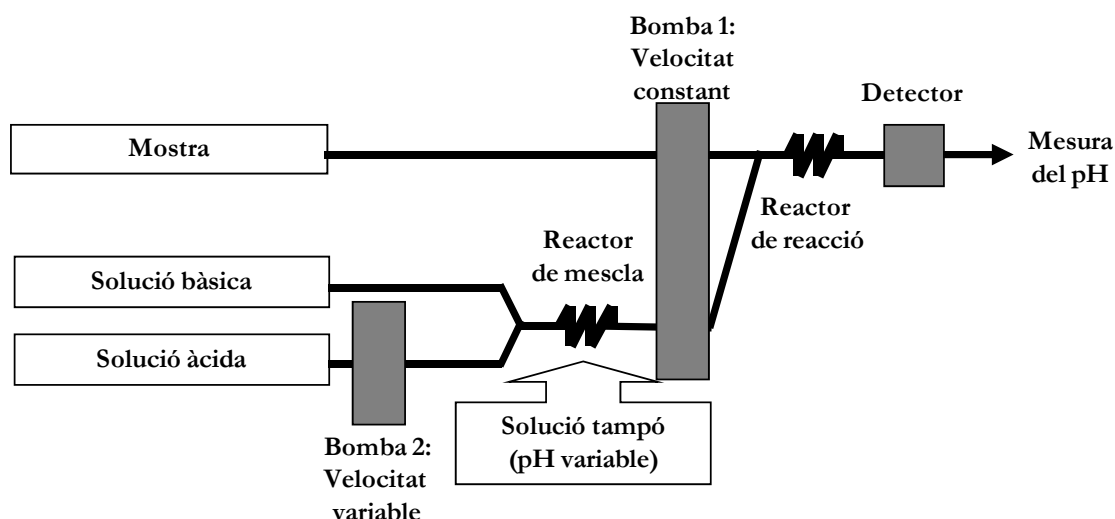


Figura 3.3. Esquema del sistema en flux continu per a la caracterització de compostos inestables.

Solució àcida: H_3PO_4 0,05 M, CH_3COOH 0,05 M, H_3BO_3 0,05 M.

Solució bàsica: PO_4^{3-} 0,05 M, CH_3COO^- 0,05 M, BO_2^- 0,05 M.

Cabal de l'anàlit: $1,15 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Cabal del valorant: $1,15 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Cabal de la solució d'àcids: de $1,9$ a $0,0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Cabal de la solució de bases: de $0,4$ a $2,3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$.

Reactor de mescla: $200 \text{ cm} \times 0,07 \text{ cm d.i.}$

Reactor de reacció: $35 \text{ cm} \times 0,11 \text{ cm d.i.}$

El cabal de la bomba 1, on es transporten l'anàlit i les solucions valorants, es va mantenir constant a $2,3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. En canvi, el cabal de les solucions amortidores es modifica successivament durant la valoració des de $1,9$ a $0,0 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ i des de $0,4$ a $2,3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ pel canal de la solució d'àcids i el de bases, respectivament.

Tots els espectres enregistrats en els diferents estudis s'analitzen amb fulls de càlcul o amb programes de tractament numèric en entorn MATLAB.

3.2.4.3. Sistema en flux continu per al seguiment de processos d'alliberament de fàrmacs

Per tal de realitzar les mesures espectrofotomètriques de processos d'alliberament es va utilitzar un sistema en flux continu l'esquema del qual es mostra en la Figura 3.4. La solució d'anàlit es bombeja contínuament a través d'una bomba peristàtica a un cabal de $3 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. D'aquesta manera es pot seguir espectrofotomètricament l'evolució de la concentració del fàrmac en funció del temps. El canal de sortida del recipient on té lloc l'alliberament està dotat d'un filtre de llana de vidre per tal de retenir les partícules no dissoltes. A més a més, es pot agafar una alíquota de la solució de la mostra i injectar-la a un sistema cromatogràfic (apartat 3.2.5, a) que també permet fer el seguiment de l'alliberament i detectar la formació de productes de degradació.

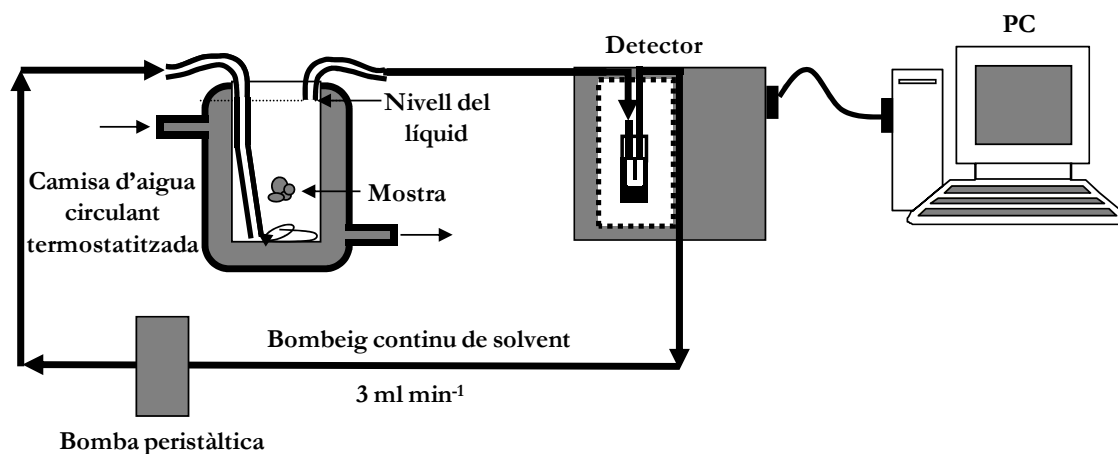


Figura 3.4. Esquema del sistema en flux continu per a la caracterització de processos d'alliberament de fàrmacs.

3.2.4.4. Sistema en flux continu per al seguiment de processos d'alliberament de fàrmacs inestables

Per tal de fer el seguiment de processos d'alliberament de fàrmacs inestables en condicions dinàmiques es va dissenyar un sistema en flux continu que permet evitar processos de degradació (Figura 3.5). En aquests sistemes s'intenta simular les condicions

fisiològiques del cos humà mitjançant la renovació constant de les solucions en contacte amb el producte. Així doncs, les solucions d'alliberament a pH 2,0 o 7,4 corresponents als medis gàstric o plasmàtic, respectivament, es bombegen contínuament a través del recipient d'alliberament a un cabal d'1 ml \times min⁻¹. El volum del líquid del vas es fixa a 4 ml i a una temperatura de 37 °C. En aquestes circumstàncies, el temps de residència dins del vas és suficientment curt per minimitzar els processos de descomposició que tenien lloc en el medi d'alliberament. El canal de sortida del vas de flux continu està proveït d'un suport que conté llana de vidre per tal d'evitar el pas de partícules sòlides que no s'hagin dissolt. La solució emergent del sistema s'analitza per cromatografia de líquids amb el mètode descrit en el següent apartat 3.2.5, c.

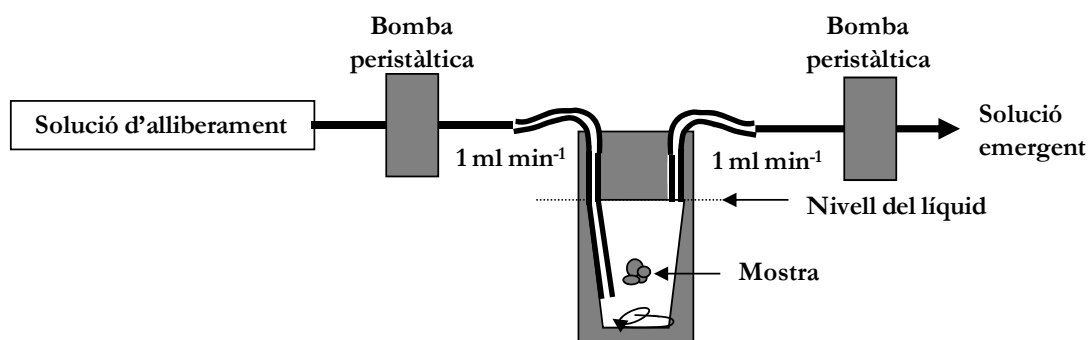


Figura 3.5. Esquema del sistema en flux continu per al seguiment de processos d'alliberament en condicions dinàmiques.

3.2.5. Cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) amb detecció UV i fluorescència

Instrumentació

- Cromatògraf de líquids Agilent 1100 Series equipat amb una bomba quaternària G1311A, desgasificador en línia G1397A, detector de díodes en sèrie G1315B amb una cubeta de flux de 13 μ l i detector de fluorescència G1321A. Vàlvula d'injecció Rheodyne 7725(i) de sis ports amb un helicoide de 20 μ l de volum.
- Columna cromatogràfica Phenomenex Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 mm \times 4,6 mm d.i., 4 μ m de diàmetre de partícula, 80 Å) amb una precolumna C₁₈ (4 mm \times 3 mm d.i.) de la mateixa casa comercial.
- Columna cromatogràfica Phenomenex Gemini C₁₈ (150 mm \times 4,6 mm d.i., 5 μ m de diàmetre de partícula, 110 Å) amb una precolumna C₁₈ (4 mm \times 3 mm d.i.) de la mateixa casa comercial.

- pH-metre Eutech Instruments model Cyberscan 2500, equipat amb un elèctrode de vidre combinat amb un de referència de Ag/AgCl, per a l'ajust del pH de les fases mòbils i les solucions.

Condicions experimentals

Es van desenvolupat diferents mètodes experimentals per a l'anàlisi dels diferents sistemes d'alliberament controlat. Tots ells es van dur a terme amb elució isocràtica a un cabal de $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ i amb un volum d'injecció de $20 \mu\text{l}$. A continuació es mostra un llistat amb els mètodes seleccionats per a cada mostra.

(a) Anàlisi del triflusal i el seu principal metabòlit (HTB).

Fase mòbil: 25 mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (pH = 5,00) + MeOH (40/60, V/V)

Columna: Synergi Hydro-RP C_{18} (150 mm \times 4,6 mm d.i.)

Longituds d'ona de detecció: 225, 234 i 280 nm.

(b) Anàlisi de la 5-azacitidina i els seus productes de degradació (mètode 1).

Fase mòbil: 100 mM $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COO}^-$ (pH = 5,25)

Columna: Synergi Hydro-RP C_{18} (150 mm \times 4,6 mm d.i.)

Longituds d'ona de detecció: 215, 225 i 250 nm.

(c) Anàlisi de la 5-azacitidina i els seus productes de degradació (mètode 2).

Fase mòbil: 20 mM TRIS (pH = 9,00) + MeOH (98/2, V/V)

Columna: Gemini C_{18} (150 mm \times 4,6 mm d.i.)

Longituds d'ona de detecció: 215, 225 i 250 nm.

(d) Anàlisi del naproxèn.

Fase mòbil: 10 mM $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ (pH = 3,20) + MeOH (20/80, V/V)

Columna: Synergi Hydro-RP C_{18} (150 mm \times 4,6 mm d.i.)

Longituds d'ona de detecció UV: 220, 270 i 330 nm.

Longituds d'ona de detecció per fluorescència: 270 nm (exc.) i 357 nm (em.)

(e) Anàlisi del ketoprofèn.

Fase mòbil: 10 mM $\text{HCOOH}/\text{HCOO}^-$ (pH = 3,20) + MeOH (30/70, V/V)

Columna: Synergi Hydro-RP C_{18} (150 mm \times 4,6 mm d.i.)

Longitud d'ona de detecció: 266 nm.

(f) Anàlisi de la cafeïna.

Fase mòbil: H₂O + MeOH (30/70, V/V)

Columna: Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 mm × 4,6 mm d.i.)

Longitud d'ona de detecció: 272 nm.

(g) Anàlisi del glutatió.

Fase mòbil: 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH = 3,20) + ACN (97/3, V/V)

Columna: Synergi Hydro-RP C₁₈ (150 mm × 4,6 mm d.i.)

Longitud d'ona de detecció: 210 nm.

3.3. Elaboració dels sistemes d'alliberament controlat

3.3.1. Equip d'impregnació en mode discontinu

L'equip d'alta pressió utilitzat en aquesta tesi per als experiments realitzats en mode *batch* es mostra en la Figura 3.6. Aquest està format bàsicament per tres parts: refrigeració, compressió i reacció.



Figura 3.6. Fotografia de l'equip experimental per a la impregnació de compostos.

Inicialment el CO₂ entra a dins l'equip (Figura 3.7) a la temperatura del laboratori i a continuació es liqua en un bany de polietilenglicol i aigua (Polyscience 9102). La bomba de xeringa usada té una capacitat de 240 ml (Thar Designs SP240) i s'utilitza per augmentar la pressió del CO₂ fins al valor experimental desitjat. Aleshores el reactor d'acer inoxidable (70 ml, Thar Design), que ha estat prèviament carregat amb els reactius, s'omple amb el CO₂ provinent de la bomba fins a arribar a la pressió desitjada. Durant aquest procés, la temperatura i l'agitació del reactor es mantenen fixes mitjançant unes resistències

elèctriques amb termòstat i un dispositiu que controla l'agitació, respectivament. A més a més, l'equip disposa de dues finestres de vidre de safir que permeten seguir el procés que té lloc dins del reactor. Al final de cada experiment, el sistema es descomprimeix lentament i es deixa refredar a l'aire fins a assolir la temperatura del laboratori.

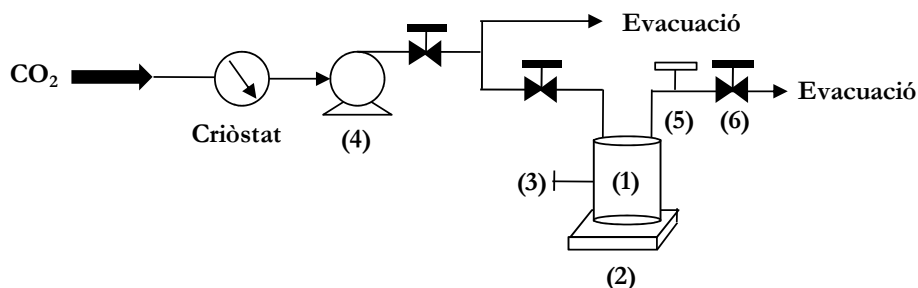


Figura 3.7. Esquema del sistema experimental d'impregnació de fàrmacs en mode discontinu. (1) Reactor d'alta pressió d'acer inoxidable, (2) agitador magnètic, (3) termoparell i resistències, (4) bomba de xeringa, (5) transductor de pressió i (6) vàlvula d'agulla.

Aquest equip es va utilitzar per preparar el sistema format pel triflusal impregnat en una matriu polimèrica de PMMA. Aquesta impregnació es va dur a terme a l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC). Normalment s'utilitza una tècnica o una altra depenent del fàrmac que es fa servir. Així doncs, aquest mètode és adient per a compostos de baixa polaritat solubles en CO_2 en estat supercrític. El triflusal té una estructura química semblant a l'àcid acetilsalicílic. L'única diferència estructural que presenta és el grup trifluorometil que afavoreix la interacció del triflusal amb el solvent. A conseqüència d'aquest grup es va observar que en les condicions de temperatura i pressió de treball el triflusal presentava una solubilitat en CO_2 100 vegades més gran que la del propi àcid acetilsalicílic.

3.3.2. Equip de formació de partícules basat en la tècnica antisolvent

Els experiments en els quals es va utilitzar CO_2 supercrític com a antisolvent es van dur a terme en l'equip que es mostra en la Figura 3.8. El sistema experimental està format per una línia de subministrament de CO_2 , una línia per on s'allibera la solució, un reactor col·lector d'alta pressió d'acer inoxidable i una línia d'evacuació.

Inicialment el CO_2 es refreda utilitzant un criòstat (Haake) i després es pressuritza mitjançant tres bombes volumètriques hidràuliques en paral·lel (Lewa EK3). A continuació el fluid es comprimeix, s'escalfa i s'introdueix dins el reactor col·lector (Autoclave

Engineers), que té una capacitat de 500 ml. El reactor disposa de finestres de vidre de safir a tres nivells diferents per poder visualitzar el procés de precipitació. Aquest reactor s'escalfa mitjançant camises calefactores (Watlow) i la temperatura es controla utilitzant un termoparell. Un cop la temperatura i la pressió són estables, el líquid s'injecta a dins del reactor a través d'una bomba de doble pistó i un injector coaxial de polvorització (Lechler, 500 µm d.i.). Quan l'experiment ha finalitzat es recull el precipitat format al fons del reactor sobre un filtre de membrana, que es troba a la vegada sobre una frita d'acer inoxidable (ColoChrom, 2 µm de porositat). Abans de col·lectar el sòlid, es pot fer un procediment d'assecat fent passar un flux continu de CO₂ per tal d'eliminar el solvent orgànic. Al final de l'experiment el reactor d'alta pressió es descomprimeix lentament i es recull el material processat.

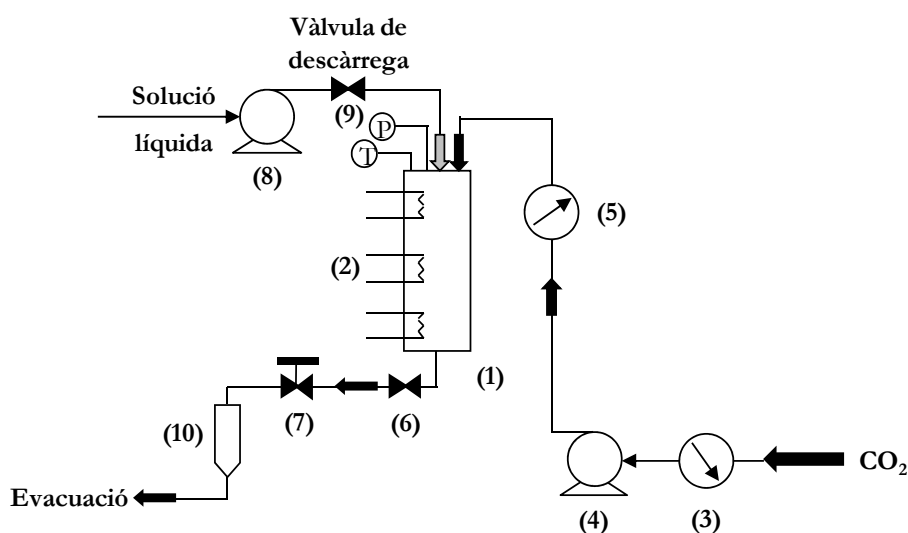


Figura 3.8. Esquema del sistema SAS. (1) Reactor d'alta pressió d'acer inoxidable, (2) camises calefactores (resistències), (3) criòstat, (4) bomba de pistons, (5) transductor de pressió, (6) vàlvula, (7) vàlvula dosificadora, (8) bomba de doble pistó, (9) vàlvula i (10) cicló.

Aquest equip es va fer servir per dur a terme el recobriment de la 5-azacitidina amb L-PLA. Els experiments es van realitzar en el Laboratori d'Enginyeria de Materials i d'Altes Pressions de París (LIMHP-CNRS). La tècnica es pot emprar quan el fàrmac és poc soluble en el CO₂, que actua com a antisolvent. La 5-azacitidina és un fàrmac molt polar amb poca afinitat química pel CO₂. Per tant, es va escollir aquesta tècnica com a alternativa a la impregnació.

3.3.3. Equip de generació de partícules a partir de solucions de gas saturades

Els experiments realitzats utilitzant el scCO_2 com a solut per a la generació de partícules sòlides es van realitzar en l'equip que es mostra a continuació (Figura 3.9). La unitat està formada bàsicament per una línia de subministrament de CO_2 , un reactor d'alta pressió, un reactor col·lector i una línia d'evacuació.

Primerament s'introdueix el CO_2 al reactor d'alta pressió (Parr Instrument) mitjançant una bomba de pistó (Haskel) fins a arribar a la pressió de treball. Aquest reactor té una capacitat de 500 ml i s'agita constantment. Prèviament s'han d'haver introduït els compostos que es volen processar. En segon lloc es comença a escalfar mitjançant una camisa tèrmica (Watlow), i es produeix la fusió de la mescla de sòlids i la solubilització parcial del scCO_2 amb la mescla fosa. Després d'una hora d'homogeneïtzació necessària per assolir l'equilibri de la mescla, el sistema es descomprimeix amb una vàlvula (Parker) i s'atomitza a través d'un injector cònic (Spraying Systems Co, 600 μm d.i.) cap al reactor col·lector de 10 l (Pirex). El canvi bruscat de pressió supercrítica a atmosfèrica produeix la sobresaturació del CO_2 a la mescla i una expansió ràpida del volum de CO_2 comprimit causa la solidificació de la mescla, que normalment precipita en forma de partícules amb mides micromètriques.

