



UNIVERSITAT_{DE}
BARCELONA

Formación y caracterización de sistemas terapéuticos a partir de emulsiones agua-en-agua

Esteban Figueroa Becerra



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS A PARTIR DE
EMULSIONES AGUA-EN-AGUA.

ESTEBAN FIGUEROA BECERRA, 2023

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT:

NANOCIÈNCIES

**FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS TERAPÉUTICOS
A PARTIR DE EMULSIONES AGUA-EN-AGUA.**

**Memoria presentada por Esteban Gabriel Figueroa Becerra para optar al título de doctor por la
Universidad de Barcelona**

Directoras: Dra. Elvira Escribano Ferrer y Dra. María José García Celma

Doctorando: Esteban Gabriel Figueroa Becerra

Tutora: Dra. Elvira Escribano Ferrer

ESTEBAN FIGUEROA BECERRA, 2023

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco a Dios por estar conmigo en todo este tiempo, por su mano cariñosa y gentil en todo momento, y agradecer porque nada me ha faltado. Además, agradecer a mi familia, y mis padres Germán y Estrella, estar lejos no ha sido fácil, pero se hace ameno con el enorme apoyo de ustedes. Ha sido bueno nacer con esta tecnología, poder hablar en cualquier momento y lugar, y si me sentía sólo o simplemente los extrañaba era sencillo tomar el celular y llamar. Lo mismo para mi pequeña Sofía, la cual no ha pasado ni un minuto sin extrañarte, haz estado en mis pensamientos y decisiones. A mi hermano y su familia, (Germán, Carolina y el JT) y a mis tíos y primos por su preocupación. A Elisenda y su familia a los cuales agradezco enormemente por su cariño y apoyo, es algo que nunca olvidaré.

A mis directoras de tesis, las Dras. María José García Celma y Elvira Escribano Ferrer, por todo el apoyo que me han proporcionado y creer en mí cuando aún no me conocían. Por enseñarme a conocer más el mundo de la tecnología farmacéutica, sus reglas y orden. Por su preocupación en momentos difíciles. Decirles que he aprendido muchas cosas gracias a ustedes, además de aprender a redactar en un orden, contando una historia.

A el equipo de trabajo del QCI, al Dr. Jordi Esquena, por esas interrupciones más de 5 minutos y que se transformaban en horas de conversación de emulsiones W/W. Al Dr. Carlos Rodríguez, por su ayuda en el desarrollo de proyectos. A Susana y Jonathan por estar dispuesto a enseñar y ayudarme en mis trabajos en el IQAC. A la Dra. Cristina Fornaguera del IQS, por su tiempo y dedicación a enseñarme.

Al departamento de Tecnología Farmacéutica, donde realice la mayoría de mi trabajo, a los Dres que lo componen (Dras Anna, Pilar, Lyda, Montse, Angels, Mireia y Dres. Suñe, Tico, Del Pozo), a sus técnicos y secretarias. El cariño que me han dado y la compañía cuando muchas veces me sentía sólo no tiene precio. A Rosa, Tina, Yeray, Inma, Esther, Roser, team SDM, entre muchos más.

A los estudiantes “Minions” que pasaron por el laboratorio, ya que también se aprende enseñando y de las personas. A Daniel, Paola, Cris, Laia, Álvaro. Especial mención a Aitor y Andrea, que de estudiantes pasaron a mis amigos, los cuales hemos compartidos grandes momentos.

A mi mejor amigo Daygoro, que a pesar la enorme distancia que hay entre España y Australia, siempre conversamos, reímos y disfrutamos de nuestras cosas y negocios. A Alejandro que fue quien me formo como científico al igual que Emilio, ya que sin ese gran aporte no estaría donde estoy ahora.

A la Universidad de Barcelona, a la facultad de Farmacia, y al coordinador del programa de doctorado, Dr. J. Marcos Prada por su ayuda y gestión. A Becas Chile extranjero, ANID, por su financiamiento durante los estudios. Así también al proyecto de la Dra. García Celma, CTQ2016-80645-R, España.

Muchas gracias a todos

“Dios mismo será tu guía, y te ayudará en todo; él jamás te abandonará. ¡Echa fuera el miedo y la cobardía!”

Deuteronomio 31:8

*A mi hija **Sofía**
y mis padres **Germán y Estrella***

Índice

Resumen	13
Abreviaturas	15
Capítulo 1 INTRODUCCIÓN	17
1.1 Emulsiones	18
1.2 Emulsiones W/W	24
1.2.1 Comportamiento fásico en mezclas acuosas	25
1.2.3 Diagrama de fases en el estudio de la formación de emulsiones W/W.....	26
1.2.4 Estabilización de emulsiones W/W	30
1.2.5 Emulsiones W/W formadas por proteína y polisacáridos.....	32
1.2.6 Aplicaciones de emulsiones agua en agua	35
Capítulo 2 OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	39
Capítulo 3 PARTE EXPERIMENTAL	43
3.1 Materiales	44
3.1.1 Principios activos	44
3.1.2 Polímeros utilizados para la formación de emulsiones W/W	48
3.1.3 Excipientes estabilizantes de emulsiones W/W	58
3.1.4 Componentes utilizados en cultivos celulares	61
3.1.5 Otros componentes químicos	62
3.1.6 Otros materiales	67
3.2 Equipos.....	69
3.2.1 Equipos para la preparación de emulsiones y nanopartículas.....	69
3.2.2 Equipos para la caracterización.....	72
3.2.3 Equipos para cesión y cuantificación de principios activos.....	76
3.2.4 Equipos para estudios de citotoxicidad.....	78
3.3 Métodos.....	81
3.3.1 Preparación de las emulsiones.....	81
3.3.2 Incorporación de principios activos.....	82
3.3.3 Caracterización macroscópica y microscópica de las emulsiones.....	84

3.3.4	Determinación de tamaño de gota de las emulsiones y estudio de estabilidad....	85
3.3.5	Identificación de sólido por espectroscopía confocal RAMAN	85
3.3.6	Determinación de la viscosidad y propiedades reológicas.....	86
3.3.7	Estabilización de emulsiones W/W por métodos químicos	86
3.3.8	Estabilización por métodos físicos	87
3.3.9	Estudios de liberación a partir de las formulaciones	90
3.3.10	Cuantificación de principios activos por HPLC	91
3.3.11	Estudios de citotoxicidad.....	92
3.3.12	Análisis de datos.....	93
Capítulo 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
4.1	Estudios preliminares	96
4.1.1	Alginato de sodio-albúmina sérica bovina (BSA).....	98
4.1.2	Alginato de sodio-Caseína	102
4.1.3	Alginato de sodio-Caseinato de sodio	104
4.1.4	Pectina-Caseinato de sodio	107
4.2	Sistema Alginato de sodio-Caseinato de sodio.....	109
4.2.1	Diagrama pseudobinario.....	109
4.2.2	Incorporación de principios activos	114
4.2.3	Estabilización.....	127
4.2.4	Estudios de liberación	140
4.2.4.1	Estudios preliminares de cesión.....	140
4.2.4.2	Hidrocloruro de Clindamicina	142
4.2.4.3	Hidrocloruro de Metformina.....	152
4.2.5	Estudios de citotoxicidad.....	157
4.3	Sistema Alginato de sodio-Caseinato de sodio/etanol.....	161
4.3.1	Diagrama pseudobinario	161
4.3.2	Incorporación de melatonina	163
4.3.3	Estabilización física con nanopartículas	168
4.3.4	Incorporación de NP y melatonina.....	171
4.3.5	Estudios de liberación	175
4.4	Sistema pectina-caseinato	177
4.4.1	Diagrama pseudobinario	177

4.4.2 Incorporación de principios activos.....	179
4.4.3 Estudios de liberación	190
4.4.3.1 Hidrocloruro de clindamicina.....	190
4.4.3.2 Hidrocloruro de metformina.....	192
4.4.4 Estudios de citotoxicidad.....	195
Capítulo 5 CONCLUSIONES	199
Bibliografía.....	203

Resumen

Las emulsiones W/W son dispersiones de dos fases acuosas inmiscibles, que presentan la compartimentalización multifásica de las emulsiones convencionales sin requerir la presencia de solvente orgánico ni tensioactivo y, debido a su contenido mayoritariamente acuoso, presentan una mayor biocompatibilidad. Cuando se mezclan dos soluciones acuosas poliméricas, se puede producir una separación de fases por dos mecanismos. El primero se denomina separación asociativa o coacervación compleja y ocurre cuando los dos polímeros se atraen mutuamente y dan lugar a una fase rica en la mezcla de los dos polímeros (coacervato), y la otra fase tiene una baja concentración polimérica. El segundo mecanismo se denomina separación segregativa y tiene lugar cuando se mezclan dos polímeros completamente incompatibles en solución, porque predominan las fuerzas de repulsión entre ellos, dando lugar a una fase rica en uno de los polímeros y una fase rica en el otro polímero; cuando se mezclan estas dos fases se pueden obtener emulsiones W/W.

Se ha estudiado la formación y caracterización de emulsiones W/W formadas por mezclas de proteínas y polisacáridos. Para ello se han seleccionado polímeros biocompatibles y adecuadas para uso farmacéutico que presenten incompatibilidad en solución acuosa para dar lugar a la formación de emulsiones, como lo son el caseinato, alginato y pectina. Se realizaron estudios preliminares para seleccionar las mezclas de polímeros y las condiciones de pH a temperatura ambiente. Se han elaborado diagramas binarios donde se identificaron las zonas en las que podía formarse emulsiones. Se seleccionaron las formulaciones en las que se incorporaron posteriormente los principios activos.

Actualmente, no se encuentran en la bibliografía estudios relacionados con el uso de este tipo de emulsiones en aplicaciones farmacéuticas; por ello, el objetivo de esta tesis doctoral es estudiar la incorporación de principios activos modelo, de carácter hidrofílico como hidrocloreto de clindamicina e hidrocloreto de metformina, y de carácter lipofílico como melatonina.

Los principios activos estudiados en este trabajo y su incorporación en emulsiones W/W, han mostrado perfiles de cesión retardados en comparación con las soluciones

poliméricas. Además, se ha logrado incorporar melatonina, una molécula lipofílica en una solución acuosa donde se añadió un porcentaje de etanol para facilitar su disolución.

La estabilización de emulsiones W/W es un reto. En este trabajo se han estabilizado emulsiones W/W mediante métodos físicos y químicos. Entre los métodos físicos se ha estudiado la estabilización mediante partículas, ya que la presencia de partículas en la interfase disminuye la coalescencia de las gotas proporcionando una mayor estabilidad al sistema. Se ha utilizado para este fin, partículas de mucina y nanopartículas de PLGA. Entre los métodos químicos, se ha seleccionado la utilización un agente gelificante, glucono-delta-lactona.

Se ha estudiado la estabilidad de las emulsiones macroscópicamente y microscópicamente. Se han obtenido emulsiones cinéticamente estables en periodos de 4 a 6 meses, logrando una mayor estabilidad cuando las formulaciones contenían mucina, en comparación con las emulsiones que no lo contenían.

Mediante estudios reológicos se ha comprobado que las emulsiones estudiadas presentan un comportamiento pseudoplástico y que su viscosidad depende de la composición.

Se ha estudiado la toxicidad de las emulsiones con los principios activos y los distintos agentes estabilizadores que se han utilizado, mediante cultivos celulares y a diferentes concentraciones. La biocompatibilidad de los excipientes utilizados y las propiedades de las emulsiones W/W desarrolladas permite considerarlas vehículos adecuados para aplicaciones farmacéuticas y alimentarias.

Abreviaturas

Biopolímeros

A	Alginato de sodio
B	Suero albúmina de bovino
C	Caseinato de sodio/caseína
P	Pectina

Principios activos

CL	Hidrocloruro de clindamicina
MF	Hidrocloruro de metformina
ML	Melatonina

Nomenclatura de Emulsiones

O	Aceite (oil)
W	Agua (water)
W/W	Emulsión agua en agua
O/W	Emulsión aceite en agua
W/O	Emulsión agua en aceite
O/O	Emulsión aceite en aceite

Estadística y parámetros de modelos matemáticos

DE	Desviación estándar
AIC	Criterio de información de Akaike
k ₁	Contante de liberación de primer orden
r ²	Coefficiente de determinación
α	Parámetro de la escala de tiempo (Weibull)
β	Parámetro de forma (Weibull)
k _H	Constante de liberación de Higuchi
k _{KP}	Constante de liberación de Korsmeyer-Peppas
n	Exponente difusional

Otros

e	Etanol
Ce	Concentración de etanol
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero bovino fetal
Hela	Células HeLa
M	Mucina
MTT	3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
δ	Glucono-delta-lactona

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Emulsiones

Las emulsiones son una clase de sistemas dispersos que consisten en dos líquidos inmiscibles. Uno de los líquidos se encuentra dispersado en formas de gotas (fase interna, dispersa o discontinua) en el otro (fase externa, dispersante o continua) [Tadros & Vincent, 1983] [Gibbs, 1961]. Las emulsiones no se forman espontáneamente, y requieren un aporte energía para su formación. Termodinámicamente, son sistemas inestables que tienden a la separación de fases para lograr un estado de mínima energía [Leal-Calderon y cols., 2007].