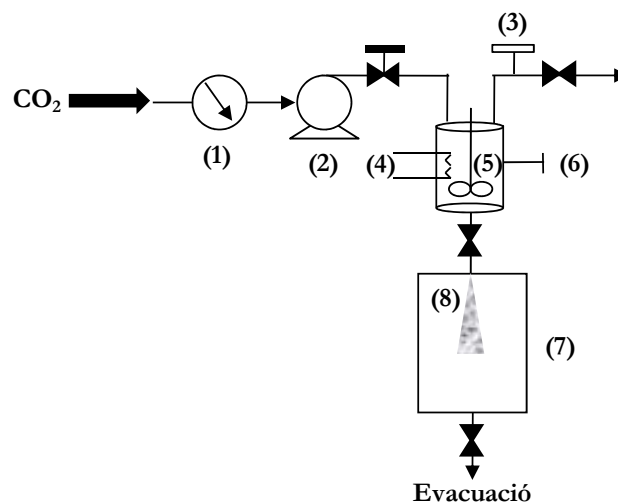


Figura 3.9. Esquema del sistema PGSS®. (1) Criòstat, (2) bomba de pistons, (3) transductor de pressió, (4) camises tèrmiques, (5) reactor d'alta pressió d'acer inoxidable, (6) termoparell, (7) reactor col·lector i (8) injector.

Aquest equip es va utilitzar per preparar el sistema format per les partícules de ketoprofèn en matriu lipídica. Aquest procediment de formació de partícules es va dur a terme a l'Institut de Biologia Experimental i Tecnològica i a l'Institut de Tecnologia Química i Biològica, ambdós a Portugal (IBET-ITQB). Aquest mètode permet la formació de partícules a partir d'una gran varietat de substàncies, amb l'avantatge que no és necessari que siguin solubles en el $scCO_2$. Es va escollir aquest mètode a causa de la complexitat de la matriu de base lípid (GMS i HCO) formada de partícules de TiO_2 i ketoprofèn. A més a més, el procés PGSS[®] és un mètode amb el qual es formen partícules en un sol pas i a temperatures de treball baixes.

3.3.4. Equip d'impregnació per a la preparació de pegats transdèrmics

Per tal de dur a terme el procés d'impregnació del principi actiu per a la preparació de pegats transdèrmics, es va utilitzar l'equip que es mostra en la Figura 3.10. El sistema està format per un reactor d'alta pressió d'acer inoxidable (Pressure Products Industries, Inc., Warminster, PA) i per una bomba de xeringa, (ISCO *Syringe pump* 500D, Lincoln, NE, US). Un cop la mostra (pegat polimèric més solució del fàrmac) s'ha introduït dins del reactor, es tanca hermèticament i s'escalfa amb un sistema *Peltier* fins a la temperatura experimental desitjada. Es necessiten un mínim d'uns 15 min per arribar a l'equilibri tèrmic. Quan s'assoleix l'equilibri tèrmic, s'omple la bomba amb CO_2 i aleshores es fa baixar el pistó per pressuritzar el sistema fins a arribar a la pressió de treball. La pressió i la temperatura es mantenen constants durant tot el procés experimental. En finalitzar el procés d'impregnació, el sistema es descomprimeix en uns 30 min obrint la clau de purga lentament.

En dur a terme aquest procés d'impregnació és molt important l'organització de la mostra dins el reactor. La matriu polimèrica es col·loca a sobre d'un film de tefló per tal d'evitar que es quedi enganxada al reactor. A continuació es diposita una alíquota de 1000 μ l de la solució amb el principi actiu. Una vegada finalitzat el procés, el pegat s'asseca a temperatura ambient i es guarda en una bossa de plàstic segellada fins a futures caracteritzacions.

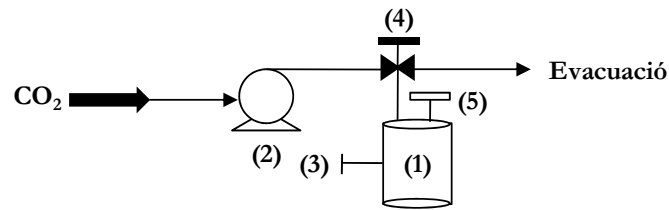


Figura 3.10. Esquema del sistema d'impregnació per a l'elaboració de pegats transdèrmics. (1) Reactor d'alta pressió d'acer inoxidable, (2) bomba de xeringa, (3) termoparell i resistències, (4) vàlvula de tres posicions, (5) transductor de pressió.

Aquest equip es va fer servir per dur a terme la impregnació de naproxèn en una matriu de EVA i Eudragit[®] E100. Els experiments es van realitzar al Grup de Fluids Supercrítics (The Ohio State University) als Estats Units d'Amèrica (USA). És molt semblant al primer equip, però en aquest cas el fàrmac es troba dissolt en un medi adient. Tot i trobar-se en forma líquida és soluble en CO₂, ja que és un compost de baixa polaritat.

CAPÍTOL 4

**Caracterització d'un sistema
d'alliberament controlat del fàrmac
triflusal mitjançant tècniques
espectroscòpiques i cromatogràfiques**

4.1. Introducció

Els sistemes d'alliberament controlat formats per un fàrmac dispers en una matriu polimèrica poden alliberar el principi actiu d'una manera predeterminada o bé en un lloc específic del cos [1]. En la majoria d'aplicacions, i per tal d'aconseguir que el preparat sigui efectiu terapèuticament, el fàrmac s'ha de trobar dispers en el polímer a nivell molecular. Si això no es compleix, el fàrmac es troba cristal·litzat en el polímer i podria comportar un alliberament descontrolat que influenciarà en la velocitat de dissolució d'aquest. En el cas de principis actius amb baixa solubilitat en aigua, un dels objectius del disseny de sistemes d'alliberament controlat és el de millorar les velocitats de dissolució a través de la dispersió del fàrmac en matrius polimèriques solubles en aigua. D'altra banda, els compostos solubles en aigua que presenten temps de semivida curts s'haurien d'impregnar en polímers hidrofòbics (per exemple, acrílics, quitina o etilcel·lulosa) per intentar alentir l'alliberament. Tanmateix, el recobriment dels principis actius pot minimitzar processos de degradació en el medi [2-4].

El triflusal és un fàrmac anàleg de l'àcid acetilsalicílic amb un grup CF_3 addicional, que es comercialitza amb el nom de Disgren[®] des de l'any 1981 [5, 6]. Ha estat classificat pel BCS com un fàrmac de classe 2, és a dir, com un àcid feble molt permeable però amb una solubilitat baixa en aigua. Alguns estudis ja han demostrat que quan el triflusal i el seu principal metabòlit s'alliberen mitjançant una matriu polimèrica, tant la incidència GI com altres efectes secundaris es redueixen notablement [7-10]. En aquests estudis el triflusal es troba conjugat a polímers iònics i hidròfils.

Aquests tipus de sistemes s'utilitzen especialment en cirurgia vascular (via d'administració cardiovascular). Quan es realitzen operacions per evitar la formació de coàguls, s'introdueixen xarxes de titani a l'interior de les artèries que s'expandeixen i fan que les artèries tornin al seu diàmetre inicial. Els malalts cardiovasculars crònics es tracten amb triflusal, entre d'altres fàrmacs, per evitar noves agregacions plaquetàries. Així doncs, la finalitat d'aquests sistemes és aconseguir retenir els fàrmacs en les xarxes polimèriques per tal que es produeixi el seu alliberament prolongat amb el temps. D'aquesta manera el malalt no s'ha d'estar medicant contínuament. La situació ideal seria, doncs, que l'alliberament es produís de manera constant i progressiva.

Un dels principals objectius d'aquest estudi va ser l'exploració de les possibilitats de l'ús del scCO_2 per processar fàrmacs amb polímers amorfs com el PMMA, que es va escollir com a polímer model i matriu per a dur a terme el procés d'impregnació. El PMMA

és un polímer acrílic hidrofòbic bioestable molt usat en el camp de la biomedicina com a implant transportador per a l'alliberament local sostingut d'antiinflamatoris [11, 12] o antibiòtics [13]. L'ús del $scCO_2$ representa una bona alternativa als problemes associats amb l'ús dels tradicionals solvents orgànics per a la preparació de compostos farmacèutics i biomaterials [14, 15].

Així doncs, el disseny d'aquests sistemes s'aconsegueix utilitzant un solvent per dissoldre i arrossegar el principi actiu a l'interior de la matriu polimèrica. Al mateix temps, aquest solvent infla el polímer facilitant la difusió del fàrmac i incrementant la quantitat de fàrmac impregnat. S'ha demostrat que els processos d'impregnació que utilitzen $scCO_2$ com a solvent són viables quan el compost és soluble en $scCO_2$ i el polímer té una baixa solubilitat, encara que pot ser inflat mitjançant $scCO_2$ [16].

La composició, microestructura i estat molecular d'aquest sistema s'estudia molt sovint mitjançant la utilització de tècniques com l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) i la DSC, mentre que les interaccions entre el polímer i el fàrmac s'estudien amb l'espectroscòpia confocal Raman i l'ATR-FTIR (de l'anglès, *attenuated total reflection - Fourier transform infrared*) [17-19].

En aquest capítol es va col·laborar amb l'Institut de Ciència de Materials de Barcelona (ICMAB-CSIC) per a l'elaboració dels sistemes model. Aquí es descriuran a continuació les caracteritzacions dutes a terme pel fàrmac triflusal impregnat o dispers molecularment en una matriu polimèrica de PMMA.

4.2. Spectroscopic and chromatographic characterization of triflusal delivery systems prepared by using supercritical impregnation technologies

Anna Argemí, Ana López-Periago, Concepción Domingo, Javier Saurina

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 46 (2008) 456 – 462

4.3. Altres estudis i discussió de resultats

Es va caracteritzar el TRF com a principi actiu pur i també impregnat en PMMA. Així doncs, es va estudiar l'alliberament controlat que es produeix en aquesta nova formulació en aigua i en condicions fisiològiques, és a dir, a pH 2, que correspondria a l'alliberament a l'estómac, i a pH 7,4 corresponent a les condicions del torrent sanguini.

Per tal d'avaluar l'alliberament dels sistemes preparats es va utilitzar el sistema en flux continu amb detecció espectrofotomètrica descrit en la part experimental (apartat 3.2.4.3) i addicionalment la cromatografia de líquids d'alta resolució (apartat 3.2.5). La SEM ens va servir per estudiar la morfologia dels sistemes preparats. Amb aquesta tècnica podem observar els canvis associats al procés d'inflament del polímer i la seva posterior impregnació.

4.3.1. Establiment dels mètodes analítics (espectroscòpic i cromatogràfic)

En primer lloc es va utilitzar un mètode en flux continu amb detecció espectrofotomètrica UV per tal de seguir els processos d'alliberament de les mostres polimèriques. Es va realitzar un calibratge de l'equip en els diferents medis d'alliberament i també en aigua (Taula 4.1). La detecció de TRF en medi àcid presentava una major sensibilitat a 225 nm. En aquestes condicions el TRF es troba en forma neutre i presenta una absorbància més gran que en forma iònica a la longitud d'ona estudiada. Tot i que el mètode desenvolupat és simple i reproduïble, no permet la discriminació entre el TRF i el seu principal metabòlit, l'HTB. Així doncs, va servir per a l'obtenció dels perfils cinètics de les mostres en estudis preliminars. A més a més, en l'article 4.2 ja s'ha posat de manifest que les mesures en continu no serien les més adients per estudiar aquests tipus de sistemes que presenten un alliberament tan prolongat (de mesos).

Taula 4.1. Paràmetres del calibratge del mètode espectrofotomètric.

	Recta de calibratge	Interval de linealitat	r ²
TRF en H ₂ O	A = 6037,5 [TRF] + 0,07	2,0×10 ⁻⁵ – 2,4×10 ⁻⁴ M	0,9988
TRF en HCl 10 mM	A = 8451 [TRF]	2,0×10 ⁻⁵ – 1,9×10 ⁻⁴ M	0,9975
TRF en Na ₂ CO ₃ 10 mM	A = 5343,3 [TRF] + 0,1	2,0×10 ⁻⁵ – 2,9×10 ⁻⁴ M	0,9999

Així doncs es va realitzar un estudi més acurat en el qual es va desenvolupar un mètode cromatogràfic per determinar i quantificar el TRF i l'HTB independentment i en les diferents mostres preparades. Primerament, en la optimització de la fase mòbil cromatogràfica es va tenir en compte el pH de la fase aquosa (comprès entre valors de 2,0 i 5,0) i el percentatge de solvent orgànic (entre 60 i 80 % de metanol). Com a solució amortidora es va fer servir àcid fòrmic/formiat 25 mM a pH 2,0 i 4,0 i àcid acètic/acetat a pH 5,0. En la Figura 4.1 es mostren els cromatogrames obtinguts en l'optimització. El pH influeix de manera important en els t_r ja que tan el TRF com l'HTB tenen valors de pK_a propers a 3,0. Es van observar l'aparició de pics cromatogràfics dobles, situació que pot succeir quan els anàlits es troben a un pH proper al seu valor de pK_a . A més a més, hi havia una co-elució dels dos anàlits a pH 2 i 4. També podem observar la tendència habitual dels pics a fer-se més amples i baixos a temps de retenció més llargs amb la disminució del percentatge de metanol, a causa del procés de partició que té lloc a l'interior de la columna cromatogràfica. Finalment es va aconseguir una bona resolució dels pics a pH 5,0 i amb un percentatge del 60 % de metanol.

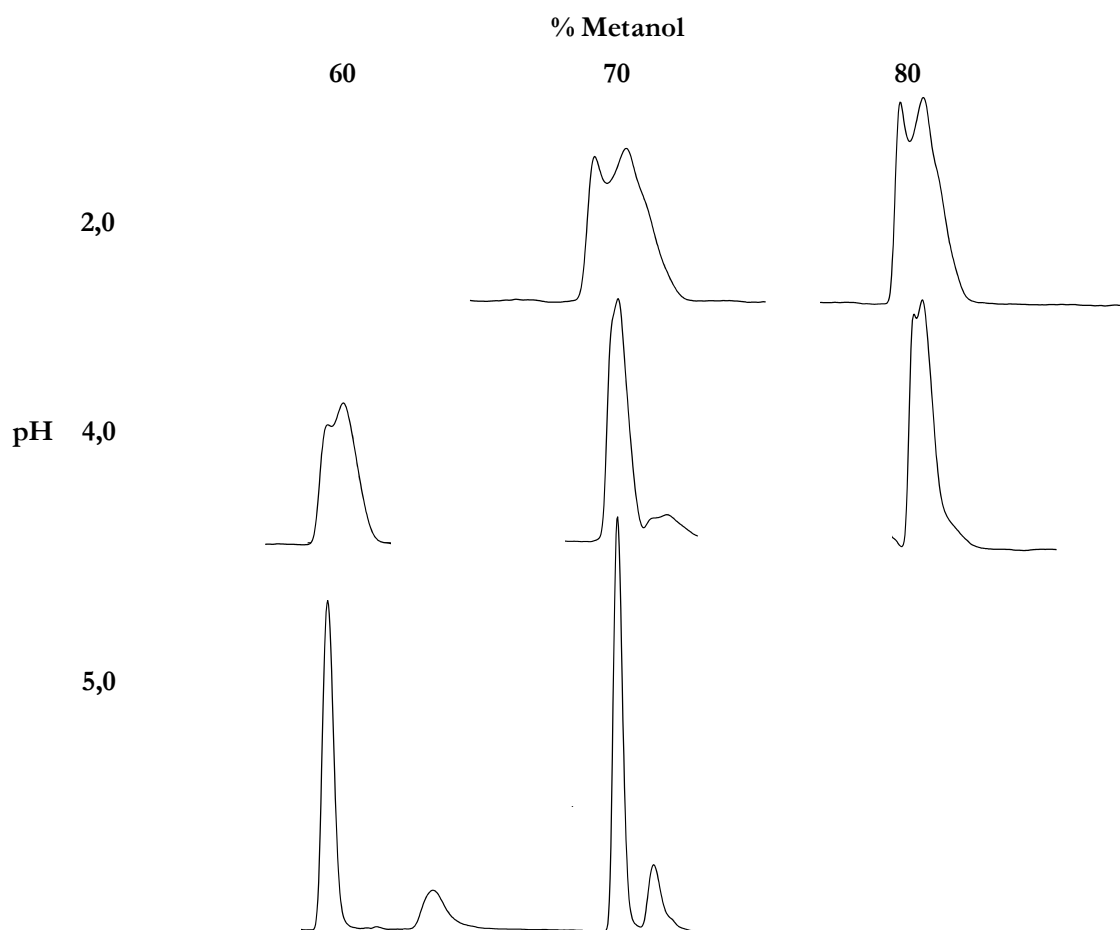


Figura 4.1. Cromatogrames corresponents a la optimització de la composició de la fase mòbil a diferents pH i percentatges de metanol. Relació de concentració TRF/HTB de 4/1.

El tractament de la mostra per tal d'inflar i dissoldre el suport polimèric i així alliberar el TRF es va fer amb un solvent apròtic, l'acetona. Alguns estudis han demostrat que l'ús de solvents pròtics com l'aigua i el metanol afavoreixen la hidròlisi del TRF a HTB [20]. Tant l'acetona com el clorur de metilè són bons dissolvents del PMMA [21], però es va seleccionar l'acetona envers el clorur de metilè, ja que aquest últim és cancerigen.

D'altra banda, també es van realitzar estudis d'estabilitat del TRF en el medi de redissolució, que és la mateixa fase mòbil del mètode cromatogràfic. Així doncs, 5 mg de TRF es van dissoldre en 20 ml de solució amortidora acètic/acetat 25 mM (pH 5), metanol i fase mòbil (MeOH:CH₃COOH/CH₃COO⁻, 60:40) i es va seguir cromatogràficament el procés de descomposició del TRF amb el temps. La Figura 4.2 mostra el comportament en els diferents medis de dissolució. Les solucions àcides de TRF eren les més estables, mentre que la descomposició més ràpida es produïa en la fase mòbil. Tot i això, aquesta no afectava l'anàlisi de les mostres que es realitza en 4 min. En aquest interval de temps la descomposició del TRF és pràcticament negligible (~ 1 %).

De totes maneres, encara que el TRF pugui presentar certa descomposició inicial, l'HTB presenta una activitat farmacològica semblant al seu precursor. Així doncs, el producte mantindria les seves propietats com a inhibidor d'agregacions plaquetàries.

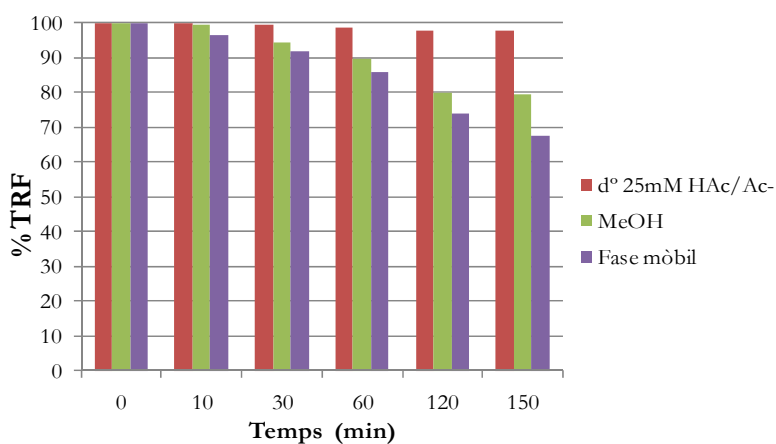


Figura 4.2. Estudis d'estabilitat del TRF en diferents medis de dissolució. Els resultats es mostren en % de TRF pur o no degradat.

En la Taula 4.2 es mostren els paràmetres de qualitat per al mètode cromatogràfic desenvolupat. Les rectes de calibratge del TRF es van fer en medi lleugerament àcid (HCl 10 mM, pH 2), ja que en aquest medi és més estable i evitem així la seva possible degradació en solució. L'estabilitat del TRF en els diferents medis d'alliberament i en aigua també va ser estudiada i els resultats es troben descrits en l'article.

Taula 4.2. Paràmetres de qualitat del mètode cromatogràfic desenvolupat.

	Triflusal	HTB
Columna	Synergi Hydro-RP 4 μ C ₁₈ , 80 Å (150 mm \times 4.6 mm d.i.)	
Fase mòbil	MeOH:25 mM CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ , pH 5,0 (60:40)	
Longitud d'ona de detecció	280 nm	
Temps de retenció (t_R)	2,5	3,4
Repetibilitat en el t_R (% RSD, n = 8)	0,4	0,6
Repetibilitat en l'àrea de pic (% RSD, n = 8)	1,4	2,3
Interval de linealitat	$1,1 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$ M	$5,3 \times 10^{-6} - 2,5 \times 10^{-4}$ M
Coefficient de correlació (r^2)	0,9997	0,9999
Límit de detecció (LOD)	$2,0 \times 10^{-6}$ M	$2,4 \times 10^{-6}$ M

4.3.2. Caracterització de les mostres preparades

Es van realitzar seguiments a llarg termini de les cinètiques d'alliberament en medi àcid i bàsic (a pH 2 i 7,4 respectivament) dels sistemes descrits en l'article 4.2. Els alliberaments a pH àcid també van ser estudiats en profunditat, tot i que els resultats obtinguts no van ser inclosos a l'article. En la Figura 4.3 es mostren aquests exemples d'alliberament per a les dues mostres de PMMA (boles i barra, PMMA_{BP} i PMMA_{GF}, respectivament) impregnades amb TRF. Per tal de poder comparar perfils cinètics, es mostra també la dissolució del TRF pur. Com es pot observar, es dissol completament amb un temps de 15 min en aquest mateix medi àcid. L'alliberament es produeix més ràpidament en medi bàsic, encara que els perfils cinètics en els dos medis són semblants. Tal com ja es comentava en l'article, l'alliberament sostingut del TRF en la mostra PMMA_{BP} (mostra anomenada E43B en l'article) segueix una cinètica d'ordre zero de la qual es van determinar les constants cinètiques en ambdós medis (Taula 4.3). D'altra banda, l'alliberament del TRF en la mostra PMMA_{GF} (mostra anomenada E43GF5 en l'article) presenta un comportament bifàsic. Després de dos dies l'alliberament es produeix de manera quasi lineal i més lentament. Aquest comportament és similar a un pseudoordre zero i, aleshores, hem pogut determinar també les constants cinètiques del procés en aquesta part de la corba.

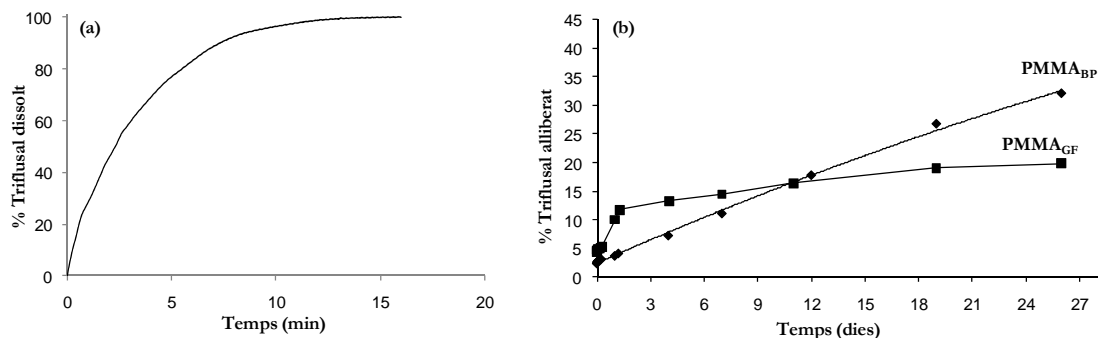


Figura 4.3. Perfils cinètics de dissolució i d'alliberament del TRF en medi àcid: (a) dissolució del fàrmac pur i (b) alliberament del fàrmac en mostres de PMMA impregnades.

Taula 4.3. Constants cinètiques calculades per a l'alliberament del TRF de l'interior del PMMA en els medis fisiològics estudiats.

Mostra	k (h ⁻¹), pH 2	k (h ⁻¹), pH 7,4
PMMA _{BP}	0,0474 (r = 0,995)	0,0601 (r = 0,996)
PMMA _{GF}	0,0162 (r = 0,992)	0,0171 (r = 0,958)

Una cinètica d'ordre zero indica que la velocitat del procés d'alliberament del fàrmac està controlada per una relaxació inicial del polímer i una posterior erosió. Les boles de PMMA presenten molta més superfície que la barra de PMMA i el polímer s'infla fàcilment quan entra en contacte amb el medi d'alliberament. Per aquest motiu es pot afirmar que la cinètica de l'alliberament és d'ordre zero des del començament. Aquest tipus d'alliberament s'ajusta molt bé als models cinètics descrits en la introducció d'aquesta tesi doctoral (apartat 2.6.3, equació 2.1 i 2.2). En canvi, en l'alliberament del TRF de les barres de PMMA s'observa un temps de retard en un període de temps d'un a dos dies. En aquest temps, s'allibera tot el TRF dipositat o proper a la superfície del PMMA i a partir d'aleshores es comença a alliberar el TRF dispers en la matriu de PMMA. És per això que l'alliberament es descriu com a una cinètica de pseudoordre zero.

Els valors de les desviacions estàndard relatives dels diferents alliberaments varien de 5 a 15 %, depenent de les condicions experimentals. El principal problema que contribueix a la dispersió dels resultats és la petita quantitat de mostra utilitzada, de l'ordre de 5 a 10 mg. De totes maneres, la robustesa i reproductibilitat d'aquests alliberaments es podria millorar si es treballés amb quantitats de mostra més grans, de l'ordre de 50 mg o superiors. Així doncs, els resultats d'aquests alliberaments suggereixen que el fàrmac

impregnat amb el scCO_2 va quedar atrapat al centre o nucli de la matriu i, per aquest motiu, la difusió d'aquest a través del polímer i fins al medi de dissolució és molt més lenta.

A part dels alliberaments que es mostren en l'article, se'n van dur a terme d'altres de mostres que presentaven una degradació inicial del TRF elevada (E18B). Tot i això, dels resultats obtinguts es va concloure que les cinètiques d'alliberament presentaven comportaments semblants (50 % d'alliberament en 20 dies) en els estudis realitzats en medi àcid [19].

En l'article, es posava de manifest que en les mostres processades amb scCO_2 trobàvem una quantitat considerable d'HTB, de 20 a 25 % en pes en relació amb la quantitat total de fàrmac impregnat (vegeu els cromatogrames en la Figura 4.4, TRF impregnat en PMMA_{BP} i en PMMA_{GF}). Es creia que aquesta degradació era produïda a causa de petites quantitats d'aigua que quedaven a l'interior del polímer. Aquesta hipòtesi va ser finalment confirmada mitjançant tècniques espectroscòpiques adients [17]. No obstant això, es van realitzar una sèrie de proves per descartar que el metabòlit es formava *in situ* durant el procés d'impregnació. En primer lloc es va analitzar el TRF residual (no impregnat, Figura 4.4 b2), que es trobava recristal·litzat en el reactor a conseqüència de la descompressió del sistema al final del procés d'impregnació. En aquest cas, el percentatge d'HTB determinat va ser inferior al 2 % en pes. A més a més, es va realitzar un experiment de control del procés. Una quantitat de TRF es va processar en scCO_2 a 200 bar i 35 °C en absència de PMMA (Figura 4.4 b1). L'observació visual del sòlid recuperat va revelar un canvi en la seva aparença comparat amb el producte original, cosa que indica així que el TRF pur es va dissoldre i recristal·litzar en el scCO_2 . Tot i això, la formació d'HTB va ser altre cop negligible. Es va poder afirmar que l'aigua necessària per a la hidròlisi del TRF a HTB no es trobava ni a l'interior del reactor ni era transportada pel CO_2 . Així doncs, la formació d'HTB es va associar a la presència d'aigua en el polímer PMMA. A més a més, s'ha comprovat que molts polímers poden absorbir quantitats significatives d'aigua, sent el PMMA un dels exemples més estudiats [22, 23].

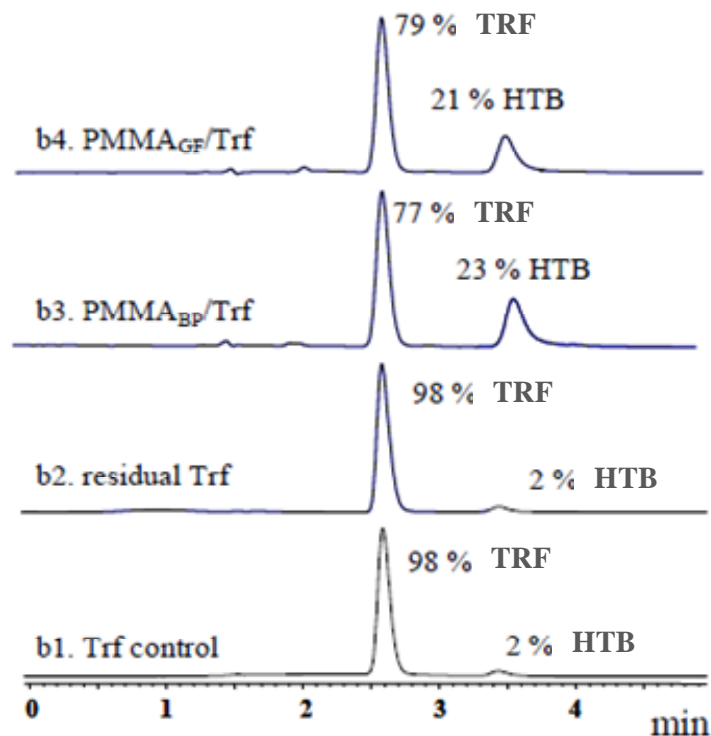


Figura 4.4. Cromatogrames obtinguts per a les mostres analitzades de triflusal: b1. control, b2. residual, b3. PMMA_{BP} (E43B) i b4. PMMA_{GF} (E43GF5).

L'anàlisi DSC de les mostres impregnades va ser realitzat a l'ICMAB-CSIC per tal d'investigar l'estat físic del fàrmac a l'interior del polímer, ja que aquest és un dels factors que podria influenciar en l'alliberament del fàrmac de l'interior del sistema. Es van estudiar les diferents transicions obtingudes mitjançant la DSC del PMMA pur, el TRF pur i el PMMA impregnat amb TRF. La T_g del PMMA pur mesurada al començament de la transició era de 124 °C. El TRF presentava el pic de fusió (T_m) a 117 °C. En les mostres preparades mitjançant la impregnació supercrítica no es va trobar cap pic de fusió corresponent al TRF, cosa que indica que aquest va ser probablement dispers a nivell molecular amb absència de TRF cristal·litzat. També es va observar una reducció notable de la T_g del PMMA fins a un valor de 42 °C després del processament i atribuïda a un efecte de plastificació provocat per les molècules de TRF segregades en una dispersió molecular [19]. Així doncs, aquesta és una caracterització més que recolza els resultats experimentals obtinguts durant l'estudi dels sistemes de PMMA impregnats amb el fàrmac model TRF.

4.4. Bibliografia

1. Florence, A.T., *Targeted and Controlled Drug Delivery: Novel Carrier Systems: S.P. Vyas, R.K. Khar, CBS Publishers, New Delhi, 2002, ISBN 81-239-0799-0*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **267**(1-2): p. 157-157.
2. Baldwin, S.P., Saltzman, W.M., *Materials for protein delivery in tissue engineering*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1998. **33**(1-2): p. 71-86.
3. Melia, C.D., *Hydrophilic matrix sustained-release systems based on polysaccharide carriers*. Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 1991. **8**(4): p. 395-421.
4. Frank, A., Rath, S.K., Venkatraman, S.S., *Controlled release from bioerodible polymers: effect of drug type and polymer composition*. Journal of Controlled Release, 2005. **102**(2): p. 333-344.
5. Rutllant, M.L., Borell, M., Felez, J., Diaz, J. M., Vicente, J.M., Garciarafanell, J., *Effect of triflusal (UR-1501), a potential antithrombotic agent, on blood-coagulation and platelet-aggregation in man*. Current Therapeutic Research-Clinical and Experimental, 1977. **22**(4): p. 510-521.
6. McNeely, W., Goa, K. L., *Triflusal*. Drugs, 1998. **55**(6): p. 823-833.
7. Rodriguez, G., Gallardo, A., Fernandez, M., Rebuella, M., Bujan, J., Bellon, J., Honduvilla, N.G., Escudero, C., San Roman, J., *Hydrophilic polymer drug from a derivative of salicylic acid: Synthesis, controlled release studies and biological behavior*. Macromolecular Bioscience, 2004. **4**(6): p. 579-586.
8. Hsiao, C.H., *Sustained release aspirin*. 1985, U.S. Patent 4,508,702.
9. Gallardo-Ruiz, A., Rodriguez-Crespo, G., San Román, J., *Biocompatible polymeric systems carrying triflusal or HTB*. 2006, U.S. Patent 0,067,955, A1.
10. Gallardo, A., Rodriguez, G., Aguilar, M.R., Fernandez, M., San Roman, J., *A Kinetic Model To Explain the Zero-Order Release of Drugs from Ionic Polymeric Drug Conjugates: Application to AMPS-Triflusal-Derived Polymeric Drugs*. Macromolecules, 2003. **36**(23): p. 8876-8880.
11. Temtem, M., Pompeu, D., Jaraquemada, G., Cabrita, E. J., Casimiro, T., Aguiar-Ricardo, A., *Development of PMMA membranes functionalized with hydroxypropyl-beta-cyclodextrins for controlled drug delivery using a supercritical CO₂-assisted technology*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **376**(1-2): p. 110-115.
12. Koller, G., Roether, J., Bruce, K., Deb, S., *Antimicrobial potential of bioactive bone cements*. Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, 2008. **6**(1): p. 16-22.
13. Shi, M., Kretlow, J.D., Nguyen, A., Young, S., Scott Baggett, L., Wong, M.E., Kasper, F.K., Mikos, A.G., *Antibiotic-releasing porous polymethylmethacrylate constructs for osseous space maintenance and infection control*. Biomaterials, 2010. **31**(14): p. 4146-56.

14. Beckman, E.J., *Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing*. Journal of Supercritical Fluids, 2004. **28**(2-3): p. 121-191.
15. Tomasko, D.L., Li, H.B., Liu, D.H., Han, X.M., Wingert, M.J., Lee, L.J., Koelling, K.W., *A review of CO₂ applications in the processing of polymers*. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2003. **42**(25): p. 6431-6456.
16. Kazarian, S.G., Martirosyan, G.G., *Spectroscopy of polymer/drug formulations processed with supercritical fluids: in situ ATR-IR and Raman study of impregnation of ibuprofen into PVP*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **232**(1-2): p. 81-90.
17. Andanson, J.M., Lopez-Periago, A., Garcia-Gonzalez, C.A., Domingo, C., Kazarian, S.G., *Spectroscopic analysis of triflusal impregnated into PMMA from supercritical CO₂ solution*. Vibrational Spectroscopy, 2009. **49**(2): p. 183-189.
18. Lopez-Periago, A., Argemi, A., Andanson, J.M., Fernandez, V., Garcia-Gonzalez, C.A., Kazarian, S.G., Saurina, J., Domingo, C., *Impregnation of a biocompatible polymer aided by supercritical CO₂: Evaluation of drug stability and drug-matrix interactions*. Journal of Supercritical Fluids, 2009. **48**(1): p. 56-63.
19. Lopez-Periago, A.M., Vega, A., Subra, P., Argemi, A., Saurina, J., Garcia-Gonzalez, C.A., Domingo, C., *Supercritical CO₂ processing of polymers for the production of materials with applications in tissue engineering and drug delivery*. Journal of Materials Science, 2008. **43**(6): p. 1939-1947.
20. Ramis, J., Mis, R., Forn, J., *Pharmacokinetics of triflusal and its main metabolite in rats and dogs*. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, 1991. **16**(4): p. 261-268.
21. Domingo, C., Vega, A., Fanovich, M.A., Elvira, C., Subra, P., *Behavior of poly(methyl methacrylate)-based systems in supercritical CO₂ and CO₂ plus cosolvent: Solubility measurements and process assessment*. Journal of Applied Polymer Science, 2003. **90**(13): p. 3652-3659.
22. Turner, D.T., *Water sorption of poly(methyl methacrylate): 1. Effects of molecular-weight*. Polymer, 1987. **28**(2): p. 293-296.
23. Turner, D.T., Abell, A.K., *Water sorption of poly(methyl methacrylate): 2. Effects of crosslinks*. Polymer, 1987. **28**(2): p. 297-302.

CAPÍTOL 5

**Preparació i caracterització de
fàrmacs inestables mitjançant
sistemes en flux continu i
cromatografia de líquids:
fàrmac model, 5-azacitidina**

En aquest capítol de la tesi es troben descrites les metodologies desenvolupades per a l'estudi en profunditat de la 5-azacitidina com a model de fàrmac inestable per a la preparació de sistemes d'alliberament controlat.

En primer lloc es va fer la caracterització del fàrmac i, per això, es van establir mètodes analítics per conèixer-ne el comportament. Es van realitzar estudis d'estabilitat i d'estimació de constants d'acidesa de la 5-azacitidina utilitzant sistemes en flux continu i la cromatografia de líquids amb detecció UV. Aquests estudis ens serveixen, per exemple, per observar com afecten canvis de temperatura o de pH a l'estabilitat del fàrmac. Seguidament es va preparar un sistema d'alliberament controlat basat en el recobriment de la 5-azacitidina amb una matriu polimèrica d'L-PLA mitjançant la utilització del scCO_2 . Finalment es va caracteritzar aquest sistema amb noves metodologies desenvolupades i adients per a aquest tipus de mostres, com el sistema en flux continu descrit en la part experimental (apartat 3.2.4.4). Aquest fàrmac experimenta un clar procés de degradació amb el temps i, per tant, ha causat certs problemes a l'hora de realitzar els experiments i/o d'interpretar els resultats.

5.1. Introducció

La quimioteràpia està enfocada al tractament del càncer localitzat o la metàstasi. Els fàrmacs anticancerosos no són específics a les cèl·lules canceroses i és per això que la millora en l'alliberament de compostos anticancerosos en teixits tumorals d'humans sembla un repte raonable i assequible. En estudis recents s'està treballant per millorar la biocompatibilitat del fàrmac des del punt de vista de la resposta tumoral: (a) retardant l'alliberament dels preparats a períodes d'acció llargs, (b) utilitzant fàrmacs recoberts de liposomes per aconseguir prolongar els efectes o reduir-ne la toxicitat, (c) administrant fàrmacs precursors inerts o no tòxics per a l'activació específica al lloc del tumor, (d) alliberant compostos mediadors d'anticossos i (e) conjugant transportadors específics del fàrmac directament a la diana tumoral. Tot i això, cal conèixer la farmacocinètica prèvia per dur a terme qualsevol investigació en aquest camp. Els últims avenços s'han aconseguit millorant l'eficàcia i reduint la toxicitat dels compostos anticancerosos.

La 5-azacitidina és un nucleòsid anàleg a la citidina (present en l'àcid desoxiribonucleic o ADN i en l'àcid ribonucleic o ARN) en el qual s'ha incorporat un nitrogen en la posició 5 de l'anell heterocíclic. És un fàrmac antineoplàstic que s'utilitza per al tractament de la síndrome mielodisplàstica o leucèmia mieloide que afecta la formació de

cèl·lules sanguínies de la medul·la. Es comercialitza amb el nom de Vidaza[®] des de l'any 2004, en què va ser aprovat el seu ús per la FDA [1]. Està classificat pel BCS com a fàrmac de classe 1, és a dir, molt soluble en aigua i amb una permeabilitat elevada. Aquest fàrmac presenta una elevada inestabilitat en solucions aquoses. L'anell heterocíclic és químicament inestable i es trenca quasi espontàniament per formar la N-formilamidino-N'-β-D-ribofuranosilurea (RGU-CHO), obtinguda com a conseqüència d'un atac nucleòfil de l'aigua en el C-6 de la 5-azacitidina i una posterior obertura de l'anell. El següent subproducte, la 1-β-ribofuranosil-3-guanilurea (RGU), es forma més lentament per una pèrdua irreversible del grup N-formil de l'RGU-CHO [2].

El seu mecanisme d'acció en l'organisme es basa en una activació intracel·lular, seguida d'una trifosforilació per l'acció de les corresponents quinases de manera que competeix amb la citosina trifosfat (CTP) per incorporar-se a l'ARN i en menor grau a l'ADN (Figura 5.1). La presència del N a la posició 5 de l'anell piridínic evita la metilació enzimàtica de la base modificada 5-metilcitosina. La presència de la ribosa predisposa la seva incorporació en l'ARN [3].



Figura 5.1. Estructura i activació metabòlica de la 5-azacitidina.

En general, des del descobriment d'aquest fàrmac l'any 1964 [4] no es troben en la bibliografia un gran nombre de treballs per a la determinació de la 5-azacitidina. Tot i això, la majoria de mètodes analítics utilitzen la cromatografia de líquids en fase invertida (RP-HPLC) amb detecció UV [2, 5-8].

S'han realitzat estudis d'estabilitat d'aquest fàrmac o d'anàlegs, com la decitabina (5-aza-2'-desoxicitidina), en els quals es presenten hipòtesis diverses sobre els possibles compostos de degradació que es formen. En aquests estudis han utilitzat tècniques com l'RMN, l'espectrometria de masses i l'HPLC amb detecció UV [9-12]. Els mecanismes que produeixen aquesta descomposició no es troben ben explicats en cap d'aquests estudis. Se sap que els compostos anàlegs a la citidina són químicament inestables en solució, però

actualment no hi ha un consens entre els temps de semivida i els corresponents productes de degradació en condicions fisiològiques d'aquests fàrmacs.

Com ja s'ha comentat prèviament, la complexitat dels estudis radica en el fet que la degradació del fàrmac és fortament dependent del pH (a més de la temperatura). Això comporta que quan s'estudia el caràcter àcid-base del fàrmac es pugui produir un procés paral·lel de degradació, especialment quan el medi és bàsic. Per aquest motiu, es van desenvolupar sistemes en flux continu per tal de minimitzar la descomposició, ja que les espècies bàsiques es generen *in situ* i el temps transcorregut entre la seva formació i la mesura és molt petit.

Per a la realització dels estudis cinètics es va fer servir l'espectrofotometria UV-vis a diferents temperatures i valors de pH i també la cromatografia. Per als estudis termodinàmics es van desenvolupar sistemes en flux continu amb detecció espectrofotomètrica. L'extracció de la informació analítica d'aquests sistemes ens va portar a la utilització de mètodes quimiomètrics, concretament el mètode MCR-ALS.