Las emulsiones se clasifican en función del tamaño de las gotas que constituyen la fase dispersa, de la relación en volumen de las fases, de la naturaleza de las fases y de su estructura. La formación de una emulsión implica un proceso termodinámico. Es decir, si se considera un sistema en el que una gran gota W de área A_1 está inmersa dentro de líquido O (Estado I), que luego se subdivide en un gran número de gotas más pequeñas con un área total A_2 (donde $A_2 > A_1$, Estado II) como se observa en la **Figura 1**. La tensión interfacial entre ambos líquidos (γ_{ow}), que es la interacción entre capas líquido/líquido, es la misma para la gota de mayor tamaño en el estado I como las de menor tamaño en el estado II. El cambio de energía al pasar del estado I al estado II se produce a partir de dos contribuciones: La energía superficial, que es positivo, es igual a la diferencia de área de A_2 y A_1 por la tensión interfacial entre ambos líquidos (γ_{ow}); y la entropía de las dispersiones que también es positivo, debido a que el aumento de número de gotas está acompañado de un aumento de la entropía ($T\Delta S$)

Según el tamaño de las gotas [Gupta y cols., 2016], las emulsiones pueden ser:

- **Macroemulsiones**, poseen un diámetro de gota superior a 500 nm. Tienen un aspecto visual lechoso.
- **Nano-emulsiones**, poseen gotas muy pequeñas con un diámetro menor a 500 nm. Pueden presentar un aspecto transparente o translúcido.

Según la relación en volumen de fases, las emulsiones se consideran [Lissant, 1974]:

- **Emulsiones diluidas**, que presenta un porcentaje de fase interna menor al 20-30%.
- **Emulsiones concentradas**, que presentan un porcentaje de fase interna entre el 20 – 30% y el 74%.
- **Emulsiones altamente concentradas**, presentan un porcentaje superior al 74% de fase interna.

En función de la naturaleza de fases [Esquena J. , 2016] las emulsiones se pueden clasificar en:

- **Emulsiones agua-en-aceite (W/O)**, donde la fase interna es acuosa y la fase externa es oleosa.
- **Emulsiones aceite-en-agua (O/W)**, en las que la fase interna es oleosa y fase externa es acuosa.
- **Emulsiones aceite-en-aceite (O/O)**, en las que ambas fases son oleosas. Por lo general, solventes orgánicos, polares/no polares.
- **Emulsiones agua-en-agua (W/W)**, en las que las dos fases son acuosas.

Según la estructura de las emulsiones [Schuster, 1985], se pueden clasificar en:

- **Emulsiones simples**, constituidas por una fase dispersa y una fase dispersante.
- **Emulsiones múltiples**, constituidas por una emulsión simple dispersada en una fase continua.

La formación de una emulsión implica un proceso termodinámico. Es decir, si se considera un sistema en el que una gran gota W de área A_1 está inmersa dentro de líquido O (Estado I), que luego se subdivide en un gran número de gotas más pequeñas con un área total A_2 (donde $A_2 > A_1$, Estado II) como se observa en la **Figura 1**. La tensión interfacial entre ambos líquidos (γ_{ow}), que es la interacción entre capas líquido/líquido, es la misma para la

gota de mayor tamaño en el estado I como las de menor tamaño en el estado II. El cambio de energía al pasar del estado I al estado II se produce a partir de dos contribuciones: La energía superficial, que es positivo, es igual a la diferencia de área de A_2 y A_1 por la tensión interfacial entre ambos líquidos (γ_{ow}); y la entropía de las dispersiones que también es positivo, debido a que el aumento de número de gotas está acompañado de un aumento de la entropía ($T\Delta S$) [Tadros, 2013].

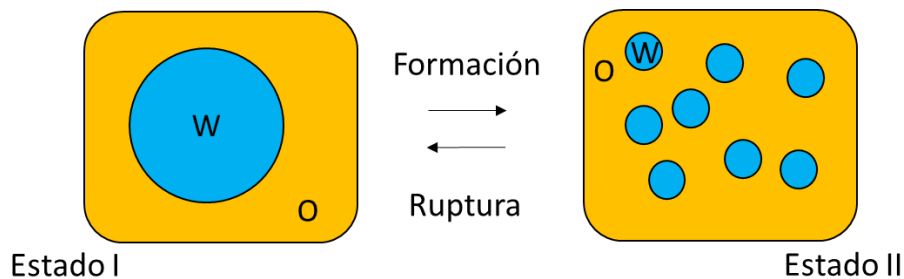


Figura 1. Representación esquemática de formación y ruptura de emulsiones. En el estado I se representa una gota de gran tamaño (W) inmersa en un líquido (O), de área de A_1 , el borde de la esfera de W indica la tensión interfacial entre O y W, dado por γ_{ow} . En el estado II se representa múltiples gotas de W de área A_2 . Modificado de Tadros, 2013.

La segunda ley de la termodinámica indica que:

$$\Delta G^{\text{form}} = \Delta A \gamma_{ow} - T\Delta S \quad (\text{Ecuación 1})$$

siendo:

ΔG^{form} : energía libre de formación de emulsión

ΔA : diferencia del área interfacial

T: temperatura

ΔS : diferencia de la entropía del sistema

En emulsiones convencionales (O/W o W/O), el valor de $\Delta A \gamma_{ow}$ es muy superior al valor de $T\Delta S$ ($\Delta A \gamma_{ow} \gg T\Delta S$), y esto se traduce en que el valor de ΔG^{form} es superior a 0 por lo que presenta un valor positivo. Cuanto más baja es la energía libre de formación (es decir,

negativa) más favorable es la formación de la emulsión. Sin embargo, en la mayoría de los casos el valor de ΔG^{form} es positivo, lo que significa que es necesario un aporte de energía para formar las emulsiones, y, una vez formadas, son termodinámicamente inestables y tienden a desestabilizarse [Tadros, 2013].

La desestabilización puede ocurrir por diferentes mecanismos que lleva a la separación de fases representadas en la Figura 2.

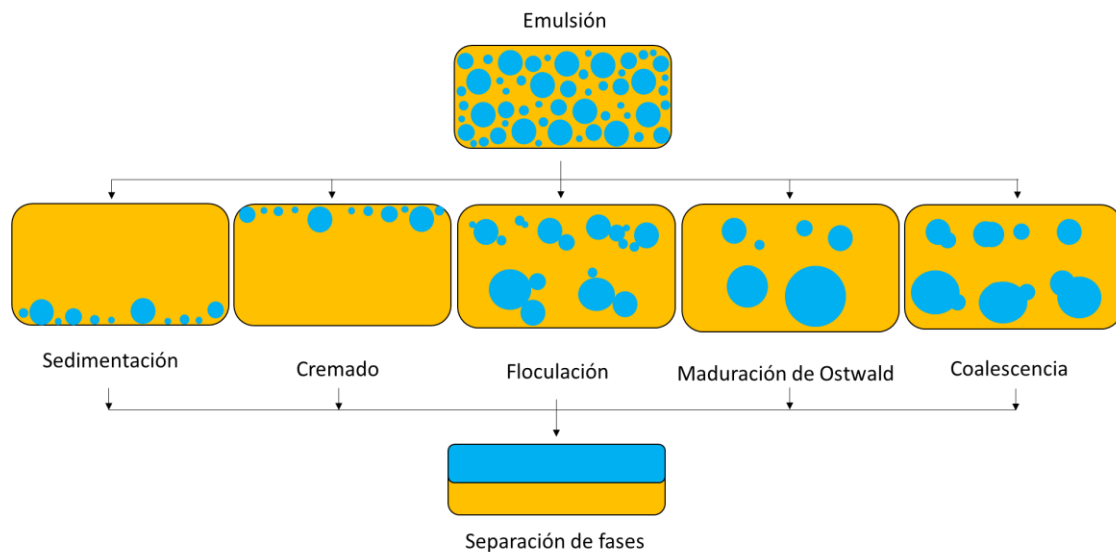


Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de desestabilización de emulsiones.

Sedimentación y cremado:

Este proceso de desestabilización es el resultado de la fuerza gravitatoria. Cuando las fuerzas superan el movimiento térmico de las gotas (movimiento browniano de las gotas), se acumula un gradiente de concentración en el sistema, lo que da lugar a que las gotas se muevan hacia la parte superior del recipiente que contiene la emulsión (si su densidad es menor que la del medio) o hacia la parte inferior (si su densidad es mayor que la del medio). Si las gotas migran progresivamente a la parte inferior, al proceso se le denomina sedimentación directa. En caso contrario, cuando las gotas de la emulsión migran hacia la parte superior, se llama sedimentación inversa o cremado. Este proceso es reversible y las gotas se pueden redispersar mediante la adición de energía [Tadros, 2013].

Según la ley de Stokes $V_s = \frac{2 \Delta \rho g r_D^2}{9 \eta}$ (**Ecuación 2**), la velocidad de sedimentación es directamente proporcional al radio de las gotas (r_D), a la diferencia entre densidades de los componentes de cada fase de la emulsión ($\Delta \rho$) y a la fuerza de gravedad; y es inversamente proporcional a la viscosidad del medio (η).

$$V_s = \frac{2 \Delta \rho g r_D^2}{9 \eta} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Esta ecuación es válida para sistemas muy diluidos y monodispersos. En sistemas más concentrados hay que tomar en cuenta restricciones en la movilidad debido a la interacción entre gotas [Stanislav y cols., 2006].

Floculación:

El proceso de floculación consiste en la agregación de gotas de una emulsión, sin perder su integridad, en gotas de mayor tamaño. La floculación es el resultado de las fuerzas de atracción de Van der Waals que superan a las fuerzas de repulsión. Así pues, este proceso se produce cuando no hay suficiente repulsión para mantener las gotas separadas a distancias en las que la atracción de Van der Waals es débil. Este proceso se puede evitar mediante la adición de tensioactivos iónicos y/o electrolito, y se considera un proceso reversible que mediante un proceso de agitación la emulsión puede volver a su estado original [Tadros, 2013].

Maduración de Ostwald:

Es un proceso irreversible producido por la diferencia de presión que soportan las gotas de diferente tamaño, denominada presión de Laplace, la cual es mayor en gotas pequeñas que en las grandes. Con el tiempo, una vez formada la emulsión, las gotas más pequeñas desaparecen y sus moléculas difunden a las gotas más grandes. Este fenómeno afecta la distribución del tamaño [Tadros, 2013].

Coalescencia:

El proceso de coalescencia se refiere al proceso de adelgazamiento y ruptura de la película líquida entre las gotas (película interfacial) con el resultado de la fusión de dos o más gotas entre otras más grandes. El punto límite de coalescencia de una emulsión es la separación completa de las distintas fases que componen la emulsión. El proceso de floculación, por las atracciones entre gotas favorece a la coalescencia [Tadros, 2013].

Para evitar el proceso de coalescencia, se pueden utilizar varios agentes emulsionantes o emulgentes, dentro de los cuales pueden ser: tensioactivos iónicos o no iónicos, polímeros, polielectrolitos, cristales líquidos y partículas finamente divididas [Tadros, 2013].

Las emulsiones que utilizan como emulgentes las partículas sólidas se denominan emulsiones Pickering [Pickering, 1907]. El factor clave en la formación de este tipo de emulsiones es la humectabilidad de las partículas, que se caracteriza por un ángulo de contacto θ en la interfaz aceite-partícula-agua (**Figura 3**). Para partículas hidrofílicas con un $\theta < 90^\circ$, la mayoría de las partículas están inmersas en la fase acuosa, induciendo la formación de aceite en agua (O/W). Por otra parte, para partículas hidrofóbicas con un $\theta > 90^\circ$ forman una emulsión agua en aceite. Las partículas con un ángulo de 90° en la interfaz aceite-agua poseen la máxima energía de adsorción, ΔG , calculada por la ecuación:

$$\Delta G = \pi R^2 \gamma_{ow} (1 + \cos \theta)^2 \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde γ_{ow} representa la tensión interfacial entre aceite y agua, R representa el radio de una partícula esférica y θ es el ángulo de contacto de la partícula absorbida en la interfaz [Binks & Lumsdon, 2000].

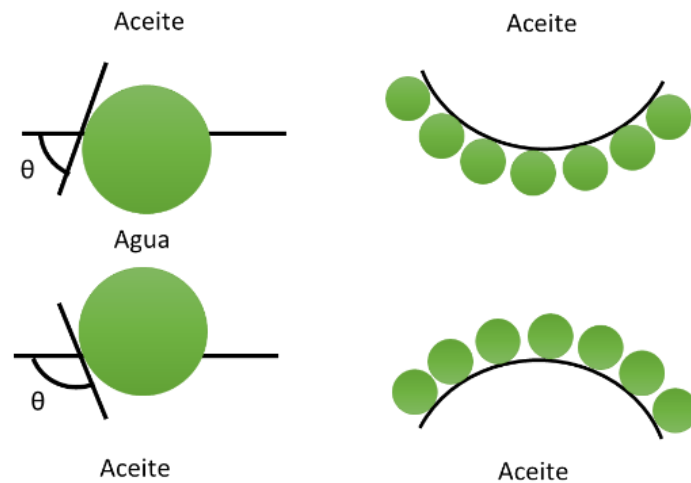


Figura 3. Ángulo de contacto a la izquierda y partículas adsorbidas en la interfase, entre dos fases. Adaptado de Wu y cols., 2016.

1.2 Emulsiones W/W

Las emulsiones W/W fueron descritas por primera vez en 1896, por Martinus Willem Beijerinck [Beijerinck, 1896]. Su trabajo como microbiólogo en el estudio del crecimiento bacteriano, le llevó a la preparación de una solución de almidón como medio de cultivo. Al mezclar dicha solución con una solución de gelatina observó la formación de gotas. Identificó también que, en base a la proporción de la mezcla de polímeros, se podían obtener emulsiones de gelatina en almidón y de almidón en gelatina.

Los sistemas acuosos de dos fases acuosas (ATPS, por sus siglas en inglés aqueous two-phase system), se han utilizado como soluciones en técnicas de fraccionamiento para la extracción, separación, purificación y enriquecimiento de proteínas, virus, enzimas y biomoléculas. A partir de los sistemas ATPS se pueden formar las emulsiones agua-en-agua, a veces denominadas emulsiones de ATPS. Sin embargo, se prefiere utilizar el término más común de “emulsión agua-en-agua” abreviado como emulsión W/W [Esquena J., 2016].

Actualmente, existe un gran interés en el estudio de este tipo de emulsiones que constituyen un reto científico y tecnológico importante, dado que poseen la compartimentalización multifásica propia de las emulsiones convencionales y una mayor biocompatibilidad, gracias a su alto contenido en agua, además de la posibilidad de incorporar eficazmente, biomoléculas [He, 2015] [Beldengrün y cols., 2018] y microorganismos [Singh, y

cols, 2018]. En la bibliografía farmacéutica, no existen estudios respecto al introducción de principios activos en este tipo de emulsiones.

Generalmente, las emulsiones W/W se preparan con mezclas de dos soluciones de polímeros hidrofílicos que presentan una incompatibilidad de fases, como por ejemplo mezclas de proteínas y polisacáridos. Grinberg y Tolstoguzov publicaron en 1977 [Grinberg & Tolstoguzov, 1997] un artículo con más de 100 mezclas de proteína y polisacárido incompatibles termodinámicamente, indicando los factores de inestabilidad tales como el pH y la fuerza iónica, entre otros. A partir de esta publicación, se han realizado numerosos estudios con mezclas de proteínas y polisacáridos con la finalidad de aumentar su estabilidad y conseguir nuevas aplicaciones industriales [Norton y cols., 2015] [Dickinson, 2016] [Sagis, 2009] [Scholten y cols., 2006].

1.2.1 Comportamiento fásico en mezclas acuosas

Cuando se mezclan dos polímeros en solución, a diferentes proporciones, se pueden observar dos comportamientos diferentes dependiendo de la repulsión o atracción entre los dos polímeros: separación asociativa y separación segregativa [Piculell & Lindman, 1992].

La separación asociativa es un fenómeno en el cual las mezclas de dos componentes y el agua se separan en un precipitado tipo sólido que contiene altas concentraciones de dos polímeros hidrofílicos, y una solución líquida sobrenadante que sólo tiene una baja cantidad de polímeros. Es producida por atracción electrostática, es decir, debido a la presencia de polímeros con cargas opuestas. El precipitado que se forma puede estar constituido en partículas amorfas no cristalinas, al cual se le llama coacervato. Por otra parte, la separación segregativa se observa en mezclas de dos polímeros hidrofílicos, cuando la concentración polimérica es baja, la mezcla resultante forma una fase (cosolubilización) con dos componentes en solución. Sin embargo, al aumentar mínimamente la concentración de algún componente y si existen fuerzas repulsivas, se forma una incompatibilidad de fases. [Matalanis, Jones, & McClements, 2011] (**Figura 4**).

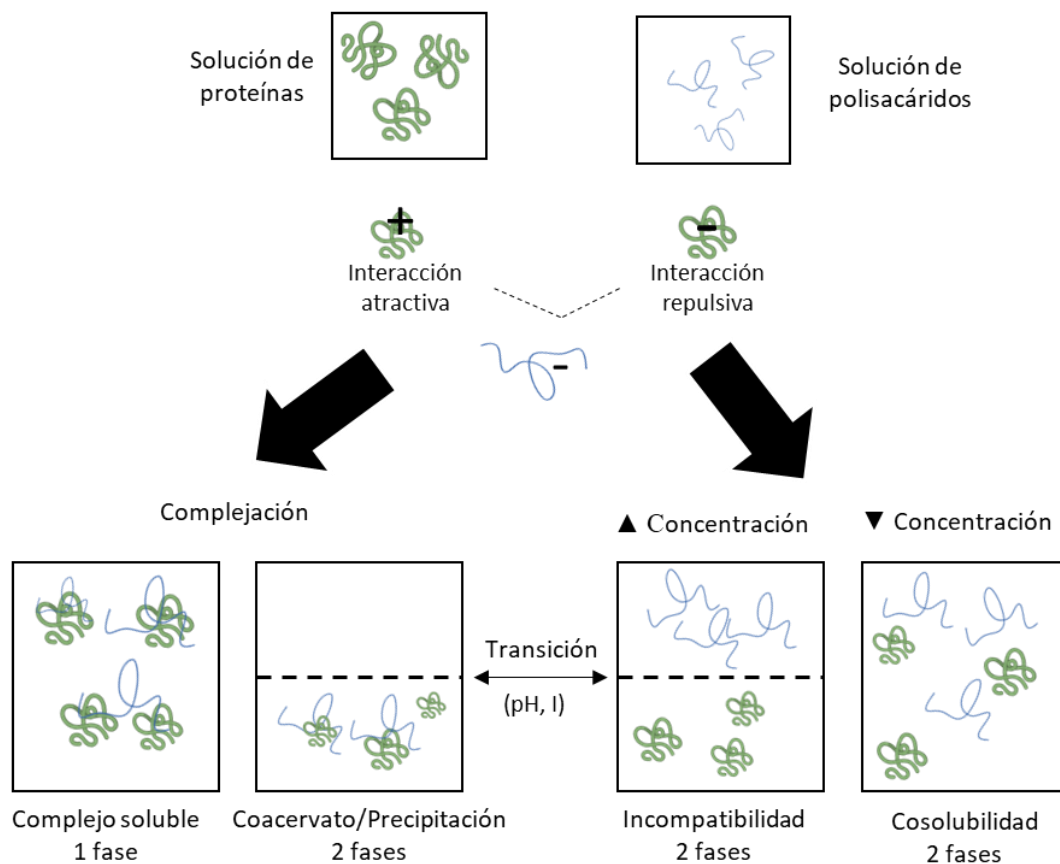


Figura 4. Diferentes situaciones generadas por la atracción o repulsión entre macromoléculas adaptada de Matalanis, Jones, & McClements, 2011.

1.2.3 Diagrama de fases en el estudio de la formación de emulsiones W/W

Un diagrama de fases nos permite obtener información respecto a diferentes estados de agregación o fases que se encuentran al mezclar diferentes componentes. Los diagramas de fases en el estudio de emulsiones, se pueden clasificar en diagramas binarios o terciarios. Los diagramas binarios están contruidos con dos componentes, en el caso de las emulsiones W/W hemos utilizado este tipo de diagramas para relacionar dos concentraciones poliméricas que formaran la emulsión. Por otra parte, en emulsiones convencionales formados por aceite, agua y un tensioactivo, se utilizan diagramas ternarios donde se representan gráficamente tres componentes.

La determinación de las fases en un diagrama, se lleva a cabo experimentalmente preparando diferentes concentraciones de las mezclas en estudio y observando su comportamiento a temperatura constante. En la **Figura 5**, se muestra un ejemplo de una mezcla de soluciones de polisacárido y representando en cada eje, su concentración en porcentaje p/v. La línea negra resaltada se define como la línea binodal que indica la zona de cambio de fase. Es decir, a una menor concentración polimérica (bajo la línea binodal) se observa una fase. Por el contrario, sobre la línea binodal a una mayor concentración se observan dos fases, una fase enriquecida en polisacárido y empobrecida en proteínas; y la otra fase enriquecida en proteínas, pero empobrecida en polisacáridos. Sobre la línea binodal se encuentra una línea de unión o de reparto, que corresponde a la composición total inicial de la mezcla, es decir, las concentraciones totales de proteína y polisacárido [Stephen y cols., 2006]. Todas las mezclas con las concentraciones de polímeros que caen en la misma línea de unión se separarán en dos fases, compartiendo cada fase las mismas composiciones de polisacáridos y proteínas. Sin embargo, los volúmenes relativos de las dos fases separadas son muy diferentes, determinados por la relación de concentración de los dos polímeros en la mezcla inicial [Yang y cols., 2021]. Finalmente, el punto F representa el umbral mínimo de separación de fase.

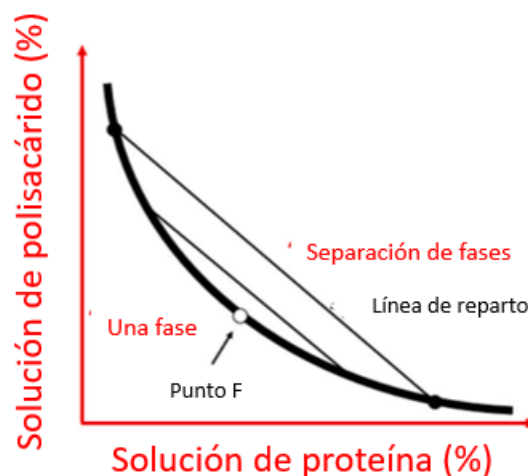


Figura 5. Diagrama binario de una mezcla de caseína y alginato. Adaptado de Yang y cols., 2021.

A modo de ejemplo, en la **Figura 6** se puede observar el diagrama binario del sistema gelatina/maltodextrina y algunas micrografías de las estructuras identificadas cuando la

gelatina se marcó fluorescentemente (color verde). En la zona de dos fases, se pueden formar emulsiones con tres tipos de estructuras: emulsiones de maltodextrina en gelatina (12% gelatina/6% maltodextrina), emulsiones de gelatina en maltodextrina (3% gelatina/20% maltodextrina) y emulsiones bicontinuas, donde predominan ambas estructuras (6% gelatina/9% maltodextrina) [Beldengrün y cols, 2018].

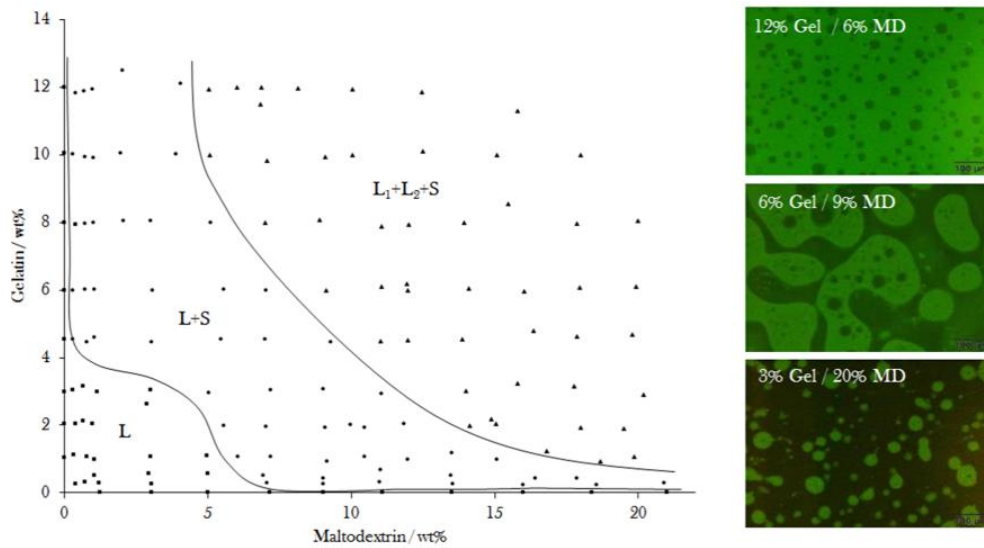


Figura 6. Diagrama de fases del sistema gelatina/maltodextrina (pH \approx 5), observado a 50°C después de 5 días de equilibrio. L, fase líquida; S, fase sólida; Gel, gelatina; MD, maltodextrina [Beldengrün y cols, 2018].

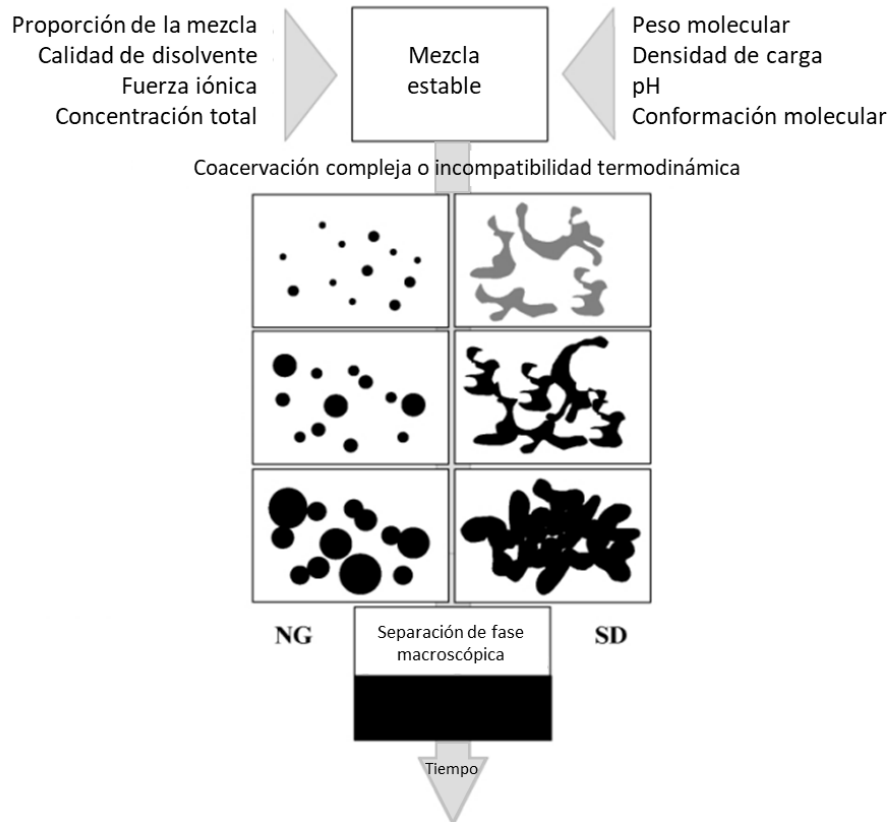


Figura 7. Representación esquemática de separación de fases de mezclas de soluciones acuosas de polisacáridos y proteínas. En el tiempo se pueden obtener dos tipos de desestabilización: nucleación y crecimiento (NG, por el inglés “nucleation and growth”) y deformación o descomposición espinodal (SD, por el inglés “spinodal descomposition”) Adaptado de Turgeon, y cols., 2003.