El fàrmac es va atrapar amb un recobriment polimèric en el Laboratori d'Enginyeria de Materials i Altes Pressions de París (LIMPH-CNRS) fruit d'una col·laboració conjunta dins el projecte europeu. Els subsegüents estudis es van enfocar especialment a la millora en la seva estabilitat. Com a polímer adient per al recobriment d'aquest fàrmac es va escollir l'L-PLA, que és un polímer biodegradable constituït per molècules d'àcid làctic. Es degrada fàcilment en aigua i CO₂. A part d'aquestes característiques, és un polímer de tipus polielectròlit i d'elevat pes molecular. Aquest tipus de polímers aconseguixen reduir suficientment la velocitat de dissolució per permetre un alliberament prolongat dels fàrmacs.

Els estudis realitzats per a l'avaluació del sistema d'alliberament controlat es van fer utilitzant el sistema en flux continu descrit en la part experimental (apartat 3.2.4.4), l'HPLC, la SEM i la DSC. A excepció d'algunes patents existents no s'han trobat en la bibliografia estudis que impliquin el processament de la 5-azacitidina amb FSC i tampoc recoberta amb L-PLA.

5.2. Study of the degradation of 5-azacytidine as a model of unstable drugs using a stopped-flow method and further data analysis with multivariate curve resolution

Anna Argemí, Javier Saurina

Talanta 74 (2007) 176 – 182

5.3. Characterization of acid-base properties of unstable drugs using a continuous-flow system with UV-vis spectrophotometric detection

Anna Argemí, Javier Saurina

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44 (2007) 859 – 866

5.4. Characterization of azacytidine/poly(L-lactic) acid particles prepared by supercritical antisolvent precipitation

Anna Argemí, Arlette Vega, Pascale Subra-Paternault, Javier Saurina
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 847 – 852

5.5. Altres estudis i discussió de resultats

5.5.1. Estudis d'estabilitat

Influència de la temperatura

En primer lloc es va fer un seguiment de l'estabilitat de la 5-AZA al llarg del temps en diferents condicions de temperatura. Es va utilitzar un sistema en flux continu i es van realitzar mesures espectrals al llarg del temps. Les dades obtingudes es van organitzar en una matriu on cada columna corresponia a una longitud d'ona i cada fila a un valor de temps. Les dimensions del domini espectral eren de 101 longituds d'ona (200 a 300 nm) mentre que les dimensions del domini temporal eren diferents depenent de la temperatura que s'estudiava (vegeu els detalls en la taula 1 de l'article 5.2). La matriu de dades va ser sotmesa a un pretractament que consistia en suavitzar els espectres obtinguts amb un filtre de Savitsky-Golay utilitzant el programa MATLAB. Aquest filtre s'utilitza per eliminar el soroll de fons present en les mesures espectrofotomètriques. A continuació es va ajustar la línia base a zero, ja que pot derivar lleugerament en un mateix experiment.

Seguidament es va realitzar la resolució matemàtica de les dades per tal de dur a terme la recuperació dels perfils cinètics de les espècies presents mitjançant l'optimització per mínims quadrats alternats. En l'avaluació preliminar del nombre d'espècies presents mitjançant SVD es van trobar tres valors significatius. Les restriccions que es van aplicar són les següents:

- No negativitat, tant per a concentracions com per a espectres.
- Unimodalitat, aplicada als perfils de concentració.
- Sistema tancat, ja que la suma de les concentracions de les espècies és constant durant tot l'experiment.
- Model físicoquímic. El procés segueix un model cinètic. S'aplica el mecanisme descrit en l'apartat 2.7.3 ($A \leftrightarrow B \rightarrow C$), en el qual és necessari introduir les estimacions inicials de les concentracions i de les constants k_1 , k_{-1} i k_2 .

De forma preliminar, es va realitzar una anàlisi individual de cada matriu de dades experimental. Els resultats obtinguts van mostrar que existia una certa discrepància entre algunes constants cinètiques, ja que la k_1 a 70 °C és superior a la k_1 a 80 °C (Taula 5.1). En

aquest cas el mètode no s'ajusta prou bé a la realitat. És per aquest motiu que es va decidir fer l'anàlisi simultània de tots els experiments, per tal d'intentar millorar els resultats.

En la resolució simultània de matrius es mantenen les columnes en comú, és a dir, l'interval de longituds d'ona, ja que és el mateix per a tots els experiments. En aquesta anàlisi, les restriccions aplicades són les mateixes que en l'anàlisi individual i a més a més, implícitament es força les espècies comunes a tenir el mateix espectre en la matriu S . Es va observar una millora en els valors de les constants cinètiques obtingudes per a cada experiment, les quals anaven augmentant amb la temperatura, i per tant, s'obtenien uns resultats més raonables.

En aquests estudis a diferents temperatures es deixava un temps per tal que la solució de 5-AZA arribés a la temperatura experimental. Degut a la ràpida descomposició que aquesta presenta en solucions aquoses es va pensar en considerar que el procés de degradació de la 5-AZA ja podia haver començat quan s'enregistrava el primer espectre, especialment a temperatures elevades. Per tant, l'estimació de les concentracions inicials en el model fisicoquímic podia ser errònia.

Taula 5.1. Constants cinètiques calculades mitjançant la resolució individual i simultània de matrius mitjançant MCR-ALS.

	T = 25 °C	T = 50 °C	T = 70 °C	T = 80 °C
Resolució matricial individual				
k_1 (min ⁻¹)	0,0168	0,0495	0,2062	0,0638
k_{-1} (min ⁻¹)	0,0001	$1,7 \times 10^{-6}$	0,0013	0,0133
k_2 (min ⁻¹)	0,0001	0,0008	0,0049	0,0151
Resolució matricial simultània				
k_1 (min ⁻¹)	0,0119	0,0446	0,2417	0,8379
k_{-1} (min ⁻¹)	0,0006	0,0015	0,0016	0,0019
k_2 (min ⁻¹)	0,0001	0,0018	0,0089	0,0115
Resolució matricial simultània amb concentracions inicials estimades				
k_1 (min ⁻¹)	0,0122	0,0393	0,0704	0,0894
k_{-1} (min ⁻¹)	0,0001	0,0013	0,0014	0,0017
k_2 (min ⁻¹)	0,0002	0,0017	0,0089	0,0114

Per tal d'aproximar els valors de les concentracions inicials als seus valors reals es va realitzar la mateixa anàlisi simultània de les quatre matrius experimentals, però sense aplicar el model cinètic. D'aquesta manera es van obtenir uns perfils de concentració diferents a partir dels quals es van aproximar els valors inicials. Com es pot observar en la Taula 5.1, els valors de les constants a 25 °C i a 50 °C són semblants als valors de la resolució matricial simultània anterior (sense estimacions de concentracions inicials), ja que en ambdós estudis la degradació inicial del fàrmac seria pràcticament negligible.

En canvi, els valors de la k_1 a 70 i 80 °C són sensiblement diferents a conseqüència de la ja esmentada descomposició inicial de la 5-AZA a aquestes temperatures. D'altra banda, els valors de k_2 són més insensibles a aquesta ràpida degradació inicial. Les constants cinètiques de tancament de l'anell (k_1) són més petites que aquelles de formació de l'RGU (k_2). Aquest resultat ens indica que l'equilibri està desplaçat cap a la dreta i en la majoria de casos la formació de l'RGU pot ser considerable. Així doncs, aquesta resolució matricial va ser considerada com l'òptima i és, per això, la descrita en l'article 5.2.

En la Figura 5.2 es mostren els diferents perfils de concentració i espectres optimitzats per a les diferents proves realitzades i explicades en aquest apartat.

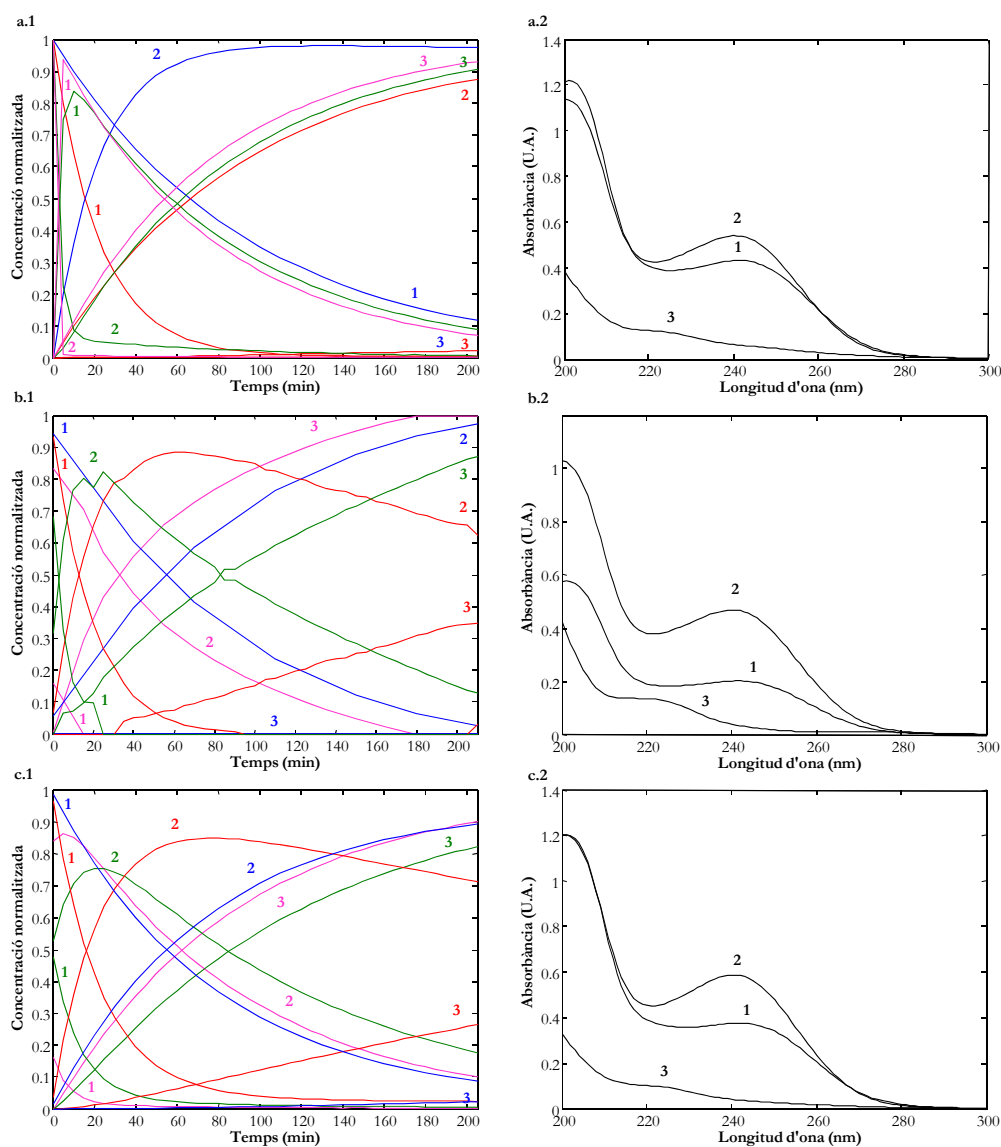


Figura 5.2. Perfils de concentració (1) i espectres optimitzats (2) resolts mitjançant l'anàlisi simultani de les matrius de dades amb MCR-ALS en l'estudi cinètic d'una solució 5×10^{-5} M de 5-AZA: (a) model cinètic forçant les concentracions inicials a 1 o 0, (b) sense model cinètic i (c) model cinètic amb les concentracions inicials estimades. $T = 25$ °C (blau), $T = 50$ °C (vermell), $T = 70$ °C (verd), $T = 80$ °C (rosa). Assignació d'espècies: 1 = 5-AZA; 2 = RGU-CHO; 3 = RGU.

Influència del pH

En segon lloc, es va realitzar un seguiment de l'estabilitat de la 5-AZA en funció del pH utilitzant el sistema en flux continu descrit en l'apartat 3.2.4.1. Un cop parat el flux, s'enregistraven els espectres durant certs períodes de temps. Les dades obtingudes es van organitzar en forma matricial, on les columnes corresponien a longituds d'ona i les files a valors de temps. L'interval de pH estudiat estava comprès entre 2 i 11, aproximadament. Els diferents dominis espectral i temporal es troben també detallats en la taula 1 de l'article 5.2. De manera anàloga als estudis precedents, les dades es van transformar per tal de poder tractar-les numèricament. A continuació es determinava el nombre de components mitjançant la representació dels SVD i es triaven les estimacions inicials de les diferents espècies.

Aleshores es va dur a terme la resolució matemàtica de les dades i es van aplicar les mateixes restriccions que en els estudis anteriors, ja que es tracta del mateix sistema.

Així doncs, es van obtenir per a cada experiment realitzat les constants cinètiques que es mostren en la Taula 5.2. Els ajustos del model als valors experimentals van ser molt bons en tots els casos, presentant valors inferiors a l'1 % en la reproducció de les dades. En la Figura 5.3 es mostren els perfils de concentració a pH 10 i 11, que no consten en l'article 5.2.

Taula 5.2. Constants cinètiques obtingudes mitjançant MCR-ALS en els experiments a diferents valors de pH.

pH _{exp}	1,89	4,53	7,19	9,21	10,11	11,28
k_1 (min ⁻¹)	0,0204	0,0148	0,0130	0,2372	0,2410	2,9321
k_{-1} (min ⁻¹)	5×10^{-5}	0,0001	0,0001	$< 5 \times 10^{-5}$	$< 5 \times 10^{-5}$	$< 5 \times 10^{-5}$
k_2 (min ⁻¹)	0,0028	0,0013	0,0007	0,0145	0,0586	0,1449

Tal com es mostra en la Taula 5.2, les constants cinètiques corresponents a la hidròlisi de la 5-AZA varien amb el pH. Si es representen els $\log k_1$ en funció del pH, s'observa una corba amb un mínim al voltant de pH 7,2. Els pendents d'aquesta corba presenten valors de -0,0237 i de 0,5583 en la zona àcida i bàsica, respectivament. És a dir, que la hidròlisi es produeix molt més ràpidament a pH bàsics. Una tendència similar també s'observa si es representen els $\log k_2$ amb el pH. Així doncs, els valors d'estabilitat òptima i per tant, de menor hidròlisi es trobarien a pH pròxims a 7,0.

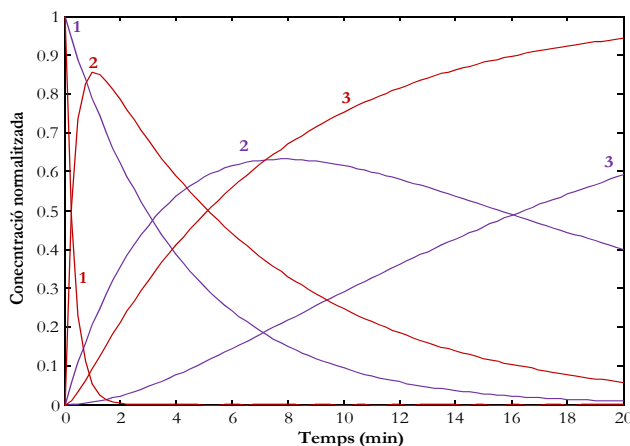


Figura 5.3. Estudi de la influència del pH en la degradació de la 5-AZA. Perfils de concentració optimitzats per MCR-ALS en l'anàlisi individual dels estudis cinètics duts a terme: pH 10 (lila), pH 11 (granat). Assignació d'espècies: 1 = 5-AZA; 2 = RGU-CHO; 3 = RGU.

La hidròlisi sembla seguir una cinètica de primer ordre, ja que les constants cinètiques de tancament de l'anel (k_{-1}) són molt petites, tant que l'equilibri sembla ser només dependent de la temperatura.

5.5.2. Determinació dels valors de pK_a de l'azacitidina

Es va adaptar el mètode prèviament desenvolupat al nostre grup de recerca per a la caracterització espectrofotomètrica de reaccions àcid-base [13]. Així doncs, el sistema en flux continu genera la solució valorant en línia a partir de la mescla de dues solucions que contenen les espècies dels sistemes reguladors del pH. El sistema H_3PO_4/PO_4^{3-} permet regular el pH al voltant de 2,2; 7,2 i 12,2. El sistema CH_3COOH/CH_3COO^- ho fa a 4,7 i el sistema H_3BO_3/BO_2^- , a 9,2. Així, el pH queda regulat en un ampli interval de treball.

Per tal d'aconseguir optimitzar els paràmetres del sistema en flux continu es va dur a terme l'anàlisi de valors singulars, que en un primer moment ens va indicar la presència de més de tres espècies químiques que presentaven absorbància. Aquests resultats ens indicaven que s'estava produint un procés de degradació en paral·lel amb la valoració, sobretot en medi bàsic. Per tal d'eliminar aquest procés d'hidròlisi, es van optimitzar en primer lloc les dimensions del reactor de mescla de la 5-AZA i la solució valorant. Es va utilitzar un reactor de mescla de 550 cm \times 0.7 mm d.i., un de 95 cm \times 0.8 mm d.i. i un de 35 cm \times 1.1 mm d.i. Amb aquest últim reactor el procés de degradació pràcticament no es produïa. En segon lloc es va optimitzar el cabal de treball a pH 12 utilitzant aquest reactor i

controlant sobretot el temps de contacte entre les dues solucions enregistrant els corresponents espectres en cada cas. L'objectiu era intentar que les dues solucions estiguessin en contacte el temps mínim perquè es produís una bona homogeneïtzació evitant la descomposició de la 5-AZA. Els resultats obtinguts es mostren resumits en la taula 1 de l'article 5.3. Finalment s'observaven només 3 valors significatius associats a les 3 espècies de l'equilibri àcid-base, tal com es mostra en la Figura 5.4.

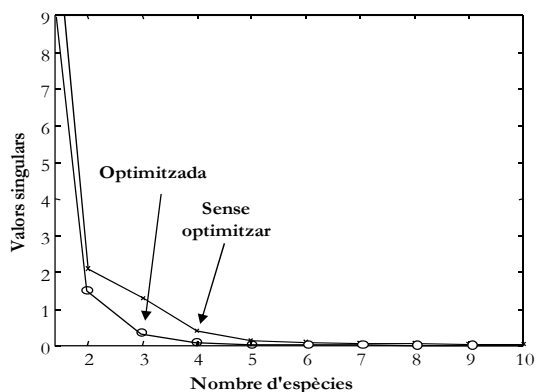


Figura 5.4. Representació dels valors singulars en la valoració de la 5-azacitidina.

Les dades espectroscòpiques generades en cada valoració es van organitzar en forma matricial, on cada fila corresponia a un valor de pH i cada columna a una longitud d'ona. Així doncs, el domini de pH conté els valors d'absorbància en funció del pH i el domini espectral en funció de les longituds d'ona. Una vegada es van obtenir les dades espectrofotomètriques, es van transformar adequadament per poder realitzar el tractament numèric. En les valoracions, es va enregistrar un espectre del blanc en tot l'interval de pH estudiat. Això es fa per poder obtenir una millor resolució dels resultats, ja que a valors de pH bàsics el blanc presenta valors d'absorbància bastant elevats, sobretot a longituds baixes de l'UV. Aquests canvis espectrals ens podrien portar a una resolució errònia del sistema en estudi, ja que en l'anàlisi de les dades mitjançant SVD aquests valors d'absorbància podrien presentar una contribució significativa i ser considerats com a una espècie més. A més a més, els diferents valors de pH del blanc i els de les valoracions no són exactament els mateixos. Per aquest motiu, es va utilitzar la funció d'interpolació de dos dimensions "interp2" del programa MATLAB per tal d'obtenir una estimació d'aquests valors i crear així una nova matriu de dades del blanc que es pot restar a la matriu de la valoració de l'anàlit.

Les dades experimentals obtingudes es representen en dues dimensions, el pH en funció de l'absorbància, per poder observar de manera més clara els canvis espectrals

(Figura 5.5, a). En el cas de la 5-AZA se'n van observar dos de ben diferenciats, la qual cosa ens va indicar que el compost tenia dos valors de pK_a en l'interval de pH estudiat. Els valors de pK_a van ser calculats mitjançant la resolució individual i simultània de matrius. A partir del grau d'ajust de les dades, la precisió dels resultats i l'avaluació d'ambigüitats es va concloure que, en aquest cas, l'anàlisi individual proporcionava els millors resultats ajustant el model àcid-base als valors experimentals satisfactòriament. Es mostren en la Taula 5.3 els valors de pK_a calculats per als tres replicats, així com també el seu valor promig.