Por naturaleza, la separación de fases de sistemas formados por proteínas y polisacáridos es un proceso cinético. Diferentes fluctuaciones pueden afectar a el proceso de separación de fases como lo son una ineficaz mezcla de los componentes, la temperatura o interacciones específicas e inespecíficas. Se ha utilizado modelos cinéticos para describir la separación de fases como lo son la nucleación (NG) y la descomposición espinodal (SD) [Turgeon y cols, 2003]. El primero se caracteriza por cambios de en las fluctuaciones iniciales de la concentración de corto alcance y gran amplitud, mientras que la SD procede de fluctuaciones de largo alcance y menor amplitud. La NG generalmente termina con gotas esféricas dispersas en la fase continua, mientras que la SD presenta una red interconectada. Las emulsiones formadas con composiciones poliméricas cercanas a la línea binodal (bajas concentraciones de polímero) pueden sufrir procesos de NG. Las emulsiones a altas

concentraciones de polímero pueden sufrir separación de fases rápidamente por la SD [Turgeon y cols, 2003].

Características moleculares de los biopolímeros (peso molecular, conformación, densidad de carga, etc.), los factores que las afectan (pH, fuerza iónica, calidad del disolvente, etc.), las condiciones de mezcla (proporción, concentración total, etc.) y los procedimientos de mezcla (tratamiento térmico, presión, cizallamiento, etc.) deben considerarse factores determinantes en la incompatibilidad termodinámica [Turgeon y cols, 2003].

1.2.4 Estabilización de emulsiones W/W

Las emulsiones W/W presentan tensiones interfaciales muy bajas [Antonov y cols., 2004] [Ding y cols, 2002] [Vis y cols., 2015]. En la literatura se han reportado valores del orden de 10^{-3} a 10^{-5} mN/m para sistemas de caseinato y alginato [Antonov y cols., 2004]. Se puede observar que estos valores son mucho menores si se comparan con la tensión interfacial de las emulsiones convencionales (W/O y O/W), que se encuentran en el rango de 30 mN/m [Esquena J. , 2016]. Además, las emulsiones W/W presentan una interfase que tiene mayor espesor que en las emulsiones convencionales [Esquena J. , 2016].

A diferencia de las emulsiones convencionales W/O y O/W, las emulsiones W/W no pueden estabilizarse con tensioactivos ya que por sus propiedades anfifílicas tienden a situarse en las interfases agua-aceite y en las emulsiones W/W ambas fases son acuosas. Por ello se han estudiado diferentes estrategias de estabilización, que pueden clasificarse como en métodos químicos y físicos:

Métodos químicos:

Las emulsiones W/W se pueden estabilizar mediante el uso de agentes gelificantes donde la formación de micro y nano-geles permite retardar o disminuir los procesos de floculación y coalescencia. En relación con emulsiones W/W, las estrategias para gelificar consisten en la adición de agentes entrecruzantes, consiguiendo su reticulación mediante

modificación de factores como el pH [Impellitteri y cols., 2012][Duval y cols., 2015] [Beldengrün y cols., 2018].

En el sistema PEG/dextrano, se gelificó usando luz UV, debido a la funcionalización de PEG con norborneno, el cual bajo este estímulo tiene la capacidad de reticular [Impellitteri y cols., 2012]. En el sistema proteína de suero aislada/pectina se utilizó cloruro de calcio para la formación de hidrogeles. En este trabajo utilizaron la gelificación en frío, donde una solución de proteína globular se calentó por encima de la temperatura de desnaturalización bajo condiciones que indujeron a una fuerte repulsión entre moléculas (baja fuerza iónica y pH lejos del punto isoeléctrico). Al desnaturalizarse, las proteínas se plegaron parcialmente y formaron agregados lineales, que mediante la inducción de fuerzas atractivas y presencia de iones como el cloruro de calcio gelificaron [Duval y cols., 2015]. Otro ejemplo es la utilización de genipina en el sistema de gelatina/maltodextrina. Se formaron microgeles en el sistema gelatina/maltodextrina mediante el uso de genipina como agente entrecruzante, con la finalidad de incorporar la enzima β -galactosidasa dentro de los de estas estructuras [Beldengrün y cols., 2018].

Métodos físicos:

Los métodos físicos son aquellos que utilizan parámetros físicos tales como la temperatura y presión, o partículas que tengan la capacidad de ser adsorbidas en la interfase.

Una forma de estabilizar las emulsiones es mediante la temperatura. Una emulsión se puede preparar a temperatura ambiente o la temperatura que se considere necesaria para posteriormente ser almacenada a bajas temperatura. Al aplicar este factor en la ecuación 1, se obtiene que, a menor temperatura más negativa es la energía libre de formación. Una baja temperatura permite disminuir el movimiento de las partículas (movimiento browniano), permitiendo reducir la velocidad de los procesos de floculación y coalescencia [Hänggi & Ingold, 2006].

Otra forma de estabilizar las emulsiones es con el uso de partículas que se absorben en la interfase y dificultan la coalescencia, formando las denominadas emulsiones Pickering [Pickering, 1907]. Si bien el tamaño de las partículas es relevante a la hora de estabilizar

emulsiones W/W, también lo son las interacciones entre partículas-interfase, el potencial Z, la polidispersidad y la estructura de las partículas. Estos factores pueden cambiar la afinidad electrostática que tenga la partícula por alguna de las fases acuosas. Diferentes estudios con nanoestructuras han mostrado estabilidad de este tipo de emulsiones, básicamente por la estructura que poseen y la capacidad de formar ciertos agregados [Nicolai & Murray, 2017].

Se han estabilizado emulsiones del sistema polietilenglicol (PEG)/sulfato de magnesio, utilizando nanopartículas de sílice, de un diámetro de 6 nm y 50 nm a una concentración de 6% en peso de partículas. Las nanopartículas fueron pegiladas y utilizadas para estabilizar, previniendo los procesos de separación de fases y coalescencia, debido a que se incorporaron en la interfase [Griffith & Daigle, 2018]. También se han utilizado nanopartículas de polidopamina (400 nm), en el sistema dextrano/PEG. La reticulación de este tipo de nanopartículas forma una especie de microcápsula (coloidosoma) por la agregación de las mismas, estabilizando las emulsiones [Zhang y cols., 2018]. Otros investigadores utilizaron nanocristales de celulosa (180 nm) que forman capas en las superficies de las gotas del sistema dextrano y polióxido de etileno. La agregación de los nanocristales en presencia de NaCl permite además la formación de un gel cuando se incorpora en la emulsión [Ben Ayed y cols., 2018]. También se han utilizado proteínas para formar emulsiones Pickering, como lo son las β -lactoglobulina y mucina. A partir de β -lactoglobulina se prepararon nanopartículas (microgeles) con un diámetro de 184 nm y nanofibras, las cuales se adsorbieron en la interfase del sistema amilopectina/xiloglucano [Hatz y cols, 2020]. En el caso de mucina, se ha utilizado para estabilizar el sistema gelatina/maltodextrina, en una emulsión maltodextrina/gelatina/maltodextrina. Las partículas de mucina presentaban un tamaño de 2,9 μm [Beldengrün y cols., 2020].

1.2.5 Emulsiones W/W formadas por proteína y polisacáridos

Se han publicado varios estudios acerca de la incompatibilidad termodinámica de proteínas y polisacáridos en soluciones. Concretamente, los estudios de Grinberg y Tolstoguzov en 1997 [Grinberg & Tolstoguzov, 1997], han dado lugar a la publicación de una lista con más de 100 tipos de mezclas y las condiciones de incompatibilidad.

En esta tesis doctoral, se ha estudiado el sistema formado por soluciones acuosas de alginato de sodio y caseinato de sodio, entre otros. Uno de los primeros trabajos del sistema alginato/caseína fueron los estudios de Sučkov y cols., 1980. Estos investigadores querían estudiar la hilabilidad (capacidad de ciertas sustancias de producir fibras) en un sistema bifásico a pH 7,2. Desarrollaron un diagrama binario a una temperatura de 25 °C, graficando la línea binodal y las líneas de reparto (**Figura 8A**). La zona de emulsión abarcaba concentraciones desde un 2 a un 4 % de alginato y un 10 a 20 % de caseína [Sučkov y cols, 1980]. Mas tarde los estudios de Capron y cols., 2001, se centraron en estudiar la reología de mezclas de alginato y caseinato. En este caso, desarrollaron un diagrama de fases obteniéndose parcialmente la línea binodal y las líneas de reparto, abarcando concentraciones máximas de alginato 3,5 % y caseinato 16 %, a temperatura ambiente (**Figura 8B**). Las mezclas binarias se ajustaron a pH 7 con NaOH. Los estudios reológicos posteriores indicaron que, cuando se desestabiliza la emulsión, los mecanismos que están involucrados son propios de fluidos no Newtonianos [Capron y cols., 2001]. En el año 2011, estudios de Antonov y Moldenaers estudiaron la formación de emulsiones alginato/caseinato en presencia de un polielectrolito fuerte como sulfato de sodio de dextrano (DSS) [Antonov & Moldenaers, 2011]. En dichos estudios, desarrollaron un diagrama de alginato y caseinato a pH 7 a una temperatura de 23 °C con presencia ausencia de DSS (**Figura 8C**). Los resultados obtenidos demostraron que el DSS desplazaba la línea binodal a concentraciones poliméricas más bajas, lo que luego se tradujo en una pérdida de las morfologías de las gotas y cambios en los parámetros reológicos. Estos cambios se debían a las interacciones del DSS con el caseinato, que varían según la concentración de proteína y la fuerza iónica, lo que resulta de gran interés para la formación de emulsiones y también en procesos de separación en biotecnología [Antonov & Moldenaers, 2011].

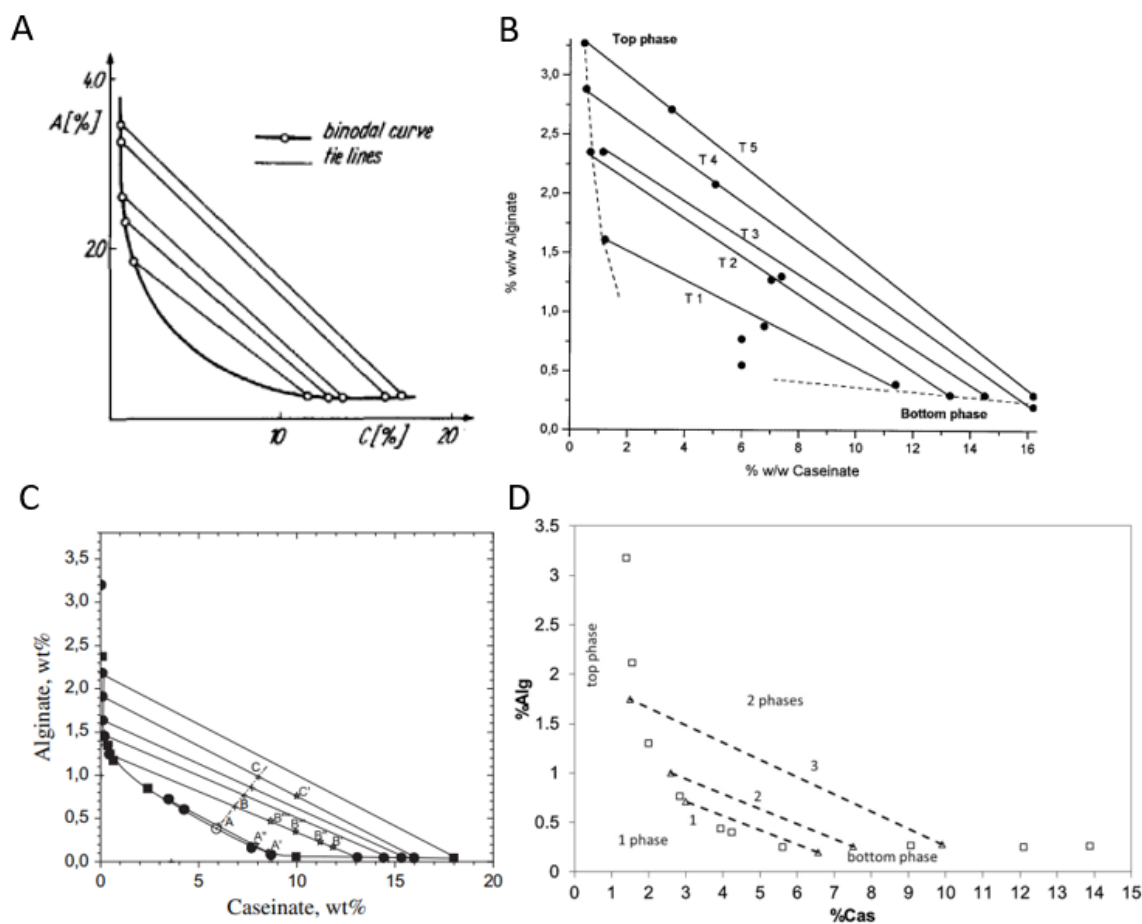


Figura 8. Diagramas binarios del sistema alginato/caseína y caseinato. Figuras extraídas de (A) Diagrama del sistema alginato/caseína, pH 7,2 a 25°C, Sučkov, y cols., 1980; (B) Diagrama del sistema alginato/caseinato. pH 7 a temperatura ambiente, Capron, y cols., 2001; (C) Diagrama del sistema alginato/caseinato, pH 7 a 23°C, Antonov y Moldenaers, 2011; (D) Diagrama del sistema alginato/caseinato, pH 8 a 25°C, Maestro, y cols., 2020.

Estudios de Maestro y cols., 2020, se han centrado en estudiar la reología de sistemas caseinato/pectina y caseinato alginato [Maestro y cols., 2020]. El objetivo de este trabajo era probar experimentalmente diferentes modelos reológicos propuestos por diferentes investigadores, considerando la baja tensión interfacial de este tipo de emulsiones. Se estudiaron diagramas de alginato y caseinato determinando la línea binodal y líneas de reparto a pH 8 de las mezclas de alginato/caseinato (D) y pectina/caseinato (Figura 9A) [Maestro y cols., 2020]. Rediguieri y cols., 2007 estudiaron el sistema formado por pectina y caseinato. Estos investigadores formaron un diagrama binario a pH 7 ajustado con una solución amortiguadora de fosfatos 0,01M, entre concentraciones de 10 a 30 g/L de pectina

y 50 a 200 g/L de caseína (**Figura 9B**). En los diagramas a 5, 20 y 45 °C, no se detectaron cambios de la línea binodal. También estudiaron la reología y el comportamiento de emulsiones tras una ligera acidificación, a $\text{pH} > 6$. Observaron la separación de fases seguida de la descomposición espinodal, y a pH inferiores, la formación de complejos debido al cambio de cargas de la caseína las cual tenía la capacidad de atraer pectinas con carga positiva. El proceso de complejación es un proceso reversible de modo que detectaron que al aumentar el pH volvía a formarse la emulsión [Redigueri y cols, 2007].

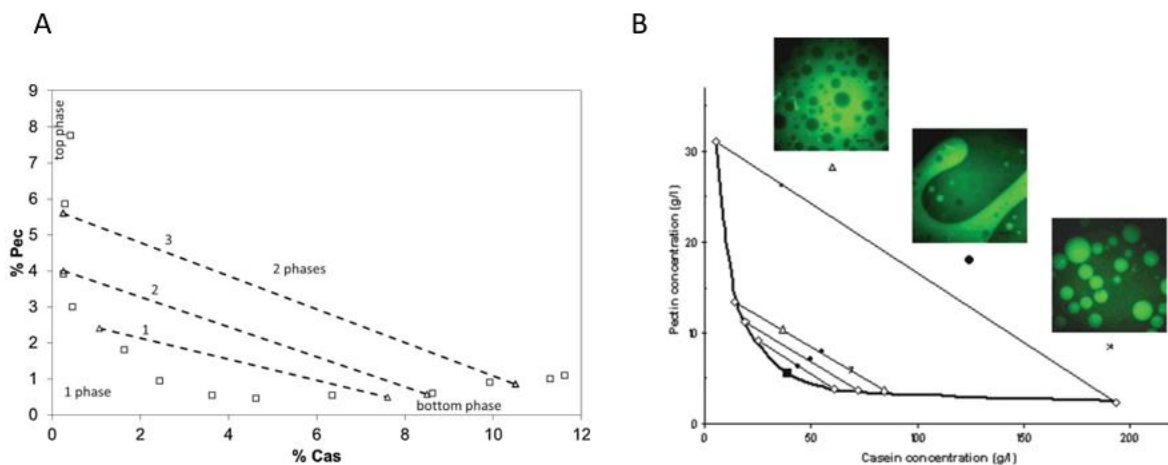


Figura 9. Diagramas binarios del sistema pectina/caseína y caseinato. Figuras extraídas de (A) Diagrama del sistema pectina/caseinato, pH 8 a 25°C, Maestro y cols., 2020; (B) Diagrama del sistema pectina/caseína, pH 7 a 45 °C, Redigueri y cols., 2007.

1.2.6 Aplicaciones de emulsiones agua en agua

Las emulsiones W/W son sistemas novedosos, de gran impacto científico y tecnológico. Con dichas emulsiones se consigue la compartimentalización multifásica propia de las emulsiones convencionales, constituidas generalmente por agua y un solvente orgánico no polar, sin requerir la presencia tensioactivos. Además, debido a su elevado contenido en agua, presentan una mayor biocompatibilidad siendo respetuosas con el medio ambiente, lo que las hace sostenibles y muy adecuadas para diversas aplicaciones.

Como se ha mencionado anteriormente, existen varios estudios referentes a emulsiones W/W formadas por proteínas y polisacáridos, que tienen la capacidad de incorporar diferentes moléculas y microorganismos. La ausencia de solventes orgánicos y tensioactivos, y su alta biocompatibilidad las hace unas buenas candidatas para diferentes aplicaciones alimentarias y farmacéuticas.

En cuanto a las aplicaciones en tecnología de los alimentos, cabe destacar publicaciones recientes sobre la incorporación de biomoléculas y microorganismos. Un ejemplo es la incorporación de la enzima β -galactosidasa, con la finalidad de tratar la intolerancia a la lactosa. En este caso, se fabricaron microgeles a partir de emulsiones W/W, concretamente con el sistema gelatina/maltodextrina (**Figura 6**) [Beldengrün y cols., 2018]. En este sistema, se indujo la gelificación de gotas de gelatina mediante enfriamiento y reticulación con genipina, el cuál es un reactivo de baja toxicidad, formando partículas de microgeles de gelatina. La reticulación de la gelatina permitió incorporar la enzima obteniéndose una eficiencia de encapsulación del 64%.

También se ha incorporado microorganismos como *Lactobacillus rhamnosus* GG en emulsiones W/W del sistema carboximetil celulosa/gelatina (**Figura 10**) [Singh y cols., 2018], permitiendo mejorar la supervivencia de los microorganismos en fluidos gastrointestinales. También en este contexto, se han formado microcápsulas a partir del sistema gelatina/caseinato y gelatina/goma arábica por la formación de coacervatos, incorporando *Lactobacillus reuteri* [Zhao y cols., 2020].

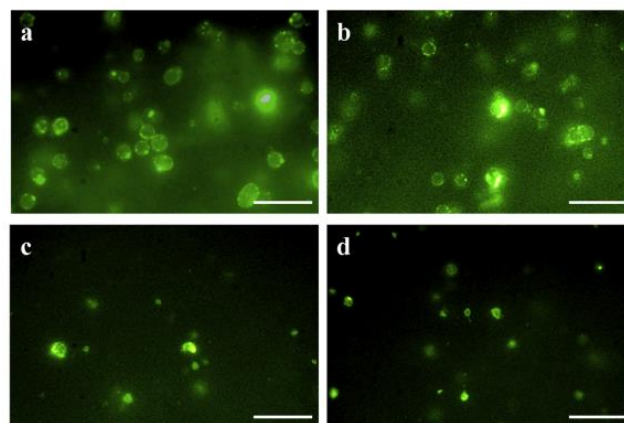


Figura 10. Emulsiones W/W de carboximetil celulosa/gelatina a distintas concentraciones. Las bacterias se encuentran marcadas fluorescentemente con Syto9. Extraído de Singh y cols., 2018.

Las vitaminas y flavonoides son componentes bioactivos esenciales que contribuyen positivamente a la salud. La riboflavina actúa en las reacciones óxido y reducción del metabolismo protegiendo a las células por su acción antioxidante. Sin embargo, es fotosensible, hecho que conlleva a que ciertos alimentos expuestos a la luz pierdan este componente, produciéndose productos tóxicos. Para evitar la degradación de la riboflavina se utilizan emulsiones W/W del sistema proteína de soja/goma guar estabilizadas con partículas de zeína (proteína que se encuentra en el maíz) (**Figura 11**) [Chen y cols., 2019], a las que se le incorpora riboflavina la cual queda protegida de la luz. Otros investigadores prepararon microesferas con riboflavina a partir del sistema alginato/caseína, gelificando con cloruro de calcio [He y cols., 2015]. En este caso se obtuvo una eficiencia de encapsulación de alrededor del 97 %, y mediante la simulación de fluidos gastrointestinales, se logró liberar la riboflavina en medio intestinal, ya que la microesfera facilitó el paso por el estómago sin que se degradara.

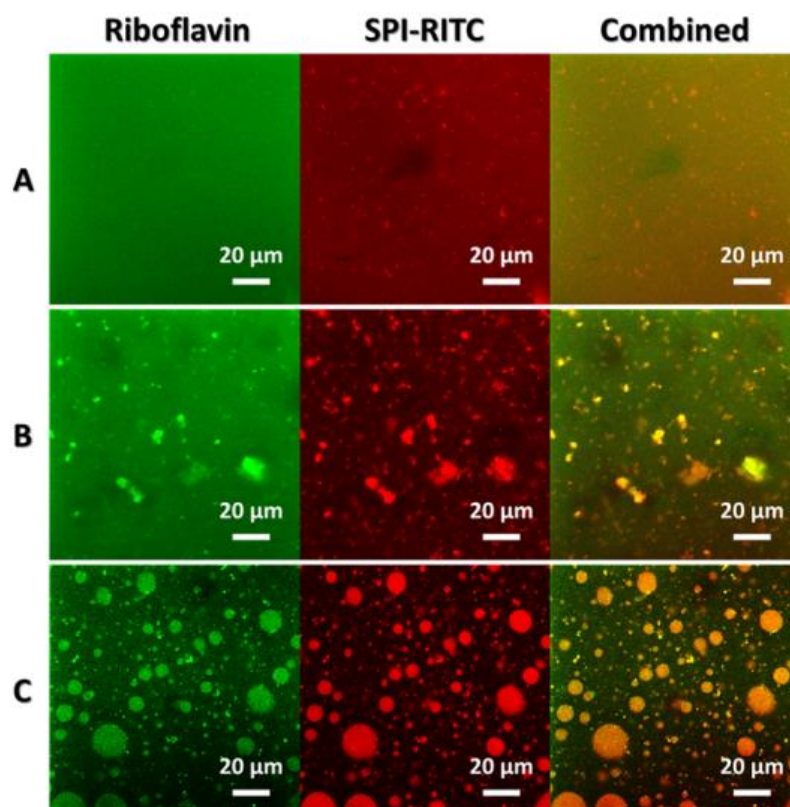


Figura 11. Emulsiones del sistema proteína de soja/goma guar cargadas con riboflavina estabilizadas con partículas de zeína. La riboflavina se marcó fluorescentemente (color verde) al igual que la proteína de soja (color rojo, SPI-RITC). Extraído de Chen y cols, 2019.

Aunque existen numerosos estudios relacionados con emulsiones W/W para aplicaciones en tecnología de los alimentos, en el ámbito farmacéutico, en la fecha de inicio de esta tesis doctoral, no se encontraron en la bibliografía investigaciones sobre la incorporación de principios activos en emulsiones W/W ni estudios de cesión, estabilidad y toxicidad de estas formulaciones. El comportamiento de las emulsiones en cuanto a la capacidad de retener y ceder fármacos y biomoléculas dependerá de la naturaleza y propiedades de los polímeros que las constituyen.

En esta tesis doctoral, se ha estudiado la incorporación de principios activos modelo en emulsiones W/W formuladas con proteínas y polisacáridos, debido a sus características de biocompatibilidad y sin la presencia de tensioactivos ni solventes orgánicos.

Capítulo 2

OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Las emulsiones W/W son dispersiones líquido/líquido de dos fases acuosas inmiscibles, en ausencia tanto de aceite como de tensioactivo. Estas emulsiones se forman en mezclas acuosas de dos polímeros hidrófilos, cuando la separación de fases es inducida por incompatibilidad termodinámica entre los dos polímeros [Esquena J. , 2016]. En los últimos años, el estudio de las interfases agua-agua y la estabilización de las emulsiones W/W [Dickinson, 2019] se ha convertido en un tema de notable interés, ya que estas emulsiones logran la compartimentación multifásica en ausencia de tensioactivo y componente oleoso, tienen una mayor biocompatibilidad, además de la posibilidad de incorporar eficazmente biomoléculas y microorganismos [Esquena J. , 2016]. Sin embargo, la aplicación de estas emulsiones como vehículos de fármacos no se ha estudiado hasta el momento. La estabilidad fisicoquímica de las emulsiones W/W y su comportamiento en cuanto a la liberación de principios activos son aspectos fundamentales para poder proponer estas nuevas emulsiones como formas farmacéuticas.