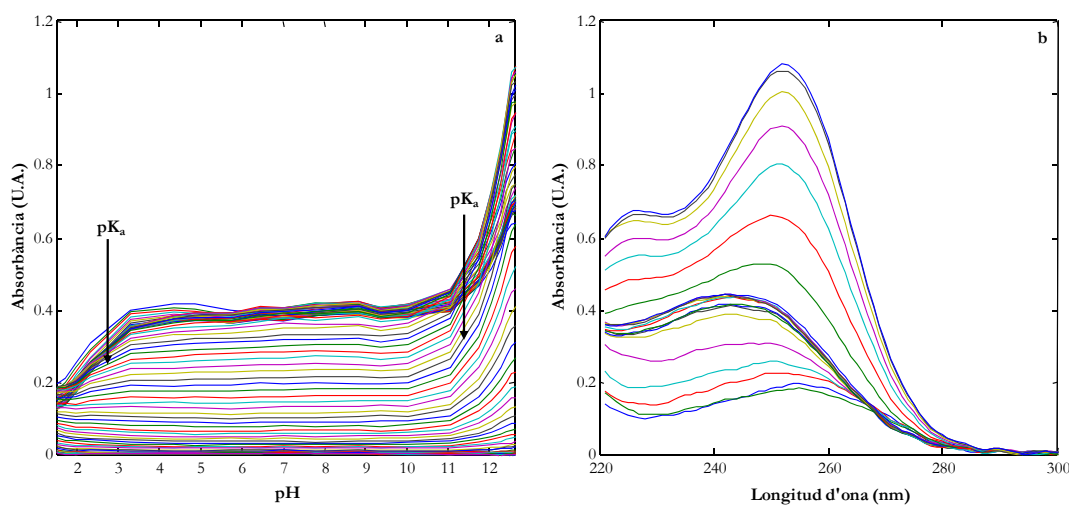


Figura 5.5. Resultats de les valoracions en continu de la 5-AZA. (a) Representació de la variació de l'absorbància amb el pH. (b) Representació de la variació de l'absorbància amb la longitud d'ona.

Taula 5.3. Valors de pK_a obtinguts mitjançant MCR-ALS individual i simultani i valor promig per a tots els replicats.

Resolució matricial individual				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
pK_{a1}	2,66	2,70	2,64	$2,67 \pm 0,03$
pK_{a2}	12,25	12,25	12,29	$12,26 \pm 0,02$
Resolució matricial simultània				
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3	
pK_{a1}	2,85	2,83	2,72	$2,80 \pm 0,07$
pK_{a2}	12,33	12,37	12,14	$12,28 \pm 0,08$

Adicionalment es va determinar el valor de pK_a de l'RGU, que és el subproducte de descomposició de la 5-AZA. Aquest producte s'obté fàcilment mitjançant una hidròlisi bàsica en calent de la 5-AZA. El producte intermedi del procés de descomposició no s'ha aconseguit aïllar a dia d'avui, ja que es troba sempre en equilibri amb la 5-AZA.

Un cop duta a terme la hidròlisi es va acidificar la solució resultant per tal de realitzar-ne la valoració començant des de pH àcid, seguint la metodologia establerta. S'esperava trobar dos valors de pK_a de manera anàloga a la 5-AZA, però contràriament al que es pensava no va ser així. Es va trobar un sol valor de pK_a per a l'RGU, d'altra banda semblant al valor estimat (pK_a 7,35) amb els programes de càlcul esmentats en l'article 5.3.

Adicionalment, per tal d'avaluar l'aplicabilitat del mètode es van escollir una sèrie d'anàlits amb inestabilitats de diferents fonts com a prova del bon funcionament del mètode (veure taula 3 de l'article).

5.5.3. Optimització del mètode cromatogràfic per a la caracterització dels processos d'alliberament de l'azacitidina

Tal com s'explicava en l'article 5.3, la cromatografia es va fer servir en els estudis preliminars com a tècnica complementària per tal de confirmar la formació de les diferents espècies i validar els resultats obtinguts amb el sistema amb parada de flux. Així doncs, es va dur a terme una optimització inicial de les condicions cromatogràfiques.

La influència del pH de la fase mòbil sobre la retenció dels anàlits es va estudiar en l'interval de pH comprés entre 2,75 i 5,75. Tant la 5-AZA com els seus compostos de degradació són molt polars i és per aquest motiu que es va decidir treballar amb una fase mòbil al 100 % de fase aquosa i amb una columna estable en aquestes condicions, com és la Synergi Hydro-RP. La fase mòbil seleccionada està formada per CH_3COOH/CH_3COO^- 100 mM. Es va observar, doncs, que en augmentar el pH de la fase aquosa augmentava el temps de retenció (Figura 5.6, a). Aquest comportament ens suggereix que hi ha un menor grau d'ionització dels anàlits a pH més alts, fet que podem confirmar gràcies al coneixement previ dels corresponents valors de pK_a dels anàlits. Així per exemple, a pH 2,75 el pic corresponent a la 5-AZA és molt ample (Figura 5.6, b), possiblement a causa de la proximitat amb el seu valor de pK_a .

Es va seleccionar com a òptim el valor de pH 5,25, ja que els tres compostos (anàlit més els dos compostos de degradació) s'elueixen sense interferències del senyal del volum mort ($t_M = 1,6$ min). Tot i que a pH més baixos (a partir de 3,75) els t_R són menors i les amplades de pic són acceptables, l'RGU (que és l'espècie més polar dels 3 compostos) s'elueix amb el volum mort en aquests valors de pH. L'RGU es troba ionitzada a aquests valors de pH i en conseqüència no es reté en la columna cromatogràfica de fase invertida.

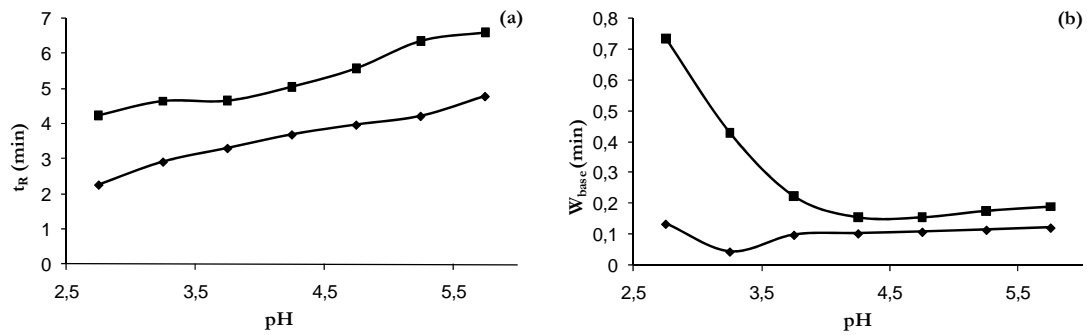


Figura 5.6. Variació del temps de retenció amb el pH de la fase aquosa (a) i de l'amplada de base del pic cromatogràfic amb el pH (b) per a les dues espècies majoritàries en solució, la 5-AZA (quadrats) i l'RGU-CHO (rombes).

Quan es va aplicar el mètode anterior a la caracterització dels alliberaments ens vam trobar amb un problema de sensibilitat associat al segon compost de degradació (RGU), ja que no es detectava a concentracions baixes. Aquest presenta una absorptivitat molar molt baixa quan es troba ionitzat, és a dir a pH àcids. L'absorbància augmenta dràsticament a mesura que augmenta el seu pH, al mateix temps que es forma l'espècie neutra. Aquest comportament es pot observar en la Figura 5.7 i és per aquest motiu que vam decidir canviar el mètode. Per tal de poder treballar a pH bàsics vam utilitzar una columna cromatogràfica específica, com és la Gemini. Aquesta columna és molt més estable que d'altres a pH bàsics. El nou mètode presenta certs avantatges respecte a l'anterior: l'eficiència és augmentada, es detecten tots els compostos i amb límits de detecció (LOD, de l'anglès *limit of detection*) més baixos i t_R més curts, per tant, es disminueix el temps d'anàlisi.

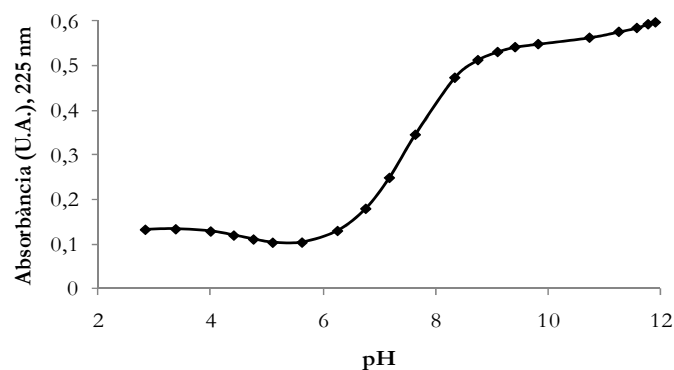


Figura 5.7. Absorbància a 225 nm en funció del pH per a una mostra d'RGU 1×10^{-4} M.

Es van estudiar les condicions cromatogràfiques de la fase mòbil, variant el percentatge de solvent orgànic (MeOH) i el pH, considerats els principals factors que influeixen en la separació cromatogràfica. El pH de la fase aquosa es va variar de 8,5 a 9,5

utilitzant una solució amortidora de TRIS 20 mM. A aquests valors de pH l'RGU presenta una absorbància 5 vegades més gran que a pH àcids. No es van provar valors de pH més alts, ja que aleshores es produiria la degradació de la 5-AZA a l'interior de la columna cromatogràfica. Com a resultat, es va escollir el TRIS 20 mM a un pH de 9,0. En aquestes circumstàncies s'obtenen pics cromatogràfics estrets i amb una bona resolució.

També es va variar la proporció de la fase orgànica, de 0 a 10 % de metanol. Finalment es va decidir afegir una petita proporció de metanol del 2 %, per tal de reduir els t_R dels anàlits i afavorir el bon funcionament de la columna.

D'ambdós mètodes es van establir els paràmetres de qualitat per a la 5-AZA, l'RGU-CHO i l'RGU. Els resultats es mostren en la Taula 5.4. Aquests paràmetres es van calcular amb les respectives solucions patró.

Taula 5.4. Paràmetres de qualitat establerts per als dos mètodes cromatogràfics.

	5-Azacidina	RGU-CHO	RGU
Columna	Synergi Hydro-RP 4 μ C ₁₈ , 80 Å (150 mm \times 4.6 mm d.i.)		
Fase mòbil	100 mM CH ₃ COOH/CH ₃ COO ⁻ , pH = 5.25		
Longitud d'ona de detecció	215 nm	215 nm	225 nm
Temps de retenció, t_R (min)	6,3	4,3	2,4
Repetibilitat en el t_R (% RSD, n = 8)	0,1	0,1	0,2
Repetibilitat en l'àrea de pic (% RSD, n = 8)	3,3	2,3	1,9
Interval de linealitat (M)	$6,3 \times 10^{-6} - 1,6 \times 10^{-4}$	–	$5,5 \times 10^{-6} - 1,1 \times 10^{-4}$
Coefficient de correlació (r^2)	0,9998	–	0,9999
LOD (M)	$4,3 \times 10^{-6}$	–	$1,3 \times 10^{-6}$
Columna	Gemini 5 μ C ₁₈ , 110 Å (150 mm \times 4.6 mm d.i.)		
Fase mòbil	MeOH : 20 mM TRIS, pH = 9.00 (2 : 98)		
Longitud d'ona de detecció	215 nm	215 nm	225 nm
Temps de retenció, t_R (min)	3,9	3,0	1,9
Repetibilitat en el t_R (% RSD, n = 8)	1,3	1,2	0,9
Repetibilitat en l'àrea de pic (% RSD, n = 8)	2,1	3,0	1,8
Interval de linealitat (M)	$8,3 \times 10^{-6} - 3,9 \times 10^{-4}$	–	$5,0 \times 10^{-6} - 3,3 \times 10^{-4}$
Coefficient de correlació (r^2)	0,9985	–	0,9998
LOD (M)	$2,3 \times 10^{-6}$	–	$5,7 \times 10^{-7}$

5.5.4. Caracterització dels sistemes d'alliberament controlat de 5-AZA/L-PLA

El principal problema que vam trobar era que paral·lelament a l'alliberament de la 5-AZA de la mostra, s'anava degradant en el si de la solució. Per tal de minimitzar aquest problema i poder seguir el procés d'alliberament en condicions dinàmiques de la 5-AZA recoberta amb PLA, es va desenvolupar un mètode en flux continu amb anàlisi cromatogràfic (apartat 3.2.4.4). L'avantatge que presenta un sistema en continu és la renovació constant de la solució d'alliberament. D'aquesta manera el temps de residència al vas d'alliberament és suficientment curt per evitar qualsevol procés de descomposició. A partir d'aquest sistema es va poder demostrar que la 5-AZA recoberta amb L-PLA presenta una estabilitat clarament superior al fàrmac pur. El recobriment protegeix raonablement el principi actiu d'una hidròlisi ràpida.

Quan el polímer que s'utilitza és hidròfil o soluble en aigua (com ho és l'L-PLA), l'etapa limitant de la velocitat d'alliberament del fàrmac ve governada per un procés de dissolució. A diferència dels sistemes d'alliberament controlats per difusió, aquests no segueixen cinètiques d'ordre zero, sinó que entren dins la classificació de sistemes d'alliberament pulsatius o sostinguts. Així doncs, la primera etapa consisteix en una hidratació del polímer i una posterior dissolució en el medi. A continuació les molècules del polímer es despleguen i és aleshores quan el fàrmac a l'interior de la matriu està immediatament disponible per a la dissolució i absorció. El temps d'hidratació d'un polímer és el temps que necessita per arribar a assolir la màxima viscositat en el solvent.

Els polímers solubles en aigua acostumen a ser àcids febles que contenen grups carboxílics en les seves unitats monomèriques. La dissolució d'aquests polímers s'afavoreix, doncs, quan el pH del medi de dissolució és superior al seu valor de pK_a . No obstant això, quan un polímer s'hidrata esdevé permeable al fàrmac encara que el pH de la solució sigui inferior al seu valor de pK_a i, per tant, inclús en medi àcid es pot obtenir un alliberament progressiu del fàrmac atrapat.

A part d'aquestes característiques pròpies del polímer usat, la velocitat de dissolució es pot modificar significativament amb la mida de partícula obtinguda de la precipitació del polímer amb la 5-AZA. Per això es va utilitzar la SEM, que ens va permetre observar la morfologia que presentaven les mostres després del tractament amb FSC. S'observa una reducció dràstica de les partícules de 5-AZA en comparació amb la mida de partícula del fàrmac pur. A través d'aquestes fotografies es va comprovar que el procés havia funcionat satisfactòriament i havia donat lloc a un recobriment de la 5-AZA amb l'L-PLA. A més a

més, el producte presentava grans aglomeracions de partícules. També es poden observar l'aspecte i les característiques morfològiques a nivell macroscòpic dels diferents compostos abans i després d'ésser precipitats amb el scCO_2 , mitjançant la realització de fotografies digitals (Figura 5.8).

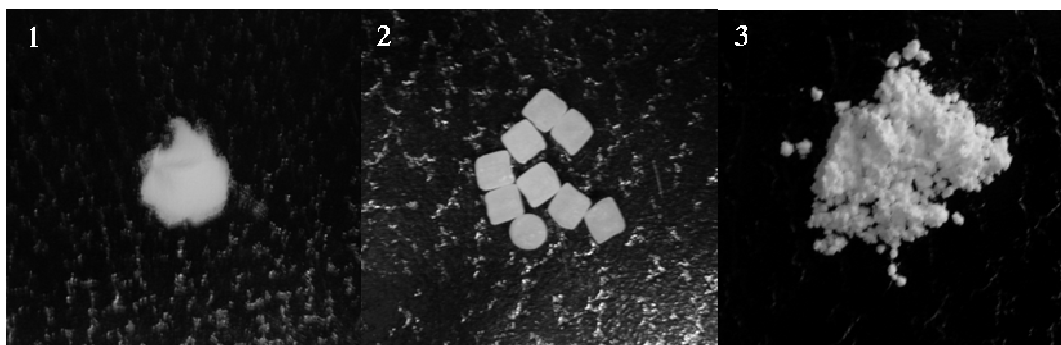


Figura 5.8. Fotografies realitzades amb una càmera digital dels diferents compostos: 1) 5-AZA pura en estat sòlid, 2) Grànuls d'L-PLA, 3) Sistema 5-AZA/L-PLA precipitat amb el scCO_2 .

Comparant els diferents comportaments del compost en els diferents medis de l'alliberament no s'observen canvis importants. El PLA és un polímer que el cos humà degrada amb facilitat sobretot en condicions fisiològiques, en ambdós pH estudiats. Aquests sistemes estan pensats per ser usats com a sistemes d'alliberament controlat per via oral en teràpies antitumorals. Proporcionen uns perfils d'alliberament sostingut, a diferència de les teràpies habituals per via oral en les quals el fàrmac pur assoliria un pic de concentració màxima en uns 30 min [10, 14] i a partir de llavors començaria a degradar-se irreversiblement. Amb el nostre sistema s'ha demostrat que inclús al cap de 7 h encara s'allibera una petita part de la 5-AZA (Figura 5.9, b).

Per mostrar de manera més clara el comportament de la 5-AZA en els processos estudiats en la Figura 5.9 es representen els perfils de concentració per a la 5-AZA. A tall d'exemple es mostren aquests perfils a pH 2. En primer lloc (Figura 5.9, a), la 5-AZA que és un compost molt polar ($\log P = -2,17$) es dissol quasi instantàniament en solució aquosa. A partir de llavors, comença a degradar-se de manera exponencial (pH 2: $y = 84,09\exp^{-0,35x}$, $r^2 = 0,9991$; pH 7,4: $y = 86,9\exp^{-0,28x}$, $r^2 = 0,9925$) amb el temps tan bon punt entra en contacte amb la solució. En segon lloc la 5-AZA es comença a alliberar de la mostra i aconsegueix un màxim entre la 1a i 2a hora d'estudi (el perfil de concentració no es mostra per no complicar la visualització dels resultats, veure figura 6b de l'article 5.4). A partir d'aleshores la 5-AZA alliberada a la solució comença a degradar-se i impedeix l'estudi acurat d'aquest procés. És per aquest motiu, que en tercer lloc es va decidir realitzar l'estudi

en condicions dinàmiques (Figura 5.9, b) i d'altra banda de manera similar a les condicions que trobaríem al cos humà. Així doncs, s'observa com realment la 5-AZA s'allibera entre aquestes dues primeres hores, però que aquest alliberament es manté de manera sostinguda fins a les 7 h.

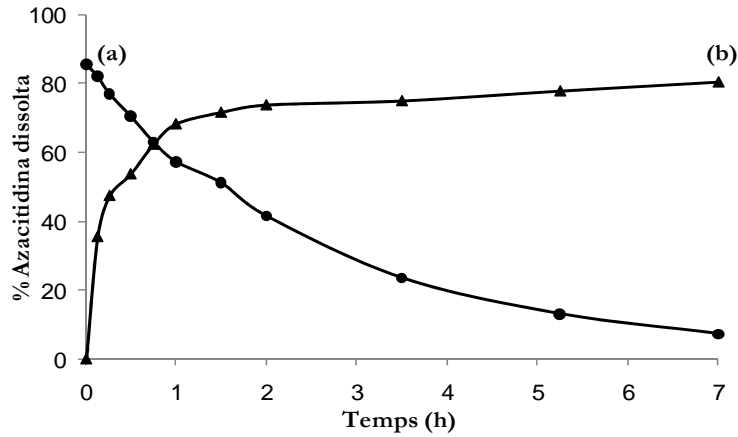


Figura 5.9. Perfils de concentració de la 5-AZA a pH 2. (a) Procés de dissolució/degradació de la 5-AZA; (b) Alliberament de la 5-AZA de l'PL-PLA utilitzant el sistema en flux continu descrit en l'article 5.4.

5.5.5. Caracterització del sistema d'alliberament 5-AZA, 5-FU/PLA, PLGA

A part del sistema d'alliberament estudiat en l'apartat anterior, es va preparar i caracteritzar un altre sistema que contenia 5-AZA i que també es va precipitar mitjançant la tecnologia SAS. Aquest nou sistema mixt està integrat per dos fàrmacs amb activitat antineoplàstica. La combinació de dos elements pretenia ser un sistema model destinat a potenciar l'acció terapèutica [15]. El 5-fluorouracil (5-FU) és un anàleg a la pirimidina que pertany a la família de fàrmacs anomenats antimetabòlits. Trobem en la bibliografia diversos procediments descrits per a l'atrapament del 5-FU en diferents sistemes polimèrics [16-18].

Els experiments es van dur a terme en el mateix aparell SAS en mode semicontinu descrit en l'article 5.4. El scCO_2 s'introduïa per la part de dalt de l'interior del reactor d'alta pressió a un cabal de $30 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. El flux de CO_2 sortia per la part de baix del reactor, on el producte precipitat es recol·lectava en un filtre de membrana col·locat a sobre d'un filtre d'acer inoxidable. La pressió a l'interior del reactor es controlava amb una vàlvula micromètrica i era de 127 bar. La temperatura es controlava amb camises calefactores elèctriques i era de 40 °C. La solució líquida es va polvoritzar a través d'un capil·lar de

0,5 mm de d.i mitjançant una bomba de pistons i a un cabal de $1,2 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Es va emprar una mescla de dos polímers, l'L-PLA i el PLGA, i una solució líquida de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMSO}$ on es van dissoldre tots els soluts. Tots ells presentaven una bona solubilitat en la mescla de solvents orgànics en proporció 1:1 i es per això que aquesta es va seleccionar com a medi de solució per a la precipitació amb SAS. La proporció dels diferents soluts va ser de: 18,5 % de 5-FU, 11,5 % de 5-AZA, 49 % d'L-PLA i 21 % de PLGA. El material obtingut de la precipitació es va recuperar en un 77,6 % i era un polsim de mida de gra gros. Les quantitats d'azacitidina i fluorouracil presents en el producte eren de 13,2 i 16,0 %, respectivament.

La caracterització que es va dur a terme és similar a la descrita anteriorment pel cas del sistema de 5-AZA/L-PLA. Es va emprar la cromatografia de líquids, la microscòpia electrònica de rastreig i l'anàlisi calorimètrica diferencial.

Les diferents morfologies obtingudes es poden observar mitjançant les fotografies realitzades amb SEM. Es mostren les formes morfològiques abans i després de la precipitació amb SAS i també el producte final amb la mescla de tots els components (Figura 5.10). El 5-FU presenta forma de barra; l'L-PLA i el PLGA, forma esfèrica i la 5-AZA, de partícules similars a flors. En aquest cas, semblava que s'havia obtingut més aviat una coprecipitació dels diferents components que no pas un encapsulament. No obstant, no es pot descartar un recobriment amb el PLGA. El 5-FU semblava estar majoritàriament lliure de polímer.

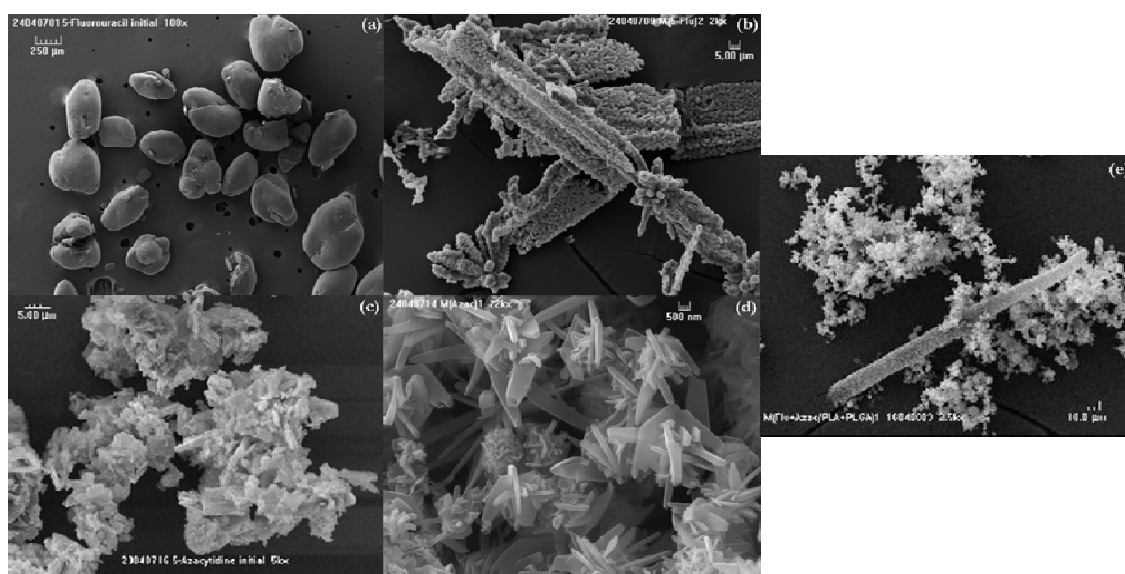


Figura 5.10. Fotografies SEM de: (a) 5-FU pur, (b) 5-FU en $\text{DMSO}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ precipitat mitjançant scCO_2 , (c) 5-AZA pura, (d) 5-AZA en $\text{DMSO}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ obtinguda amb scCO_2 i (e) PLA, PLGA/5-FU, 5-AZA precipitats amb SAS (21 mg/ml PLA i 9 mg/ml PLGA, 2.3 relació polímer/fàrmac).

Aquestes suposicions es van confirmar mitjançant l'anàlisi cromatogràfica. Així, tal com es mostra en l'estudi d'alliberament realitzat a pH 7,4 (Figura 5.11), un 60 % del 5-FU es dissolia ràpidament com a efecte *burst* (fracció equivalent al fàrmac lliure o no recobert), mentre que només un petit percentatge de compost (~ 40 %) es va alliberar en la primera hora d'alliberament. Tot i això, els estudis semblaven indicar que la 5-AZA s'alliberava progressivament, ja que s'havia recobert amb els polímers de manera bastant efectiva.

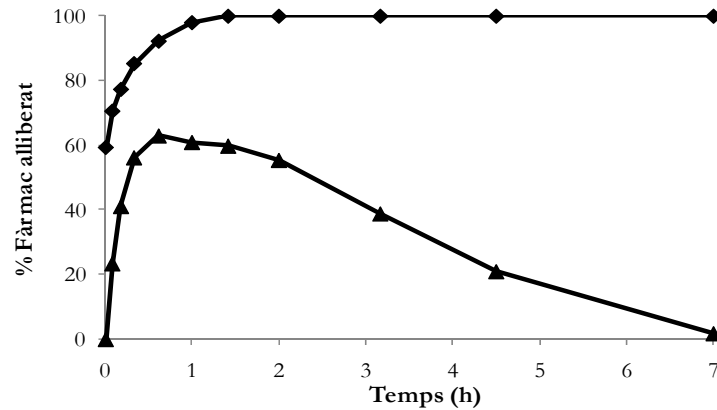


Figura 5.11. Perfil d'alliberament dels fàrmacs d'una mescla de 5-AZA + 5-FU/PLA + PLGA a pH 7,4.

Aquests resultats es van considerar insatisfactoris a causa de la ineficiència en el recobriment del 5-FU, que es trobava majoritàriament lliure de polímer i, en conseqüència, la dissolució en el medi era molt ràpida.

5.6. Bibliografia

1. Kaminskas, E., Farrell, A.T., Wang, Y.C., Sridhara, R., Pazdur, R., *FDA drug approval summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza(TM)) for injectable suspension*. *Oncologist*, 2005. **10**(3): p. 176-182.
2. Beisler, J.A., *Isolation, characterization, and properties of a labile hydrolysis product of anti-tumor nucleoside, 5-Azacytidine*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1978. **21**(2): p. 204-208.
3. Kuykendall, J.R., *5-Azacytidine and decitabine monotherapies of myelodysplastic disorders*. *Annals of Pharmacotherapy*, 2005. **39**(10): p. 1700-1709.
4. Sorm, F., Cihak, A., Vesely, J., Piskala, A., *5-Azacytidine new highly effective cancerostatic*. *Experientia*, 1964. **20**(4): p. 202-3.
5. Romanova, D., Novotny, L., *Chromatographic properties of cytosine, cytidine and their synthetic analogues*. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications*, 1996. **675**(1): p. 9-15.
6. Kissinger, L.D., Stemm, N.L., *Determination of the antileukemia agents Cytarabine and Azacitidine and their respective degradation products by high-performance liquid-chromatography*. *Journal of Chromatography*, 1986. **353**: p. 309-318.
7. Galushko, S.V., Shishkina, I.P., Alekseeva, I.V., *Relationship between retention parameters in reversed-phase high-performance liquid-chromatography and antitumor-activity of some pyrimidine-bases and nucleosides*. *Journal of Chromatography*, 1991. **547**(1-2): p. 161-166.
8. Rustum, A.M., Hoffman, N.E., *High-performance liquid-chromatographic determination of 5-azacytidine in plasma*. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications*, 1987. **421**(2): p. 387-391.
9. Kenneth, K.C., Donald, D.G., James, A.S., Wolfgang, S., *5-azacytidine hydrolysis kinetics measured by high-pressure liquid chromatography and carbon-13-NMR spectroscopy*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1979. **68**(7): p. 807-812.
10. Liu, Z.F., Marcucci, G., Byrd, J.C., Grever, M., Xiao, J., Chan, K.K., *Characterization of decomposition products and preclinical and low dose clinical pharmacokinetics of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) by a new liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantification method*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006. **20**(7): p. 1117-1126.
11. Rogstad, D.K., Herring, J.L., Theruvathu, J.A., Burdzy, A., Perry, C.C., Neidigh, J.W., Sowers, L.C., *Chemical Decomposition of 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine): Kinetic Analyses and Identification of Products by NMR, HPLC, and Mass Spectrometry*. *Chemical Research in Toxicology*, 2009. **22**(6): p. 1194-1204.
12. Robert, E.N., Joyce, L.D., *Kinetics and mechanisms of degradation of the antileukemic agent 5-azacytidine in aqueous solutions*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1975. **64**(7): p. 1148-1157.

13. Saurina, J., Hernandezcassou, S., Tauler, R., *Continuous-flow titration system for the generation of multivariate spectrophotometric data in the study of acid-base equilibria*. Analytica Chimica Acta, 1995. **312**(2): p. 189-198.
14. Zhao, M., Rudek, M.A., He, P., Hartke, C., Gore, S., Carducci, M.A., Baker, S.D., *Quantification of 5-azacytidine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry coupled with high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2004. **813**(1-2): p. 81-88.
15. Gupte, A., Ciftci, K., *Formulation and characterization of Paclitaxel, 5-FU and Paclitaxel + 5-FU microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **276**(1-2): p. 93-106.
16. Lamprecht, A., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Kawashima, Y., *Microsphere design for the colonic delivery of 5-fluorouracil*. Journal of Controlled Release, 2003. **90**(3): p. 313-322.
17. Bozkir, A., Saka, O. M., *Formulation and investigation of 5-FU nanoparticles with factorial design-based studies*. Il Farmaco, 2005. **60**(10): p. 840-846.
18. Zambito, Y., Baggiani, A., Carelli, V., Serafini, M. F., Di Colo, G., *Matrices for site-specific controlled-delivery of 5-fluorouracil to descending colon*. Journal of Controlled Release, 2005. **102**(3): p. 669-677.

CAPÍTOL 6

**Preparació i caracterització de
fàrmacs amb aplicacions
tòpiques i transdèrmiques:
cel·la de difusió de Franz**

6.1. Introducció

En aquest capítol s'han desenvolupat dos sistemes pensats per a aplicacions tòpiques i transdèrmiques. Aquestes vies d'administració es confonen molt sovint i per això és important definir-les. La via tòpica busca fonamentalment l'efecte a nivell local, sense interessar l'absorció dels principis actius. En canvi, la via transdèrmica o percutània busca l'absorció del fàrmac, mitjançant l'aplicació de pegats, a través de la pell fins a arribar als capil·lars dèrmics on passarà a la circulació sistèmica. Així, s'empra en aquells medicaments en què es vol aconseguir un efecte mantingut en el temps amb un alliberament del principi actiu de manera regular i constant.

La pell humana té una funció de barrera protectora i, a conseqüència d'això, presenta certes limitacions fisicoquímiques en referència al tipus de substàncies que la poden travessar. Si es vol alliberar un fàrmac a través de la pell, s'han de complir bàsicament dues condicions: que sigui lipòfil ($\log P = 1-3$) i que el seu pes molecular sigui baix (<500 Da). El nombre de productes disponibles comercialment basats en alliberaments dèrmics o transdèrmics està limitat, doncs, per aquests requisits. Durant els últims anys han aparegut diverses estratègies passives i actives per tal de millorar i/o modular aquests alliberaments. Les noves estratègies passives consisteixen en l'optimització de les formulacions o del tipus de transportador del fàrmac per tal d'incrementar la seva permeabilitat a la pell. No obstant això, els mètodes passius no milloren la permeabilitat en el cas de fàrmacs amb pesos moleculars >500 Da. És per aquest motiu que avui en dia estan sorgint un gran nombre de mètodes actius per a la millora de l'alliberament, com per exemple la ionoforesi, l'electroporació i els ultrasons [1].

Es poden trobar diversos tipus de formulacions transdèrmiques, entre les més comunes destaquem: gels, potenciadors de la penetració, liposomes, nanopartícules, pegats i electrotransportadors.

Actualment la indústria farmacèutica i la cosmètica estan treballant en el desenvolupament de noves estratègies per a la formulació i el processament de nous productes amb aplicacions tòpiques de principis actius [2]. Per al tractament de malalties de la pell, i sempre que sigui possible, és preferible la via tòpica a la oral o la parenteral, ja que es poden obtenir nivells alts de concentració al lloc d'aplicació minimitzant els efectes secundaris sistèmics [3]. Entre els diferents estudis realitzats, els sistemes d'alliberament de fàrmacs amb matrius polimèriques i de base lípida han esdevingut de gran interès per a la formulació de medicaments i cosmètics. Els lípids, típicament àcids grassos saturats i

insaturats o derivats, són en general ben tolerats pel cos humà gràcies a una ràpida metabolització a compostos sense toxicitat [4, 5].

Els fàrmacs escollits per a la preparació dels sistemes model d'aquest capítol són el naproxèn (NAP) i el ketoprofèn (KET), de la família dels antiinflamatoris no esteroïdals (AINE), i presenten les característiques fisicoquímiques adequades per poder travessar la pell. Aquests dos fàrmacs han estat classificats com a classe 2 en el BCS, és a dir, de permeabilitat elevada però poc solubles en aigua. Els AINE tenen propietats antiinflamatòries, analgèsiques i antipirètiques. La teràpia amb AINE és molt efectiva, però el seu ús és sovint limitat ja que produeixen efectes adversos com la irritació i la ulceració de la mucosa gastrointestinal. L'administració d'aquests fàrmacs per via dèrmica pot ajudar a evitar els desavantatges de la via oral i mantenir amb una sola dosi els nivells de MEC relativament alts en teràpies de llarga durada [6].

El primer tipus de sistema que es va desenvolupar va ser un pegat transdèrmic, pensat com a prototip de sistema d'alliberament controlat de NAP. Un pegat és una matriu formada normalment per quatre capes. (a) Un dipòsit amb el principi actiu i els excipients per modular l'absorció. (b) Una capa adhesiva o superfície per a la fixació del dispositiu a la pell. (c) Un sistema controlador de l'alliberació que a vegades és una membrana o barrera de difusió, i en altres casos, una matriu. En qualsevol cas, està formada per material polimèric i actua d'acord a un programa terapèutic predeterminat. (d) Una coberta o pel·lícula protectora del sistema, normalment impermeable.

Es van elaborar diversos pegats primis i flexibles formats per una mescla dels polímers EVA i Eudragit E100. El naproxèn va ser immobilitzat mitjançant CO₂ pressuritzat. Així doncs, l'Eudragit tenia la funció d'agent retardant de l'alliberament del naproxèn i l'EVA feia la doble funció de dipòsit del principi actiu i capa adhesiva.

El segon tipus de sistema que es va elaborar i caracteritzar consisteix en un conjunt de mostres de partícules amb KET com a principi actiu generades amb un equip específic que utilitza CO₂ supercrític. El KET és un fàrmac hidròfob que es troba normalment en forma de comprimit per a l'administració oral i de gel per a aplicacions tòpiques. En aquest cas es va escollir una matriu lipídica formada per una mescla de dos triglicèrids de 18 carbonis, el monoestearat de glicerol i l'oli de ricí hidrogenat. Ambdós s'utilitzen sovint en la indústria farmacèutica i la cosmètica. La mescla dels dos lípids és preferible a una matriu individual d'un sol component, ja que així es poden formar cristalls amb imperfeccions que generen espais per tal d'acomodar fàrmac i additius. És a dir, la matriu actua com a agent d'atrapament i transportadora del fàrmac. Es van incorporar additius antiaglutinants de

nanopartícules silanitzades supercríticament de diòxid de titani (TiO_2) [7] a la matriu lipídica. Aquest material és també efectiu com a filtre UV i pot augmentar l'estabilitat química de certs compostos sensibles a la llum, l'oxidació o la hidròlisi. En la Figura 6.1 es pot observar un esquema dels diferents components de les partícules de lípid sòlides.

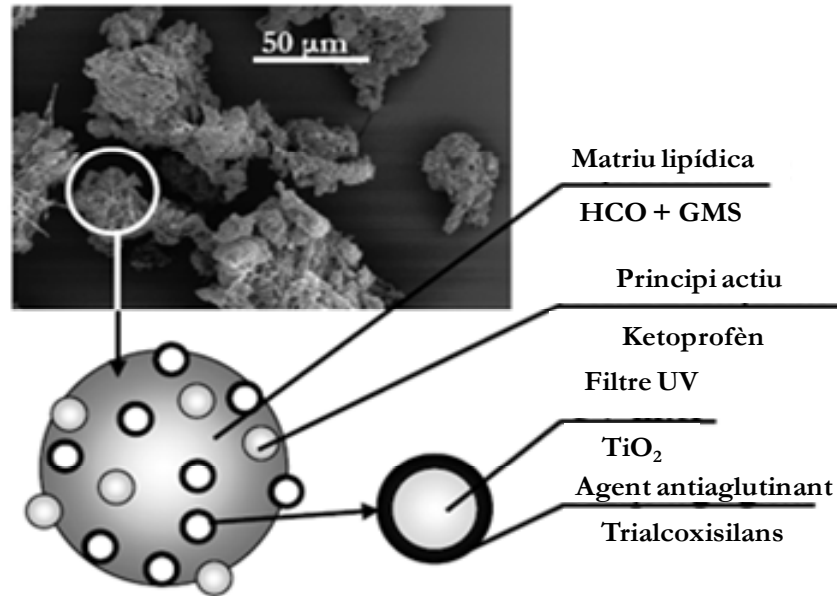


Figura 6.1. Esquema de les partícules lipídiques que contenen atrapats l'agent antiaglutinant i el compost actiu.

Les tècniques utilitzades per dur a terme la caracterització d'aquests sistemes van ser la DSC, la microscòpia confocal de fluorescència i la cromatografia de líquids (HPLC) amb detecció ultraviolada i fluorescència. A més a més, en la biografia també es fan servir altres tècniques com la termogravimetria, la microscòpia electrònica de transmissió, la microscòpia electrònica de rastreig amb espectrometria d'energia dispersiva, la difracció de raigs X i l'espectroscòpia UV-vis.

Una part de la feina experimental d'aquest capítol es va realitzar durant l'estada de doctorat als Estats Units al laboratori de fluids supercrítics a The Ohio State University (Columbus, OH). Les mostres de partícules sòlides de base lipídica caracteritzades en el segon article d'aquest capítol van ser preparades a l'Institut de Biologia Experimental i Tecnològica i a l'Institut de Tecnologia Química i Biològica, ambdós a Portugal (IBET-ITQB).

**6.2. Development of a polymeric patch impregnated with naproxen as a
model of transdermal sustained release system**

Anna Argemí, Jeffrey L. Ellis, Javier Saurina, David L. Tomasko
Journal of Pharmaceutical Sciences, DOI 10.1002/jps22346

6.3. Evaluation of release profiles of ketoprofen entrapped in solid lipid particles as a model of topical formulation using a Franz diffusion cell

Anna Argemí, Concepción Domingo, Javier Saurina, Ana Raquel Sampaio de Sousa,
Catarina M. M. Duarte, Carlos A. García-González

Enviat

6.4. Altres estudis i discussió de resultats

6.4.1. Desenvolupament de mètodes cromatogràfics per a la determinació de ketoprofèn i naproxèn

Sempre que s'estudia qualsevol compost és essencial tenir un bon coneixement de la susceptibilitat d'aquest de degradar-se. Diversos estudis han demostrat que el KET en solució és fotodegradable quan s'exposa a la llum (veure Figura 6.2). Experimentalment hem observat que en dos dies d'exposició a la llum a 25 °C presenta una degradació de més del 80 %. Cal tenir en compte en el desenvolupament del mètode analític que es poden generar uns productes de degradació que s'han de controlar adequadament. Així doncs, un cop localitzats i identificats aquests subproductes, es va optimitzar la separació cromatogràfica per a l'anàlisi del KET en solució. El mètode establert separa els potencials pics de degradació del pic de KET i és suficientment acurat, específic i precís.

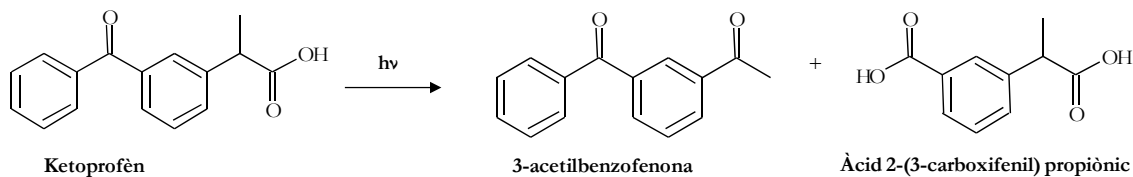


Figura 6.2. Productes de degradació en solució aquosa del KET després de l'exposició a la llum [8, 9].

El KET té un valor de pK_a de 4,2 i és un compost bastant apolar ($\log P = 2,8$). En conseqüència, la fase mòbil havia d'estar formada per un percentatge alt de fase orgànica i baix de fase aquosa. Com a part aquosa de la fase mòbil es va preparar una solució amb un valor de pH inferior al valor de pK_a del KET. D'aquesta manera el KET es troba en forma neutra i interacciona amb la fase invertida de la columna cromatogràfica. Es va utilitzar, doncs, una solució amortidora d' $HCOOH/HCOO^-$ 10 mM a pH 3,2 i seguidament es va estudiar com afectava la proporció de metanol en la separació dels diferents anàlits. El percentatge de solvent orgànic es va variar de 60 a 80 % i es va observar una millor resolució en els pics cromatogràfics quan utilitzàvem un 70 % de metanol. En variar la proporció de metanol canvia l'ordre d'elució dels compostos (Figura 6.3, observeu diferències de 60 a 65 % de metanol), possiblement a causa de la variació del pH de la fase mòbil i de la diferent mobilitat en funció de si es troben en forma ionitzada o neutra.