Las mezclas acuosas de polisacáridos y proteínas pueden formar emulsiones W/W y su estabilidad depende de la concentración de los polímeros, el peso molecular, la fuerza iónica, el pH y la temperatura [Capron y cols., 2001].

El objetivo de la presente tesis doctoral es la formación de emulsiones agua en agua (W/W) utilizando polímeros adecuados para aplicaciones farmacéuticas. Para estudiar la formación de emulsiones W/W se seleccionarán distintos sistemas proteína/polisacárido y se estudiará la influencia de variables de preparación que pueden influir en la formación y estabilidad de las emulsiones, etc. La selección de las composiciones se efectuará a partir del estudio del comportamiento físico de los correspondientes sistemas. Se procederá a la estabilización fisicoquímica de las emulsiones mediante la preparación de emulsiones con partículas de mucina y nanopartículas de PLGA. Se estudiará la incorporación de principios activos en emulsiones W/W estabilizadas y la cinética de liberación de estos a soluciones receptoras. Finalmente se estudiará la toxicidad en cultivos celulares.

El plan de trabajo comprende las siguientes etapas:

1.- Formulación y desarrollo de las emulsiones W/W.

Las emulsiones W/W pueden formarse a partir de dos fases acuosas en las que se produce una segregación de polímeros incompatibles en solución, y la dispersión de una de estas fases (fase dispersa) en el seno de la otra (fase continua). La formulación y el desarrollo de las emulsiones incluye: la selección de sistemas poliméricos biocompatibles y adecuados para uso farmacéutico, el estudio del comportamiento físico mediante diagramas de fases; el análisis de la influencia de las variables de composición y preparación en las características de la emulsión.

2.- Estudios de la estabilización de dichas emulsiones.

Los mecanismos principales de desestabilización de las emulsiones W/W son la sedimentación y la coalescencia. La diferencia de densidad entre la fase dispersa y la fase continua es normalmente pequeña, lo cual minimiza el problema de la sedimentación. La coalescencia es la fusión de gotas por rotura del film interfacial, pero para que las gotas se fusionen se tienen que deformar, por lo que los mecanismos que tiendan a evitar la deformación minimizarán la coalescencia. El aumento de viscosidad y/o gelificación de las gotas pueden dificultar la deformación de las gotas y, por lo tanto, tenderán a minimizar la coalescencia. Esta tarea incluye analizar los mecanismos de estabilización, tales como la reticulación química y la formación de emulsiones Pickering.

3.- Incorporación de principios activos y estudios de liberación de los mismos.

En primer lugar se seleccionarán las emulsiones más adecuadas por su composición y características reológicas, en segundo lugar se seleccionarán los principios activos modelo y se pondrán a punto métodos analíticos para su cuantificación, en tercer lugar se estudiará la incorporación de los principios activos a las emulsiones y su influencia en la estabilidad, en cuarto lugar se comprobará la ausencia de toxicidad de las formulaciones, en quinto lugar se realizarán estudios de liberación de los principios activos desde las emulsiones a soluciones receptoras adecuadas.

4.-Discusión de los resultados y elaboración de las principales conclusiones

En esta etapa se realizará la discusión de los resultados obtenidos en cada uno de los estudios realizados, y se extraerán las principales conclusiones obtenidas de la tesis doctoral.

Capítulo 3

PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales

3.1.1 Principios activos

Hydrochloruro de clindamicina [CAS 21462-39-5] (Fagron)

El hidrocloreto de clindamicina (CL) es un antibiótico semisintético derivado de lincomicina (**Figura 12**). Es un polvo blanco o casi blanco cristalino, ligeramente higroscópico. Tiene un peso molecular de 461,5 g/mol con un logP de 2,16 [Hansch y cols., 1995]. Es muy soluble en agua (100 mg/mL a 25°C y muy poco en etanol [Lawrence y cols., 2018]. Tiene un pKa aproximado de 7,45 [Schwab y cols., 1983]. Dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) pertenece a la clase III, por lo que tiene una alta solubilidad y baja permeación [Papich & Martinez, 2015]. CL es estable en soluciones acuosas a un pH entre 3 y 5, sin embargo, se ha demostrado en estudios a temperaturas sobre los 70°C que existe una degradación de no más de un 10% en un rango de pH 1 a 6,5 después de dos años almacenado a 25°C [Oesterling, 1970]. En una solución amortiguadora de fosfatos 0,2M a pH 7,25 no presentó cambios en la tasa de degradación [Oesterling, 1970].

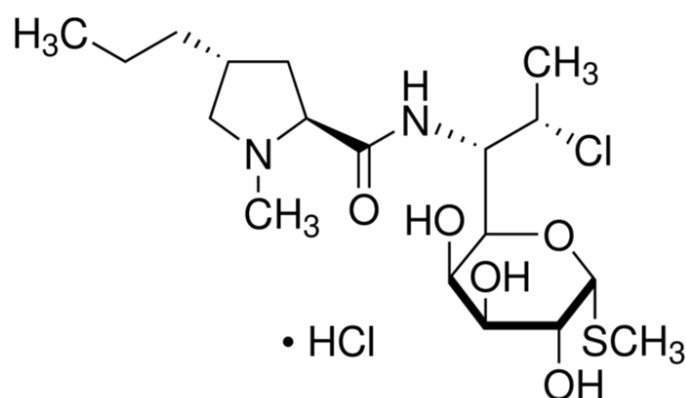


Figura 12. Estructura química del hidrocloreuro de clindamicina.

Este antibiótico inhibe la síntesis de proteínas bacterianas por unión al ARN 23S de la subunidad 50S del ribosoma bacteriano. Esto impide el proceso de traducción de mensajero a proteína, lo que da lugar a la muerte bacteriana. La CL es activa contra una serie de bacterias aeróbicas grampositivas, así como contra anaerobias grampositivas y gramnegativas [Dhawan & Thadepalli, 1982].

En relación con la farmacocinética de CL, cerca del 90% de la dosis oral de hidrocloreuro de CL es absorbida en el tracto gastrointestinal. En piel, entre un 4 a 5% puede ser absorbido cuando se administra fosfato de CL de forma tópica. CL está ampliamente distribuida en líquidos y tejidos corporales, incluido el hueso y no llega al líquido cefalorraquídeo en concentraciones significativas. Más del 90% de la CL circulante se une a proteínas plasmáticas, tiene una semivida de 2 a 3 horas. Es metabolizada en el hígado, aproximadamente el 10% es excretado en la orina y alrededor del 4% en las heces [Buckingham, 2020].

La posología de hidrocloreuro de CL por vía oral está entre 150 y 300 mg cada 6 horas y en caso de infecciones severas se incrementa a 450 mg cada 6 horas [Buckingham, 2020]. La forma farmacéutica comercializada en España son cápsulas orales de 150 mg o 300 mg [CIMA, 2022]

Además de la forma hidrocloreuro existe en el mercado fosfato de CL y palmitato hidrocloreuro. Por vía parenteral se administra fosfato de CL en inyección intramuscular a una dosis de 0,6 a 1,2 g y por vía intravenosa se administra una dosis de 18 mg/mL [Buckingham, 2020]. Por vía tópica, el fosfato de CL se administra en forma de gel, de emulsión y de solución. También se administra por vía vaginal en forma de óvulos y crema [AEMPS, 2022].

Hidrocloruro de metformina [CAS 1115-70-4] (Fagron)

El hidrocloruro de metformina (MF) (**Figura 13**) es un polvo cristalino blanco con peso molecular de 165,62 g/mol, fácilmente soluble en agua ($1,06 \cdot 10^6$ mg/L a 25 °C) [NCBI, 2022], un de pKa de 12,4 [NCBI, 2022], y un log P de -1,43 [Graham y col., 2011]. Dentro del BCS pertenece a la clase III, es decir, presenta una alta solubilidad y baja permeación [Cheng y cols., 2004]. Fue aprobada en 1994 por la Food and Drug Administration (FDA) para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 [Jones y cols., 2002]. La MF debe protegerse de la luz y puede exponerse a temperaturas entre 15 y 30°C [Buckingham, 2020].

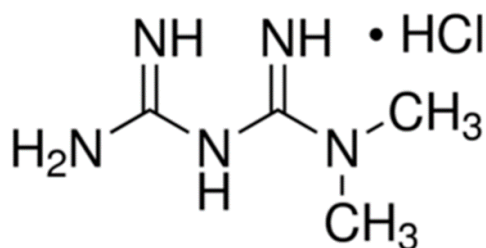


Figura 13. Estructura química del hidrocloruro de metformina.

MF inhibe el complejo mitocondrial I, evitando la producción de ATP mitocondrial que conduce a un aumento de las proporciones citoplásmicas de ADP: ATP y AMP: ATP [Rena y cols., 2017]. Estos cambios activan la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), una enzima que desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa. La AMPK activada fosforila dos isoformas de la enzima acetil-CoA carboxilasa, inhibiendo así la síntesis de grasas y conduciendo a la oxidación de grasas, reduciendo las reservas de lípidos hepáticos y aumentando la sensibilidad del hígado a la insulina [Rena y cols., 2017].

El hidrocloreto de MF se absorbe lenta e incompletamente en el tracto gastrointestinal, tiene una biodisponibilidad del 50 a 60%. En plasma la unión a proteínas es insignificante, y se excreta inalterado en la orina [Buckingham, 2020].

Las dosis orales usuales para el tratamiento de la diabetes tipo 2 son de 500 a 850 mg de MF administrada de una a dos veces en el día [Davidson & Peters, 1997]. Según el grado de diabetes, edad y enfermedades crónicas, se ajustan los comprimidos orales [Hermann, 1979]. En España, las formas de comercialización son comprimidos recubiertos con película en dosis entre 850 a 1000 mg [CIMA, 2022]

Melatonina [CAS 73-31-4] (FluoroChem)

Melatonina (ML) o N-acetil-5-metoxitriptamina (**Figura 14**), es un polvo cristalino de color blanco a blanquecino. Es una hormona secretada principalmente por la glándula pineal, responsable de la regulación del sueño y el ritmo circadiano, que participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos [Xie y cols., 2017]. Tiene un peso molecular de 232,278 g/mol y un pKa de 16,51 y -0,69 y no se ioniza en todo el rango de pH [Osol y cols., 1975]. En agua tiene una solubilidad de $2 \cdot 10^3$ mg/L a 20 °C; $5 \cdot 10^3$ mg/L a 50 °C [SCCS, 2010] y es soluble en mezclas de etanol y agua [Bikjdaouene y cols., 2003] [Sierra y cols., 2013]. Dentro del BCS pertenece a la clase II, es decir, presenta baja solubilidad y alta permeabilidad [Li y cols., 2017]

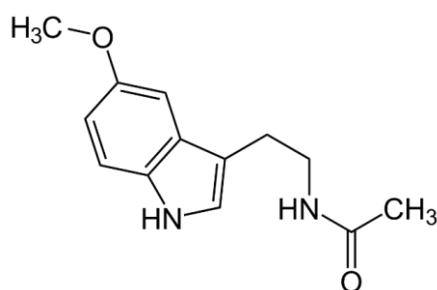


Figura 14. Estructura química de la melatonina.

ML se sintetiza en la fase nocturna del fotoperíodo y es un importante regulador de los ritmos circadianos. Esta hormona se ha descrito que tiene una protección efectiva contra las especies reactivas de oxígeno a través de la estimulación de enzimas antioxidantes [García y cols., 2014], y la modulación negativa de fuentes pro oxidantes [Reiter y cols., 2013]. ML tiene dos receptores a nivel de membrana celular, MT1 y MT2, que producen una cascada de señalización de efectos antagónicos, siendo el primero caracterizado por efectos vasoconstrictores y el segundo por una acción vasodilatadora a nivel de músculo liso endotelial [Doolen y cols., 1998] [Masana y cols., 2002].

ML se administra por vía oral en formas farmacéuticas sólidas de liberación modificada y con una dosis de 2 mg, para el tratamiento del insomnio primario. También se ha estudiado su eficacia en trastornos depresivos [Haimov & Lavie, 1995]. En España se comercian comprimidos recubiertos de entre 1 a 3 mg [CIMA, 2022].

3.1.2 Polímeros utilizados para la formación de emulsiones W/W

3.1.2.1.- Polisacáridos

Alginato sódico [CAS 9005-38-3] (Merck)

El alginato (**Figura 15**) es un polisacárido extraído de algas marinas y se utiliza en la industria farmacéutica y alimentaria. Este biopolímero se compone de secuencias de ácido β -D-manurónico (bloques M) y ácido α -L-gulurónico (bloques G) unidos por enlace 1-4 [Pawar & Edgar, 2012]. El alginato sódico tiene un peso molecular de entre 32000 a 400000 g/mol [Lee & Mooney, 2012]. Lentamente se disuelve en agua, formando soluciones coloidales viscosas [Sheskey y cols., 2020]. Tiene un pKa en un rango de 3,4 a 4,4 [Shinde & Nagarsenker, 2009]. En esta tesis se ha utilizado alginato sódico de viscosidad media. Es prácticamente insoluble en etanol 95%, éter, cloroformo y mezclas de etanol/agua en las que el contenido

de etanol sea superior al 30% en peso [Sheskey y cols., 2020]. En presencia de una concentración de etanol del 15 %, la viscosidad del alginato incrementa [Hermansson y cols., 2016].