El NAP és un fàrmac de la mateixa família que el KET i presenta unes característiques molt semblants. El NAP ($\log P = 3$) és una mica més apolar que el KET. Per aquest motiu es va decidir utilitzar el mateix mètode cromatogràfic amb un 10 % més de metanol a la fase mòbil. Així doncs, la fase mòbil final estava composta d'una mescla de 80 % MeOH : 20 % HCOOH/HCOO⁻ 10 mM a pH 3,2.

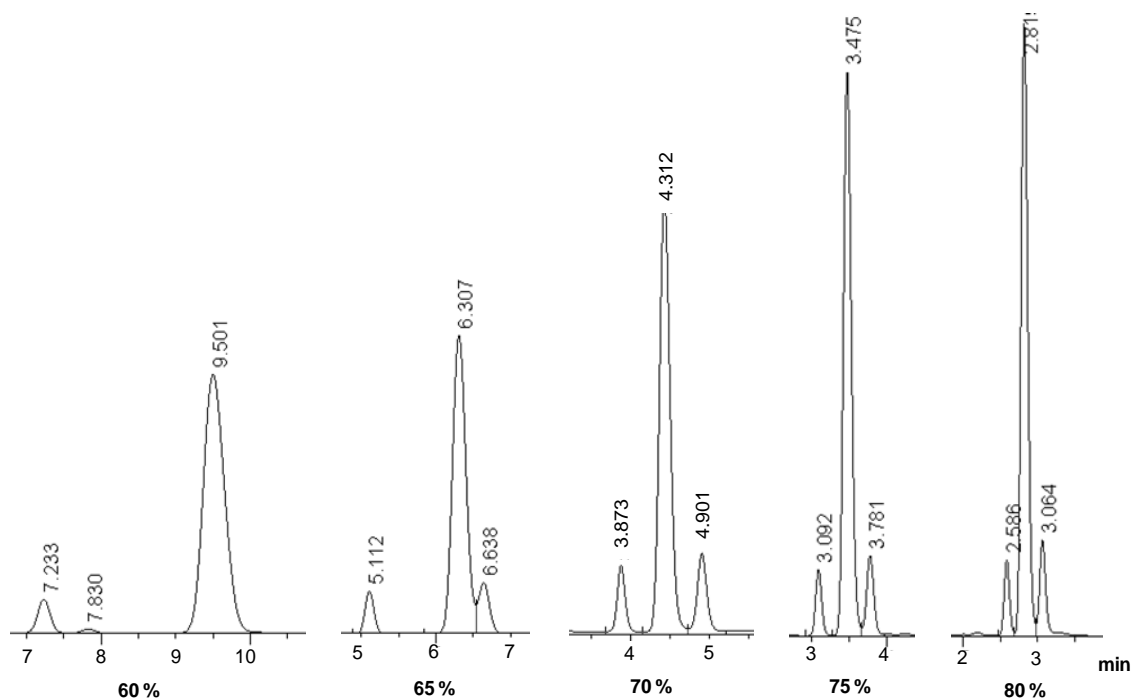


Figura 6.3. Cromatogrames on es mostra com afecta la variació del percentatge de fase orgànica en els temps de retenció i la separació del KET i els possibles compostos de degradació ($\lambda = 266$ nm).

En el cas del detector de fluorescència es van buscar les longituds d'ona d'excitació i emissió òptimes del NAP i es va utilitzar un temps de resposta adequat. Com que el segon màxim d'absorbància del naproxèn es troba a 270 nm, es va fixar aquesta longitud d'ona d'excitació i es van recollir els espectres d'emissió en mode de multiemissió. Els cromatogrames obtinguts a les diferents longituds d'ones d'emissió es mostren a la Figura 6.4.

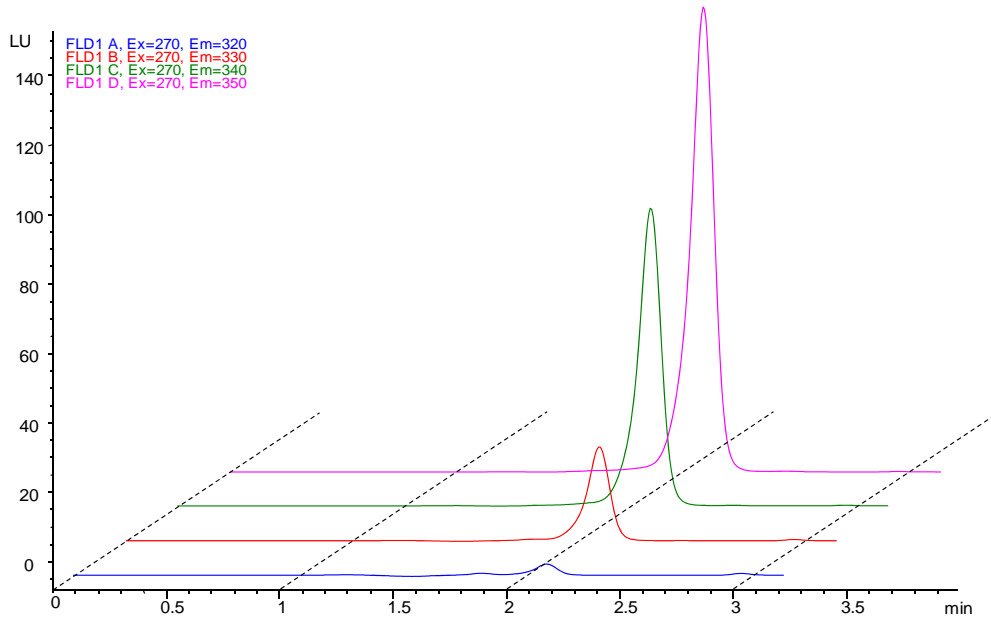


Figura 6.4. Cromatogrames del pic de naproxèn obtinguts a diferents longituds d'ona d'emissió.

La longitud d'ona d'emissió màxima determinada a través de l'espectre d'emissió és 357 nm. A continuació es va procedir a seleccionar el millor temps de resposta. Els detectors de fluorescència d'un HPLC acostumen a funcionar normalment amb temps de resposta de 2 a 4 segons. A menors temps de resposta, major és la relació senyal/soroll. Encara que els temps de resposta curts només es fan servir per a anàlisis d'alta velocitat. Cal tenir en compte també que, inclús si el temps de resposta és massa elevat, els pics seran més petits i més amples. Així doncs, després d'estudiar possibles temps de resposta, ens vam quedar amb un valor de 4 s, que d'altra banda és el valor que s'utilitza habitualment per a condicions cromatogràfiques estàndards.

Una vegada optimitzades les condicions cromatogràfiques dels mètodes per al NAP i el KET, es van establir els diferents paràmetres de qualitat i es van realitzar les respectives validacions. Aquests resultats es mostren en la Taula 6.1.

El tractament de les mostres de KET es basava en la separació del fàrmac atrapat per la matriu lipídica. Per poder separar l'anàlit dels lípids, el ketoprofèn es va extreure amb una mescla de MeOH:H₂O (1:1) que dissolia la matriu lipídica. L'ús del vòrtex facilita aquesta dissolució. A continuació la mescla es va centrifugar per tal de precipitar els lípids al fons dels tubs de centrífuga i poder separar físicament la mescla. D'aquesta manera el KET queda dissolt en la solució resultant. Aquest tractament de mostra es troba detallat en l'article 6.3.

Per tal de determinar la quantitat de NAP atrapat en la matriu polimèrica es van emprar uns 30-40 mg de mostra que es van dissoldre en 10 ml de CH₂Cl₂ en un bany

d'ultrasons durant 1 hora. A continuació, el solvent es va evaporar amb nitrogen fins a sequedat i el residu sec es va redissoldre amb 25 ml de metanol. Aquest tractament de mostra es troba descrit en l'article 6.2.

Taula 6.1. Paràmetres de qualitat establerts per als mètodes cromatogràfics desenvolupats. DAD: detecció per UV. FLD: detecció per fluorescència.

	Naproxèn	Ketoprofèn
Columna	Synergi Hydro-RP 4 μ C ₁₈ , 80 Å (150 mm \times 4,6 mm d.i.)	
Fase mòbil	MeOH:10 mM HCOOH/HCOO ⁻ a pH 3,20 (80:20)	MeOH:10 mM HCOOH/HCOO ⁻ a pH 3,20 (70:30)
Longitud d'ona de detecció	DAD: 270 nm FLD: Exc. a 270 nm i Em. a 357 nm	266 nm
Temps de retenció (t_R)	DAD: 2,5 FLD: 2,6	4,3
Repetibilitat en el t_R (% RSD, n = 8)	DAD: 0,4 FLD: 0,5	0,9
Repetibilitat en l'àrea de pic (% RSD, n = 8)	DAD: 2,1 FLD: 1,5	1,4
Interval de linealitat	DAD: $5,2 \times 10^{-7} - 3,9 \times 10^{-5}$ M FLD: $1,3 \times 10^{-6} - 1,2 \times 10^{-5}$ M	$3,4 \times 10^{-7} - 6,8 \times 10^{-5}$ M
Coefficient de correlació (r^2)	DAD: 0,9989 FLD: 0,9988	0,9996
Límit de detecció (LOD)	DAD: $1,8 \times 10^{-7}$ M FLD: $1,1 \times 10^{-7}$ M	$2,3 \times 10^{-7}$ M

6.4.2. Estudis d'impregnació del pegat de naproxèn

Les condicions experimentals per a la impregnació del pegat transdèrmic es van estudiar prèviament amb un compost model, la rodamina, que ens permetia observar visualment les característiques de les mostres resultants. Una vegada es va obtenir una distribució prou satisfactòria de la rodamina a la superfície de la matriu, es va passar a realitzar el disseny experimental per a l'elaboració dels pegats de NAP. Aquests estudis previs, tot i que van ser de tipus qualitatiu, ens van permetre escollir algunes condicions experimentals (veure Figura 6.5).

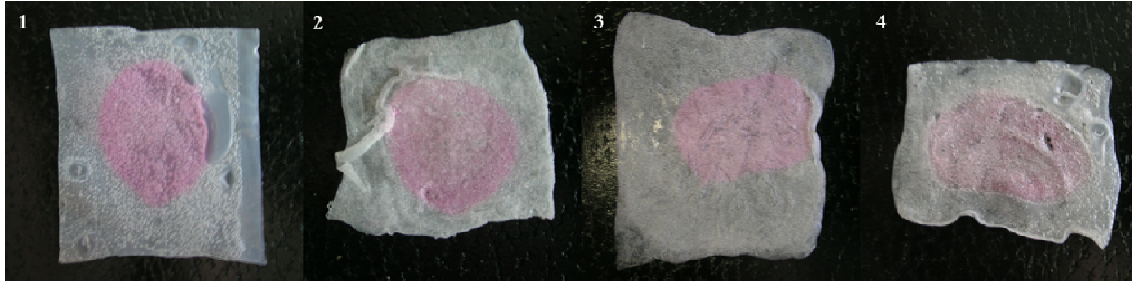


Figura 6.5. Fotografies dels pegats impregnats amb rodamina. Les diferents mostres es van pretractar a 1000 psi durant 2 h i es van impregnar amb rodamina a 450 psi, 22 °C i durant 2 h.

Els pegats es van preparar en dues etapes: la primera enfocada a la preactivació de la superfície i la segona a la impregnació del fàrmac. Les condicions experimentals de la segona etapa es van estudiar mitjançant un disseny factorial de dos nivells i tres variables (2^3) per optimitzar les condicions de pressió, temperatura i temps. El nivell alt (+) i baix (-) de cada variable es van escollir com es mostra a continuació: $P(+)$ = 1000 psi i $P(-)$ = 450 psi; $T(+)$ = 37 °C i $T(-)$ = 22 °C; $t(+)$ = 6 h i $t(-)$ = 2.5 h. Per a cada experiment es van determinar el percentatge total d'impregnació (w/w, g NAP/g mostra) i el rendiment d'impregnació (% NAP impregnat/NAP afegit) amb la metodologia descrita en l'article 6.2. Les dades obtingudes com a rendiment d'impregnació es van utilitzar per a una primera avaluació de les condicions de processament òptim i aquests resultats es mostren en la Taula 6.2.

Taula 6.2. Taula resum de les diferents mostres dels pegats de NAP estudiades.

Mostra	Pressió (psi)	Temperatura (°C)	Temps (h)	Rendiment per UV (%)	Rendiment per FLD (%)
Exp 1	450	22	2.5	25.9 ± 0.8	28.7 ± 0.9
Exp 2	450	37	2.5	60.6 ± 0.5	63.5 ± 0.5
Exp 3	1000	22	2.5	57.4 ± 0.1	60.2 ± 0.1
Exp 4	1000	37	2.5	24.3 ± 0.2	27.1 ± 0.2
Exp 5	450	22	6	45.7 ± 0.1	49.6 ± 0.2
Exp 6	450	37	6	61.1 ± 0.3	63.4 ± 0.3
Exp 7	1000	22	6	27.4 ± 0.4	27.4 ± 0.5
Exp 8	1000	37	6	36.0 ± 0.3	36.7 ± 0.3

L'avaluació estadística dels resultats experimentals ens va portar a la conclusió que els efectes més importants es produeixen amb la temperatura i la interacció pressió-temperatura. Si ens fixem en la temperatura, en general observem que els rendiments d'impregnació augmenten amb la temperatura. El temps d'impregnació no va resultar un paràmetre important en l'interval estudiat. Aquesta conclusió es va atribuir al fet que

L'equilibri s'assolia en menys de 2.5 h i, en conseqüència, temps de processament majors no milloraven la impregnació. L'efecte de la pressió tampoc va ser rellevant, tot i que a 37 °C i pressió baixa es van obtenir les impregnacions més altes. Malgrat que els resultats podrien admetre diferents interpretacions, els rendiments d'impregnació millors corresponien als experiments 2 i 6, que es van realitzar a pressió baixa i temperatura alta. Així, si haguéssim d'escollir entre els dos experiments, aquell més recomanable seria el que presentés un temps experimental més curt, òbviament pels menors costos econòmics.

Els pegats presentaven impregnacions al voltant de l'1 % de naproxèn. Aquest era un valor esperat, ja que el % teòric de naproxèn utilitzat va ser de 1.4 %, aproximadament. Les dimensions del pegat ($4 \times 4 \text{ cm}^2$) no permetien treballar amb quantitats de naproxèn més elevades. De totes maneres, aquest és un valor completament adequat, ja que les formulacions tòpiques comercials contenen quantitats entre un 1 i un 10 %. Quantitats superiors de naproxèn podrien provocar irritacions a la pell.

Les membranes utilitzades en els estudis de difusió *in vitro* haurien de ser disponibles comercialment, presentar poca afinitat pel fàrmac, tenir poca tendència per a interaccionar amb el medi d'alliberament i no mostrar resistència difusional. Les membranes sintètiques disponibles comercialment presenten l'avantatge de ser homogènies i uniformes, propietats que no compleixen les membranes biològiques. Per realitzar aquests estudis de difusió es va seleccionar una membrana sintètica i inert de niló amb una mida de porus de $0.45 \mu\text{m}$ i un gruix de $150 \mu\text{m}$. La membrana es va tallar per tal d'ajustar-se a l'obertura a través de la qual té lloc la difusió en la cel·la de Franz. Es va provar també una membrana de cel·lulosa regenerada, però els fàrmacs en estudi es difonien millor en la de niló.

A continuació es mostren les imatges fetes amb una càmera digital dels diferents pegats impregnats amb naproxèn (Figura 6.6). En aquestes imatges s'observa la morfologia de les mostres a nivell macroscòpic i permeten al lector fer-se una idea dels diferents processos que succeeixen durant l'elaboració del pegat. L'experiment 7 és un clar exemple de la generació de porositats (en anglès el terme científic que s'utilitza és *foaming*) en la superfície de la matriu polimèrica. Aquests porus es generen com a conseqüència d'una alliberació molt ràpida (4 s) del CO_2 de l'interior del reactor, que s'hauria solubilitzat prèviament en la mescla polimèrica. Les porositats generades contribueixen a millorar el procés d'impregnació, ja que permeten el pas de la solució de naproxèn a través dels porus de la matriu polimèrica.

D'altra banda, els experiments 1 i 3 són un bon exemple de com es va produir la impregnació en la majoria de les mostres. Així doncs, el centre del pegat es correspon amb la part de major impregnació, mentre que a les puntes es produeix una menor impregnació. Les parts al voltant del centre del pegat contenen valors intermedis de NAP. Aquest comportament és absolutament coherent, ja que la solució de NAP va ser abocada al centre del pegat, amb la qual cosa aquesta àrea és la que contenia una major quantitat de NAP.

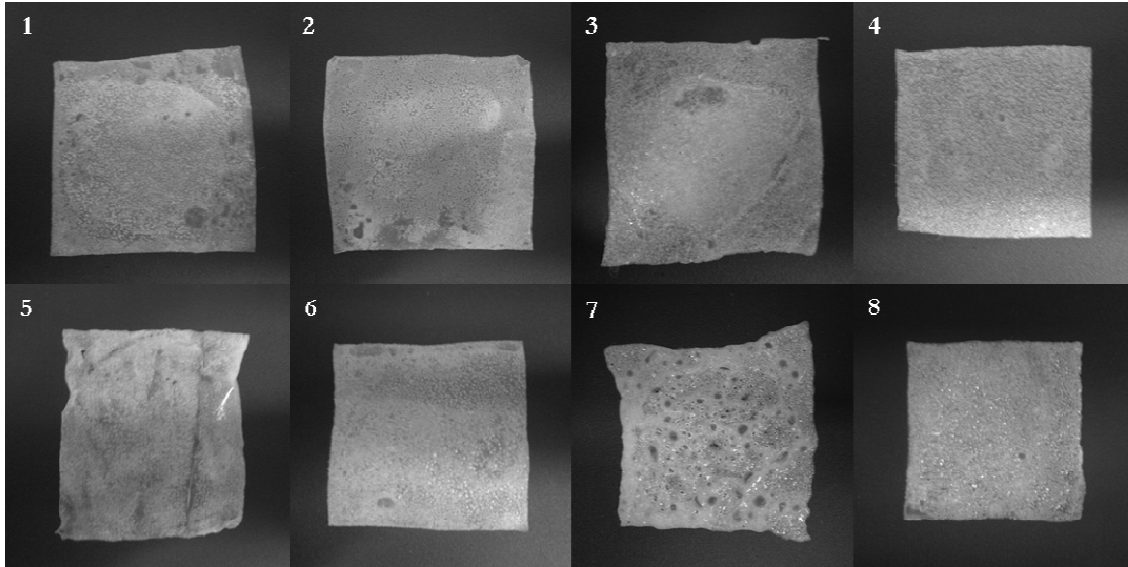


Figura 6.6. Fotografies dels pegats impregnats amb NAP. Els números corresponen als diferents experiments del disseny factorial.

6.4.3. Estudi d'altres sistemes preparats amb PGSS®

A part de les dues mostres estudiades anteriorment, es van caracteritzar altres sistemes precipitats mitjançant la tecnologia PGSS®. Aquestes noves formulacions híbrides de partícules lipídiques sòlides (SLP) estan formades pels mateixos components mostrats en la Figura 6.1, canviant simplement el principi actiu. Enlloc del KET es van provar la cafeïna (CAF) i el glutatió (GSH) com a substàncies hidròfiles actives amb propietats contra l'envelliment de la pell a conseqüència d'una exposició solar prolongada [10, 11]. Es va fer un estudi comparatiu amb algunes de les mostres de KET caracteritzades en l'article 6.3. Es van escollir aquests tres agents actius com a compostos model per a l'encapsulament en matrius lipídiques amb motiu de les seves diferents propietats lipòfiles. El coeficient logarítmic de partició en octanol aigua o $\log P$ és de 2,8, 0,9 i -0,5 per al KET [12],

el GSH [13] i la CAF [14], respectivament. Els tests de dissolució es van estudiar en aigua per analitzar l'eficiència en l'encapsulament de la mescla lípídica seleccionada.

La determinació del percentatge de fàrmac atrapat és anàloga a la descrita pel KET amb petites variacions en les quantitats pesades i els solvents utilitzats. Es van pesar de 50 a 100 mg de mostres que contenien CAF i es van tractar amb 20 ml d'una mescla d'etanol i aigua (1:1 v/v) a 40 °C, seguint un mètode descrit en la literatura [15]. De la mateixa manera, uns 10-20 mg de mostra de GSH es va tractar amb 10 ml d'aigua doblement desionitzada. Les mostres es van agitar en un vòrtex, es van centrifugar 5 min a 3500 rpm i es van filtrar a través d'un filtre de niló 0,45 µm. Un volum de 20 µl de cada mostra es va injectar en el sistema HPLC per a la seva quantificació. Les solucions patró de CAF es van preparar en MeOH i les de GSH en aigua. Els LOD es van estimar a partir d'una relació senyal/soroll de 3. La repetitivitat en els temps de retenció i àrees de pic es va calcular per a 8 replicats.