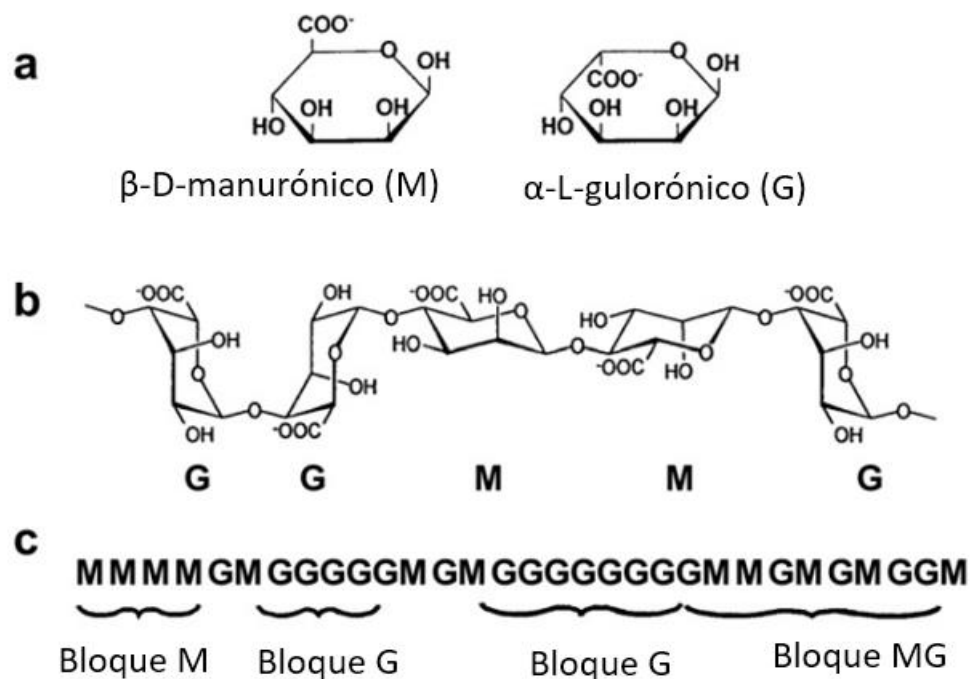


Figura 15. Estructura química del alginato: (A) monómeros de alginato, (B) conformación de cadenas y (C) distribución en bloque. Extraído de Draget y Taylor, 2011.

En relación a su estabilidad, el alginato de sodio es un material higroscópico, aunque estable si se almacena a baja humedad relativa y baja temperatura. En solución, es estable a pH 4-10. Por debajo de pH 3 el ácido algínico precipita [Sheskey y cols., 2020]. En solución acuosa al 1 % de concentración de alginato, expuesta a diferentes temperaturas, su viscosidad se reduce del 60 a 80 % del valor original tras 2 años de almacenamiento [Pávics, 1970]. En el almacenamiento a largo plazo, las soluciones son susceptibles a crecimiento microbiano afectando a la viscosidad del alginato [Coates & Richardson, 1974]. El calentamiento del alginato a unos 70 °C, provoca la despolimerización de este polímero lo que se traduce en la pérdida de viscosidad [Coates & Richardson, 1974].

El alginato tiene la capacidad de formar hidrogeles, por el entrecruzamiento de las cadenas de su estructura, hay dos formas convencionales de gelificar el alginato: bajando el

pH debajo de valores de pKa y mediante la introducción de cationes (gelificación ionotrópica) [Gurikov & Smirnova, 2018]. La gelificación ionotrópica se puede realizar mediante difusión o fraguado interno. El método de difusión se realiza mediante el uso de reticulantes iónicos como lo es el cloruro de calcio. En el cloruro de calcio, los cationes divalentes como el calcio tienen preferencia por los bloques G del alginato, formando un gel rígido. El bloque G se une con otro bloque G formando una estructura llamada caja de huevos (**Figura 16**) [Fu y cols., 2011]. El cloruro de calcio es el agente más utilizado para reticular el alginato, sin embargo, puede provocar una rápida gelificación y poco controlada debido a su alta solubilidad en soluciones acuosas. Para solucionar la rápida gelificación se hidroliza con soluciones amortiguadoras con fosfatos que compiten por el grupo carboxilato del alginato en la reacción entre los iones calcio, retardando la gelificación. También se utiliza sulfato de calcio y el carbonato de calcio, esto debido a su menor solubilidad, retardando la gelificación y ampliando el tiempo de trabajo de los geles de alginato. Por otra parte, el método de fraguado interno está mediado por un cambio de pH, que a su vez, libera cationes reticulantes de la insolubilidad de una forma quelada, como ejemplo se utiliza la glucono-delta-lactona [Lee & Mooney, 2012].

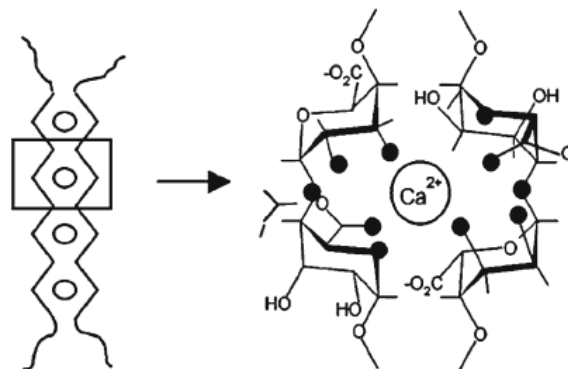


Figura 16. Ilustración del modelo de “caja de huevos” para gel de alginato de calcio y la interacción entre los cationes de calcio y los átomos de oxígeno (círculos negros) en los monómeros de ácido gúlico. Extraído de Fu y cols., 2011.

Dentro de métodos no convencionales, se han utilizado: La criogelación de alginato asociados a métodos ionotrópicos; La utilización de separación de fases no inducido por solventes (precipitación por inmersión), donde la solubilidad del alginato disminuye al utilizar

no solventes; La gelificación inducida por dióxido de carbono, donde se somete una solución de alginato a dióxido de carbono presurizado; La gelificación por radiación UV; El uso de ácidos carboxílicos que pueden gelificar el alginato [Gurikov & Smirnova, 2018].

El alginato de sodio es incompatible con derivados de acridina, acetato y nitrato de fenilmercurio, las sales de calcio, metales pesados. Además, bajas concentraciones de electrolito provocan un aumento de viscosidad, pero altas concentraciones provocan la formación de sal de alginato (esto ocurre si hay más del 4% de cloruro de sodio presente [Sheskey y cols., 2020]).

El alginato ha sido utilizado en formas farmacéuticas para administración tópica y oral, además se ha utilizado como excipientes en pastas, cremas y geles [Tønnesen & Karlsen, 2002]. En formulaciones de comprimidos, el alginato se utiliza como aglutinante y disgregante; en cambio en cápsulas se utiliza como diluyente. Se ha usado el alginato en formulaciones de liberación sostenida, ya que retrasa la disolución de un fármaco a partir de comprimidos, cápsulas, suspensiones acuosas y jaleas [Sheskey y cols., 2020].

Es un polímero biocompatible, además es bioadhesivo, lo que ha permitido su uso como sistema de liberación de fármacos a través de mucosas [Swain, y otros, 2012]. Se han desarrollado hidrogeles de alginato, donde se ha estudiado la cesión a partir de formulaciones mucoadhesivas [Boateng, y otros, 2010]. La bioadhesión esofágica de suspensiones de alginato puede proporcionar una barrera contra el reflujo gástrico [Richardson y cols., 2004]. En soluciones oftálmicas se ha incorporado el alginato como agente mucoadhesivo, además de usarse en implantes intraoculares [Sharma y cols., 2019], y sistemas de administración nasal [Cardia y cols., 2019].

El alginato se puede encontrar en diferentes viscosidades: de baja viscosidad (<240 mPas); viscosidad media (240-3500 mPas); y alta viscosidad (>3500 mPas). La viscosidad tiene una relación directa con la tasa de flujo, que afecta al tiempo de gelificación y diversas preparaciones [Devina y cols., 2018]. En este trabajo doctoral se ha utilizado alginato de viscosidad media de Merck, de un aspecto marrón tenue, en forma de polvo, de una viscosidad de 2000 mPas.

Pectina [CAS 9000-69-5] (MERCK)

La pectina (**Figura 17**) es un polisacárido que se obtiene de la piel de cítricos. Se encuentra en la pared celular de los vegetales, donde funciona como agente hidratante para la red de celulosa. Su estructura consiste en cadenas de ácido galacturónico unidos por enlaces glicosídicos, con un peso molecular de 30000 a 100000 g/mol [Sheskey y cols., 2020]. Es un polvo blanco-amarillento, soluble en agua, pero insoluble en disolventes orgánicos [Kaya y cols., 2014]. Tiene un pKa de 3,5 [Opanasopit y cols., 2008]. La pectina es un material no reactivo y estable, y se puede almacenar en lugares frescos y secos [Sheskey y cols., 2020]. En solución, la pectina es estable a temperaturas altas y a un pH 3,5 comienza a despolimerizarse con calor [Flutto, 2003].

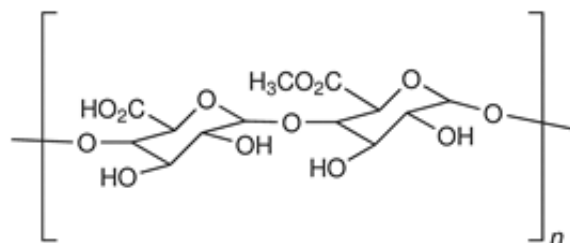


Figura 17. Estructura química de la pectina [Sweetman, 2011].

Por su capacidad gelificante, formador de películas, propiedades aglutinantes, biocompatibilidad, la pectina muestra grandes ventajas en formulaciones farmacéuticas [Liu, 2007]. Debido a las propiedades gelificantes se ha utilizado en formulaciones intranasales para modificar la absorción de fármacos, y también como estabilizador de emulsiones [Watts & Smith, 2009] [Lund, 1994]. De manera experimental, pectina se ha utilizado en formulaciones tipo gel para la administración oral sostenida de ambroxol. Las perlas formadas por la gelificación de pectina se han estudiado como formas de liberación controlada de varios

fármacos (sulfasalazina, ipsalazina, balsalazina y olsalazina) en el tracto gastrointestinal [Chourasia & Jain, 2003]. Las matrices de pectina se han utilizado en parches para la administración transdérmica de cloroquina [Musabayane, Munjeri, & Matavire, 2003]. Se han estudiado matrices de pectina con diferentes grados de esterificación como comprimidos de liberación controlada [Sheskey y cols., 2020].

Las pectinas se encuentran en todas las plantas, pero las principales materias primas para la producción de pectina son las cáscaras de los cítricos, el hollejo de uvas y la pulpa de remolacha [Ostrozhenkova, 2020]. Las materias primas mencionadas se utilizan para producir pectina de diferentes grados de metilación y acetilación: pectina de alto contenido en metoxilo (>50%) y pectina de bajo metoxilo (<50%). La pectina de bajo metoxilo es menos sensible a la acidez, mientras que la de alto es extremadamente sensible. La pectina requiere una mayor concentración de ácidos solubles para formar el gel debido a enlace de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre las cadenas de pectinas. La de bajo metoxilo tiene cualidades gelificantes debido a los iones de calcio [Singhal & Hulle, 2022]. En esta tesis doctoral se utilizó pectina de cáscaras de cítricos de bajo metoxilo de Merck, de color amarillo tenue a marrón, en forma de polvo con un porcentaje de grupos metoxilos > 6,7%.

3.1.2.2.- Proteínas

Caseína [CAS 9000-71-9] (MERCK) y Caseinato sódico [CAS 9005-46-3] (MERCK)

La caseína de leche de bovino es una fosfoproteína (**Figura 18**), que se encuentra como sal cálcica y representa entre el 77 al 82 % de las proteínas en la leche. Está formada por alfa, beta y kappa caseína, que se diferencian por su peso molecular comprendido entre 19 y 25 kDa y su punto isoeléctrico comprendido entre 4,6 y 4,8. Las cuatro fosfoproteínas son anfifílicas y tienen estructuras poco definidas. En la industria farmacéutica se puede utilizar en forma ácida, la cual presenta baja solubilidad en medio acuoso, o como caseinato de sodio, que es soluble, excepto cerca del punto isoeléctrico [Fox & Mulvihill, 1990].

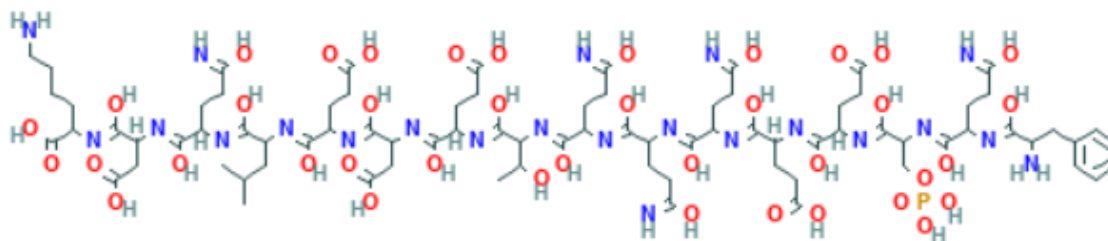


Figura 18. Estructura química de la caseína [NCBI, 2022].