L'alliberament es va estudiar de manera preliminar mitjançant test de dissolució en aigua. El GSH (20 mg), el KET i la CAF (~ 10 mg) es van abocar en 200 ml d'aigua doblement desionitzada. La velocitat d'agitació es va fixar a 70 rpm. Els diferents processos es van seguir per tal d'obtenir els corresponents perfils de dissolució. Amb aquest propòsit, s'extreien 500 µl de la solució a diferents períodes de temps, es filtraven i s'analitzaven amb HPLC. Immediatament es reomplien amb el mateix volum extret d'aigua els vasos d'alliberament per tal de mantenir el mateix nivell del líquid.

La formulació química de les mescles abans i després de la precipitació de les SLP híbrides es mostra en la Taula 6.3. Els experiments amb la mescla formada per $GMS:HCO:TiO_2:xCAF$ es van provar amb continguts de x de 9 o 17 % en pes. Per la mostra processada amb un 9 % en pes de CAF, l'anàlisi amb HPLC va indicar que el contingut de fàrmac era de 4,2 % en pes, valor que correspon a un 50 % de la quantitat introduïda inicialment. La pèrdua de CAF està associada a l'alta solubilitat d'aquesta en $scCO_2$ en les condicions experimentals [16] i la posterior precipitació a l'interior del reactor de mescla durant la descompressió [17, 18]. Per tal d'augmentar aquest percentatge es va incrementar la quantitat de CAF inicial i es va afegir també certa quantitat d'aigua (mostra $GMS:HCO:TiO_2:10CAF/w$) per aconseguir una emulsió amb els lípids prèvia a l'expansió. D'aquesta manera es va aconseguir que quasi tota la quantitat de CAF afegida inicialment es trobés en la mostra precipitada final, ja que la solubilitat en $scCO_2$ de la CAF hidratada s'havia reduït amb respecte a la CAF anhidre.

Taula 6.3. Quantitats dels additius afegits a la mescla lipídica per al procés PGSS® i resultats obtinguts per a les diferents mostres preparades.

Mostres	% Mescla processada			% SLP precipitades		50 % fàrmac dissolt
	TiO ₂	Fàrmac	H ₂ O	TiO ₂	Fàrmac	t _{1/2} (h)
GMS:HCO:TiO₂:9CAF	5	9	-	5,7	4,2	0,89
GMS:HCO:TiO₂:17CAF	5	17	-	5,7	3,6	-
GMS:HCO:TiO₂:10CAF/w	3	10	40	6,8	12,5 ¹	0,15
GMS:HCO:TiO₂:9GSH	5	9	-	7,9	5,6	0,12
GMS:HCO:TiO₂:9KET	5	9	-	5,1	8,6	-
GMS:HCO:TiO₂:16KET	5	16	-	5,3	16,1	> 24

1) Cafeïna hidratada (C₈H₁₀N₄O₂·0,8H₂O).

Es van dur a terme experiments similars amb la mescla de compostos GMS:HCO:TiO₂:9GSH (9 % en pes de GSH). La mostra resultant contenia un 5,6 % en pes de fàrmac. Aquí no es va poder afegir aigua als lípids per incrementar la quantitat de fàrmac atrapat, ja que el GSH experimenta una ràpida oxidació en solucions aquoses [19]. És més, les mostres de GSH per a ús farmacèutic s'haurien de protegir de la llum i mantenir en fresc fins a la seva administració. Per aquest motiu es va dur a terme un test preliminar d'estabilitat amb les partícules de GSH coprecipitades amb PGSS®. La mostra es va mantenir a temperatura ambient en un recipient tancat durant 2 mesos. Després d'aquest temps, l'anàlisi HPLC només va mostrar un 1 % de GSH oxidat comparat amb el GSH pur sotmès a les mateixes condicions.

Finalment, el KET es va processar en una mescla de GMS:HCO:TiO₂:xKET (x = 9 o 16 % en pes). L'anàlisi HPLC va indicar que el contingut de KET en les mostres precipitades era de 8,6 i 16,1 % en pes, respectivament.

Es va realitzar un test de dissolució *in vitro* per tal d'investigar l'eficiència de l'encapsulament dels tres fàrmacs estudiats. S'esperava que els sistemes obtinguts es dissoldrien en el medi de manera prolongada mentre que els principis actius amb una baixa quantitat d'encapsulament s'haurien d'haver dissolt ràpidament tal com els fàrmacs purs ho fan. Aquest procés de difusió va ser estudiat en el temps mitjançant HPLC. El temps de semivida (t_{1/2}, 50 % de fàrmac dissolt) es va emprar com a mesura pràctica per comparar els diferents sistemes estudiats (Taula 6.3). Es van obtenir t_{1/2} petits per als fàrmacs purs estudiats en condicions experimentals similars.

La mostra que contenia CAF hidratada es va dissoldre ràpidament i sobtada (t_{1/2} = 9 min), el que indica que aquesta es trobava tota precipitada a la superfície lipídica (Figura 6.7). En canvi, un alliberament més sostingut (t_{1/2} = 53 min) es va observar per la mostra de

CAF anhidre, que presentava un efecte *burst* inicial d'un 40 a 50 %. Així, una part de la CAF es trobava precipitada a la superfície de les partícules, mentre que una altra era al centre dels lípids. La figura també mostra el perfil de dissolució de la mostra amb GSH, el qual es va dissoldre molt ràpidament ($t_{1/2} = 7$ min) com a clar exemple d'efecte *burst*. L'alliberament del KET diferia considerablement de tots aquests comportaments previs. La mostra GMS:HCO:TiO₂:16KET mostrava un *burst* inicial del 15 %, però la resta del fàrmac es va dissoldre de manera prolongada ($t_{1/2} > 24$ h). Aquest comportament s'ajusta perfectament al model sòlid/dissolució [20], que suggereix que el fàrmac s'ha dispersat molecularment en la matriu lipídica. Així doncs, el sistema amb KET va ser el que va mostrar un comportament més satisfactori per a ser usat en aplicacions tòpiques per a alliberaments sostinguts de fàrmacs. És precisament aquest el principal motiu pel qual es va escollir aquest sistema per als anteriors estudis en profunditat mitjançant la cel·la de Franz.

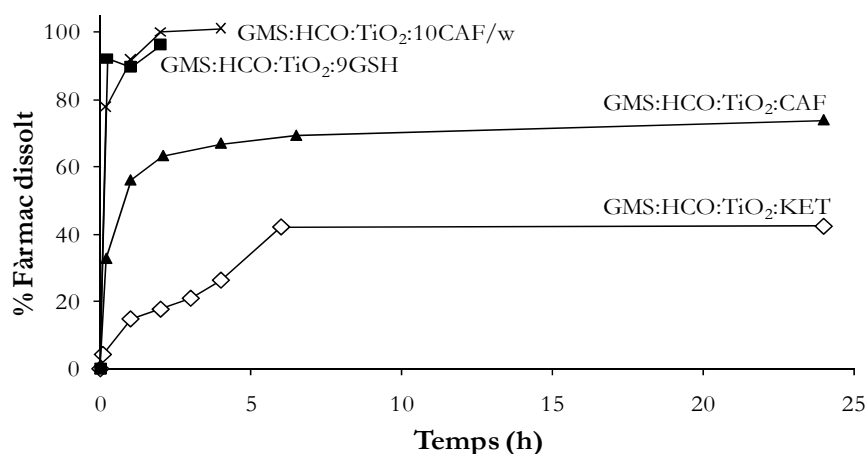


Figura 6.7. Perfils de dissolució dels fàrmacs en aigua a una velocitat d'agitació de 70 rpm, obtinguts per a partícules atrapades de CAF anhidre (GMS:HCO:TiO₂:9CAF), CAF hidratada (GMS:HCO:TiO₂:10CAF/w), GSH (GMS:HCO:TiO₂:9GSH), i KET (GMS:HCO:TiO₂:16KET).

6.5. Bibliografia

1. Kewal, K.J., ed. *Drug Delivery Systems*. Methods in Molecular Biology. Vol. 437. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. 251.
2. Liu, R., *Water-insoluble drug formulation*. 2000, Boca Raton: Interpharm/CRC Press.
3. Pardeike, J., Hommoss, A., Muller, R.H., *Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **366**(1-2): p. 170-184.
4. Westesen, K., *Novel lipid-based colloidal dispersions as potential drug administration systems - expectations and reality*. Colloid and Polymer Science, 2000. **278**(7): p. 608-618.
5. Jannin, V., Musakhanian, J., Marchaud, D., *Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2008. **60**(6): p. 734-746.
6. Berba, J., Goranson, S., Langle, J., Banakar, U.V., *In vitro release of selected nonsteroidal antiinflammatory analgesics [NSAIA] from reservoir-type transdermal formulations*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 1991. **17**(1): p. 55-65.
7. Garcia-Gonzalez, C.A., Fraile, J., Lopez-Periago, A., Domingo, C., *Preparation of silane-coated TiO₂ nanoparticles in supercritical CO₂*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **338**(2): p. 491-499.
8. Dvorak, J., Hajkova, R., Matysova, L., Novakova, L., Koupparis, M.A., Solich, P., *Simultaneous HPLC determination of ketoprofen and its degradation products in the presence of preservatives in pharmaceuticals*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2004. **36**(3): p. 625-629.
9. Lund, W., *The Pharmaceutical Codex*. 12th ed. 1994, London: The Pharmaceutical Press.
10. Bertin, C., Zunino, H., Pittet, J.C., Beau, P., Pineau, P., Massonneau, M., Robert, C., Hopkins, J., *A double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinol, caffeine, and ruscogenine by a combination of several non-invasive methods*. Journal of Cosmetic Science, 2001. **52**(4): p. 199-210.
11. Montenegro, L., Bonina, F., Rigano, L., Giogilli, S., Sirigu, S., *Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry*. International Journal of Cosmetic Science, 1995. **17**(3): p. 91-103.
12. Liu, X., Hefesha, H., Scriba, G., Fahr, A., *Retention Behavior of Neutral and Positively and Negatively Charged Solutes on an Immobilized-Artificial-Membrane (LAM) Stationary Phase*. Helvetica Chimica Acta, 2008. **91**(8): p. 1505-1512.
13. *Calculated value using Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software v9.04, presented in SciFinder database.*

14. Plumb, R.S., Potts III, W.B., Rainville, P.D., Alden, P.G., Shave, D.H., Baynham, G., Mazzeo, J.R., *Addressing the analytical throughput challenges in ADME screening using rapid ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry methodologies*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2008. **22**(14): p. 2139-2152.
15. Sampaio de Sousa, A.R., Simplicio, A.L., de Sousa, H.C., Duarte, C.M.M., *Preparation of glyceryl monostearate-based particles by PGSS[®]-Application to caffeine*. Journal of Supercritical Fluids, 2007. **43**(1): p. 120-125.
16. Saldaña, M.D.A., Mohamed, R.S., Baer, M.G., Mazzafera, P., *Extraction of purine alkaloids from mate (Ilex paraguariensis) using supercritical CO₂*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(9): p. 3804-3808.
17. Garcia-Gonzalez, C.A., da Sousa, A.R.S., Argemi, A., Periago, A.L., Saurina, J., Duarte, C.M.M., Domingo, C., *Production of hybrid lipid-based particles loaded with inorganic nanoparticles and active compounds for prolonged topical release*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **382**(1-2): p. 296-304.
18. Garcia-González, C.A., Saurina, J., Ayllón, J.A., Domingo, C., *Preparation and characterization of surface silanized TiO₂ nanoparticles under compressed CO₂: Reaction kinetics*. Journal of Physical Chemistry C, 2009. **113**(31): p. 13780-13786.
19. Trapani, A., Laquintana, V., Denora, N., Lopodota, A., Cutrignelli, A., Franco, M., Trapani, G., Liso, G., *Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2007. **30**(1): p. 64-74.
20. Müller, R.H., Mäder, K., Gohla, S., *Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.

CAPÍTOL 7

Conclusions

Les conclusions obtingudes en els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral són les següents:

A. Elaboració de sistemes d'alliberament de fàrmacs mitjançant tecnologies basades en scCO₂

- 1) S'han preparat diverses mostres de TRF impregnat en PMMA en diferents condicions experimentals de pressió, temperatura i temps. S'ha utilitzat com a solvent el scCO₂ amb un equip d'impregnació en mode discontinu. Aquestes impregnacions s'han realitzat a pressions de 150 a 200 bar, a les temperatures de 35 i 40 °C i durant intervals de temps de 48 a 96 h. En les diferents mostres preparades s'han obtingut impregnacions del 5 al 22 %.
- 2) S'han preparat sistemes model de 5-AZA recoberta amb el polímer biodegradable L-PLA mitjançant un sistema que emprava el scCO₂ com a antisolvent. La 5-AZA s'ha dissolt en DMSO i l'L-PLA en clorur de metilè. El recobriment de la 5-AZA amb l'L-PLA s'ha realitzat a una pressió de 110 bar, una temperatura de 40 °C i un cabal de CO₂ de 30 ml × min⁻¹.
- 3) S'han atrapat o impregnat fàrmacs de la família dels AINE en matrius de tipus polimèric mitjançant dues tecnologies que impliquen l'ús de scCO₂:
 - i. S'ha preparat un sistema d'alliberament prolongat de KET en una matriu formada per GMS, HCO i TiO₂ silanitzat. Aquest sistema correspon a un model de gel d'aplicació tòpica i s'ha preparat mitjançant la tècnica PGSS[®] a una pressió de 130 bar i 72 °C. S'han obtingut mostres amb diferents quantitats tant de fàrmacs com de polímers.
 - ii. S'ha elaborat un sistema d'alliberament controlat de tipus pegat transdèrmic. Aquest prototip està format per NAP i una matriu flexible d'EVA i Eudragit[®] E100. En aquest cas les mostres s'han preparat mitjançant un equip d'impregnació amb CO₂ pressuritzat. Les condicions experimentals del procés s'han estudiat mitjançant el disseny experimental. La impregnació més alta s'ha obtingut per a les mostres preparades a una pressió de 31 bar (o 450 psi), una temperatura de 37 °C i un temps de procés de 2,5 h.

B. Caracterització dels sistemes d'alliberament de fàrmacs

- 4) S'han caracteritzat els productes preparats en l'apartat A.1. Per a la caracterització i seguiment del procés d'alliberament del TRF dispers en els sistemes polimèrics s'ha desenvolupat i avaluat un mètode espectroscòpic i un altre de cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC). S'ha determinat el percentatge de TRF i els seus productes de degradació impregnats emprant el mètode cromatogràfic. Els perfils preliminars d'alliberament del TRF en condicions fisiològiques han estat seguits espectrofotomètricament utilitzant un sistema en flux continu. En aquest cas, no s'ha trobat ninguna longitud d'ona selectiva per tal de diferenciar entre el TRF i el metabòlit, així que les mesures s'han realitzat a 225 nm i han proporcionat els perfils globals corresponents als dos compostos. S'ha realitzat un estudi més acurat mitjançant el mètode cromatogràfic que permet seguir l'evolució de la concentració dels dos compostos amb el temps. S'han obtingut uns perfils amb un alliberament del fàrmac constant durant diverses setmanes per a les mostres preparades amb PMMA en boles en les condicions experimentals de 40 °C i 190 bar durant 48 hores. La SEM ha permès observar els canvis morfològics de les diferents mostres de TRF en PMMA. La DSC ha confirmat la dispersió del fàrmac a l'interior de la matriu polimèrica de PMMA.
- 5) S'ha desenvolupat un sistema amb parada de flux per a l'estudi d'estabilitat de la 5-AZA en solucions aquoses i s'han determinat les constants cinètiques del procés de degradació, que augmenten amb la temperatura. S'ha observat que la 5-AZA es degrada progressivament des del moment en què es dissol i que manté un equilibri amb l'RGU-CHO, que finalment es transforma en RGU de manera irreversible. A 50 °C, la concentració de fàrmac ha disminuït un 92 % en 1 hora. Per altra banda, amb el mateix temps s'observa ja la formació d'un 6 % de RGU. S'ha seguit el procés de degradació de la 5-AZA en funció del pH. A valors de pH de 2 a 6 la velocitat de degradació augmenta moderadament amb la disminució del pH. Tanmateix, s'ha observat que la 5-AZA es descompon molt més ràpidament a valors de pH bàsics. Aquest mètode amb parada de flux es pot emprar per a l'estudi de processos de degradació d'un gran nombre de fàrmacs amb característiques ben diverses. La resolució multivariant de corbes ha permès obtenir els perfils de concentració dels anàlits, a més de les constants cinètiques de descomposició.

S'ha estudiat el procés de degradació que experimenta la 5-AZA en dissolució aquosa a temperatura ambient mitjançant la cromatografia de líquids amb detecció espectrofotomètrica. S'ha optimitzat la separació dels tres compostos (5-AZA, RGU-CHO i RGU) emprant una columna de fase invertida C_{18} amb elució isocràtica. Els resultats obtinguts són concordants amb els dels estudis espectrofotomètrics.

- 6) S'han determinat els valors de pK_a de la 5-AZA mitjançant un sistema en flux continu amb detecció espectrofotomètrica. Les condicions del sistema són les següents. Mescla d'àcids: H_3PO_4 0,05 M, CH_3COOH 0,05 M, H_3BO_3 0,05 M. Mescla de bases: PO_4^{3-} 0,05 M, CH_3COO^- 0,05 M, BO_2^- 0,05 M. Cabal de l'anàlit: $1,15 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Cabal del valorant: $1,15 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$. Reactor de mescla: $200 \text{ cm} \times 0,07 \text{ cm}$ d.i. Reactor de reacció: $35 \text{ cm} \times 0,11 \text{ cm}$ d.i. Aquest sistema s'ha optimitzat per a l'anàlisi de fàrmacs inestables, els quals no es poden analitzar mitjançant valoracions convencionals. Els valors de pK_a han estat calculats mitjançant la resolució multivariant de corbes, que ha permès determinar el nombre d'espècies que absorbeixen i obtenir els espectres i els perfils de concentració. La viabilitat, robustesa i exactitud dels valors de pK_a que han estat calculats en valoracions espectrofotomètriques en flux continu és superior a altres mètodes clàssics quan es tenen problemes associats a la descomposició dels anàlits. A més a més, la utilització d'un sistema en flux continu redueix el temps i els costos d'anàlisi.
- 7) S'ha caracteritzat el sistema 5-AZA/L-PLA preparat en el punt A.2. S'han realitzat fotografies amb el microscopi electrònic de rastreig per tal d'avaluar l'eficiència de l'atrapament del fàrmac i la morfologia de les mostres. La microscòpia indica que s'ha aconseguit recobrir una part important del fàrmac amb el material polimèric. La 5-AZA pura presenta una aparença cristal·lina, mentre que aquesta canvia substancialment quan es recobreix amb una pel·lícula externa de PL-PLA, que provoca l'aspecte arrodonit del material resultant. També s'han determinat les temperatures de fusió i de transició cristal·lina de les mostres mitjançant la DSC. A més a més, s'ha determinat el percentatge de principi actiu en cada mostra i s'han realitzat tests d'alliberament mitjançant un mètode en flux continu amb anàlisi cromatogràfic. El sistema en flux continu ha permès una renovació constant de la solució d'alliberament. El fàrmac ha mostrat un alliberament continu tant a pH 7,4

com a pH 2,0 i ha assolit el 100 % de l'alliberament en unes 7 hores. Aquests resultats suggereixen que el producte preparat permet una millora en l'activitat terapèutica en comparació amb un medicament tradicional en el qual tot el principi actiu s'allibera quasi instantàniament. A més a més, els resultats han demostrat que ha millorat l'estabilitat del fàrmac en la mostra 5-AZA/L-PLA respecte a la solució pura de 5-AZA, de manera que el recobriments polimèric protegeix raonablement la 5-AZA d'una hidròlisi ràpida.

8) S'han caracteritzat les diferents mostres del punt A.3:

- i. Per a la determinació de la quantitat de KET en la matriu lipídica s'ha desenvolupat un mètode HPLC-UV. S'han realitzat estudis de difusió *in vitro* per estimar el nivell de penetració del fàrmac a través de la pell i la velocitat del procés. Aquests estudis s'han dut a terme mitjançant cel·les de difusió de Franz i l'esmentat mètode HPLC-UV. Els resultats han demostrat que quan s'empren TiO_2 silanitzat es pot atrapar més quantitat de KET.
- ii. Per a la caracterització de les mostres de NAP s'han realitzat fotografies amb el microscopi de fluorescència confocal per a una comprovació preliminar de l'eficiència de la impregnació. S'han determinat les temperatures de fusió i de transició cristal·lina de les mostres mitjançant la DSC. També s'ha determinat la quantitat de fàrmac en cada mostra amb un mètode cromatogràfic amb detecció UV i de fluorescència, que és el mateix que s'empren per al seguiment de les cinètiques d'alliberament. S'han obtingut les corbes cinètiques mitjançant l'ús d'una cel·la de difusió de Franz específica per a l'estudi d'alliberaments tòpics i transdèrmics.

En ambdós casos els fàrmacs s'han alliberat de forma sostinguda en dues etapes. Inicialment el procés d'alliberament és ràpid, però després s'obté un alliberament més lent i gradual. Les corbes de difusió corresponents als alliberaments dels dos anàlits en les diferents mostres s'ajusten al model de difusió de Higuchi. Aquest tipus de comportament és adequat per tal d'evitar possibles irritacions de la pell observades quan s'apliquen concentracions massa elevades de fàrmac a la pell.