La caseína β es la más hidrofóbica de las caseínas, contiene una región hidrofóbica que abarca dos tercios de la proteína. La caseína α , es la más hidrofílica, contiene tres dominios hidrofobos distintos que se distribuyen a lo largo del polipéptido. La caseína κ , es la única caseína glicosilada [Farrell y cols., 2004]. La caseína α puede formar polímeros mediante la asociación de extremo a extremo de su región hidrofóbica, en cambio las demás forman puentes disulfuros hidrofóbicos, siendo la caseína β la que forma partículas esféricas en ausencia de calcio [Kelly y cols., 2000].

Las caseínas son proteínas anfifílicas que se auto ensamblan en estructuras micelares (50 a 500 nm) en soluciones acuosas, debido a la formación de nanoclusters de fosfato de calcio los cuales les permite mantener la integridad micelar [De Kruif & Holt, 2003]. En la leche, del 85 % al 90 % son micelas de caseinato [Kelly y cols., 2000].

La separación de caseína a partir de la grasa de la leche se realiza por diferentes procesos. Uno de los procesos se lleva a cabo mediante la precipitación, debido a la adición de ácidos, permitiendo que el complejo caseinato de calcio y fosfato de calcio que forma la caseína, se disocie. A un pH 5,3 la caseína comienza a precipitar lentamente. Otro proceso es la coagulación enzimática, donde se agrega quimosina/renina que escinde una porción de la caseína llamada glicomacropéptido, este proceso desestabiliza las micelas presentes en la leche, formando coágulos de caseína [Sarode y cols., 2016]. Tras la separación, el cuajo se lava con agua debido a que son varios los minerales que quedan atrapados en el mismo lo que lo hace más impuro. Finalmente, la cuajada puede ser susceptible a ataques microbianos, por lo que se debe secar rápidamente y prensarse [Rollema & Muir, 2009].

Debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, la caseína, es un biopolímero con propiedades tensioactivas con elevado potencial para ser utilizado en la preparación de formas de dosificación de fármacos. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la caseína es un material adecuado para la administración eficaz de fármacos. Se han preparado microesferas de caseína que se han utilizado como portadores parentales biodegradables para administración por vía intramuscular, intraperitoneal, intratumoral directa o intraarterial. También se han preparado a partir de caseína, biofilm y microesferas para la liberación sostenida por vía oral [Elzoghby y cols., 2011].

Los caseinatos son las formas hidrosolubles de la caseína, obtenida por la adición de sales iónicas a la caseína recién precipitada. Cuando se utiliza hidróxido de sodio se obtiene caseinato de sodio. También se puede producir caseinato de potasio, calcio o amonio si se utiliza hidróxido de potasio, calcio o amonio, respectivamente. Estos tipos de caseinatos tienen propiedades similares. Sus soluciones acuosas son translúcidas, de color pajizo y viscosas, en cambio las soluciones de caseinato de calcio son turbias ya que el caseinato de calcio forma agregados con el agua [Augustin y cols., 2011].

Los caseinatos poseen una, buena solubilidad, aunque depende en gran medida del pH, fuerza iónica y la temperatura. La solubilidad del caseinato de sodio, a un pH de 5,6 a 6,2, mejora considerablemente al agregar fosfato de sodio. El caseinato de sodio tiene una solubilidad más baja cerca de su pl (pH 4,6), que se incrementa drásticamente al aumentar el pH a valores comprendidos entre 6,5 y 8,0 [Jahaniaval y cols., 2000].

Debido a las interacciones proteína-proteína y producto de la hidratación de los caseinatos, estos presentan una elevada viscosidad. La viscosidad aumenta rápidamente (de manera exponencial para el caseinato de sodio) con la concentración. Las soluciones de caseinato presentan un comportamiento newtoniano a bajas concentraciones de proteína y un comportamiento pseudoplástico a altas concentraciones [Southward, 1985]. La viscosidad de los caseinatos aumenta con la concentración de sal y la disminución de la temperatura [Augustin y cols., 2011]. Cationes monovalentes aumentan exponencialmente la viscosidad de soluciones de caseinato de sodio debido a la competencia de la sal por el agua. Cationes divalentes aumentan la viscosidad del caseinato de sodio hasta un máximo y luego la disminuye, debido a la agregación de proteínas [Augustin y cols., 2011]. Las soluciones de

caseinato de sodio pueden formar geles en pH ácido, formándose red de proteínas de color blanco [Braga y cols., 2006].

El caseinato de sodio en presencia de etanol, da a lugar a cambios conformacionales y la precipitación de esta proteína. Sin embargo, si en la preparación de la solución de caseinato se dispersa en agua y luego en etanol, la solubilidad aumenta, y el punto crítico de concentración de etanol es de un 25% en peso, esto en estudios de emulsiones de aceite en agua [Erleben y cols., 2021].

En esta tesis se ha utilizado caseína de leche de bovino de Merck, de color amarillo a marrón, en forma de polvo, con una humedad inferior al 7%. También se utilizó caseinato de sodio de leche de bovino de Merck, de color blanco hueso, en forma de polvo.

Albúmina de suero de bovino [CAS 9048-46-8] (MERCK)

La albúmina de suero (**Figura 19**) es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo (52-62 %) [Jahanban-Esfahlan & Panahi-Azar, 2016]. Está constituida por una cadena polipeptídica compuesta por aproximadamente 585 residuos de aminoácidos La albúmina de suero de bovino (BSA) se usa como modelo en sustitución de la albúmina de suero humano (HSA). En su estructura tiene 17 puentes disulfuros reticulados entre cisteínas para estabilizar su estructura [Roufegarinejad y cols., 2019]. Su peso molecular es de aproximadamente 66,8 kDa. EL BSA tiene un punto isoeléctrico de 4,7 [Ge y cols., 1998]. El BSA debe conservarse a temperaturas entre 2 y 8 °C y protegido de la luz [Scientific, 2018].



Figura 19. Estructura tridimensional de la albúmina de suero de bovino [Tang y cols., 2020].

La albúmina es susceptible a la degradación química y la desnaturalización por exposición a cambios de pH extremos, altas concentraciones de sal, calor, enzimas solventes orgánicos entre otros agentes químicos [Sheskey y cols., 2020].

La albúmina humana tiene numerosas aplicaciones en formulaciones farmacéuticas, en agentes de diagnóstico, en alimentos y en análisis químicos [Atmeh, Arafa, & Al-Khateeb, 2007]. Se ha utilizado como estabilizador de formulaciones biológicas para prevenir la agregación de proteínas. Se ha investigado albúmina de suero humana para estabilizar y evitar la agregación de eritropoyetina e interferón α -2bm en nanosistemas terapéuticos [Sheskey y cols., 2020].

En esta tesis doctoral se ha utilizado suero albumina de bovino, fracción V pH 5,2 de Merck, de color amarillo y en forma de polvo.

3.1.3 Excipientes estabilizantes de emulsiones W/W

Mucina [CAS 84082-64-4] (MERK)

La mucina (**Figura 20**) es una glicoproteína compuesta por oligosacáridos y proteína. Es el principal componente macromolecular de las secreciones de mucosas que recubren las cavidades orales, respiratorias, gastrointestinales y urogenitales de los animales. Es responsable de la viscoelasticidad de las secreciones, proporcionando protección para superficies epiteliales delicadas y expuestas físicamente [Adikwu, 2006].

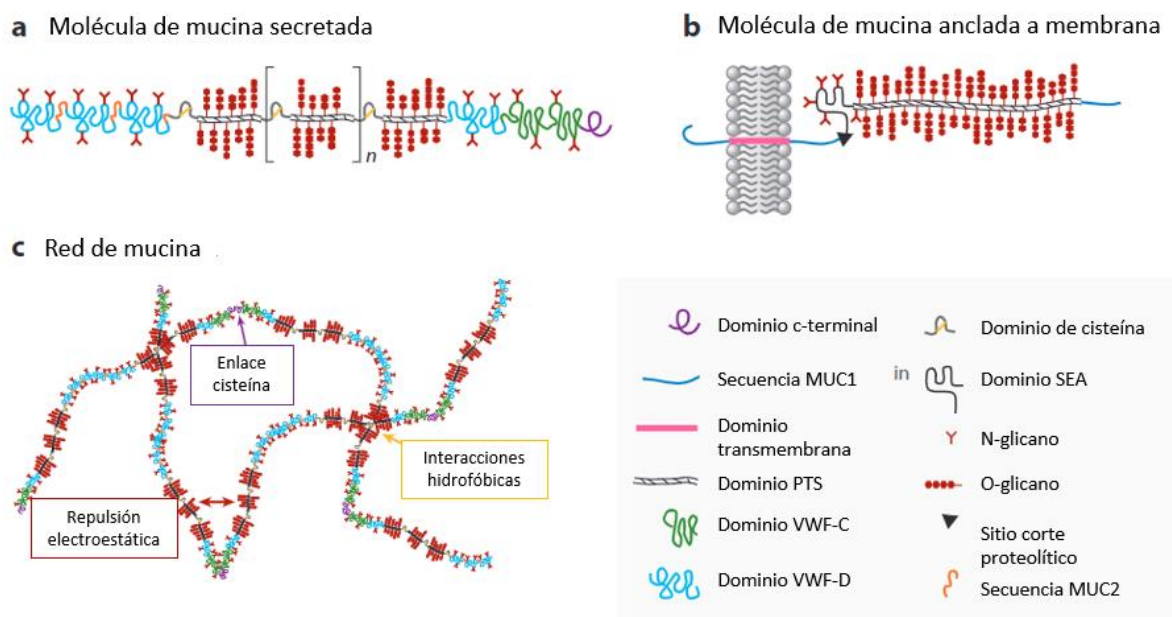


Figura 20. Representación esquemática de la mucina. (A) mucina secretada, (B) mucina anclada a membrana y (C) Red de gel de mucina [Wagner, 2018].

En solución acuosa, las cadenas de mucina de alto peso molecular forman una red mediada por una compleja serie de enlaces reversibles que incluyen interacciones hidrofóbicas, que se estabilizan por la repulsión electrostática entre las cadenas laterales de polisacáridos con carga negativa [Schipper y cols., 2007]. La configuración de las cadenas de mucina y las fuerzas de interacción de la red son sensibles a las variaciones de pH, así como a

la concentración de iones y pequeñas moléculas, es por esto que dependiendo de donde se ubique la mucina y su función biológica, presentan unas propiedades mecánicas y bioquímicas u otras [Wagner, 2017].

La mucina puede extraerse de diversas fuentes (peces, medusas, estrellas de mar, ranas, caracoles, etc.). Sin embargo, para aplicaciones farmacéuticas, se utiliza generalmente mucina procedente de mamíferos, como la mucina gástrica porcina y la mucina submaxilar de ovino, que se pueden obtener en grandes cantidades, facilitando su uso en investigación [Wagner, 2018].

En farmacia, se han utilizado las mucinas como vehículos de principios activos formando parte de matrices con otros componentes como alginato, gelatina, celulosa y quitosano, entre otros [Builders y cols., 2008][Laurén y cols., 2018]. La mucina posee carga neta negativa, lo que permite incorporar fármacos catiónicos y retardar la liberación [Marczynski y cols., 2021]. Debido a las propiedades hidratantes y lubricantes, las mucinas tienen un potencial uso en paciente con el síndrome de ojo seco y en la sequedad bucal, formando una barrera protectora contra la evaporación del agua [Frenkel & Ribbeck, 2015] [Sullivan y cols., 2002].

En esta tesis doctoral se ha utilizado mucina de estómago de porcino de Merck, de color amarillo apagado a marrón, en forma de polvo, de pH 5.

Glucono-delta-lactona (δ) [CAS 90-80-2] (MERCK)

La glucono-delta-lactona (**Figura 21**) es un éster, es un polvo cristalino blanco e inodoro. Se hidroliza parcialmente en ácido glucónico con la adición de agua y la velocidad de esta reacción aumenta a temperaturas y pH más elevados [Pocker & Green, 1973]. Este producto es biocompatible y permite gelificar parcial o totalmente ciertas soluciones polímeras [Takeuchi & Cunha, 2008]. Tiene un peso molecular de 178,14 g/mol, es soluble en agua fría (590 mg/L) y ligeramente soluble en etanol (0,01 mg/L) [Sheskey y cols., 2020]. En solución acuosa al 1% tiene un pH de 3,6 que cambia a 2,5 en 2 horas. [Sheskey y cols., 2020].

3.1.4 Componentes utilizados en cultivos celulares

Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM)

El DMEM es utilizado ampliamente como medio basal para favorecer el crecimiento de diversas células de mamífero. Este medio está compuesto de diferentes aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, dextrosa, rojo fenol y una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio. Sin embargo, el DMEM no contiene proteínas, lípidos ni factores de crecimiento, por lo que requiere suplementación según la aplicación que se desea utilizar. Generalmente se suplementa el DMEM con un 10 % de suero fetal de bovino (FBS).

Suero de bovino fetal (FBS) (GIBCO)

El suero de bovino fetal (FBS) es un subproducto de la cría de ganado de la industria alimenticia. Este medio está compuesto por factores de crecimiento esenciales para el mantenimiento y el crecimiento de células. El FBS se utiliza como suplemento del medio de crecimiento basal en cultivo celular, y se complementa con DMEM. Tiene un total de proteínas de entre 3 a 5 g/dL, de hemoglobina inferior a 25 mg/dL, en un pH entre 6,9 a 7,8.

Tripsina-EDTA (0,05%) (GIBCO)

La tripsina, es una enzima con capacidad digestiva, se emplea para la disociación celular, el pasaje de cultivos celulares rutinarios y la disociación de tejido primario (células aisladas de un tejido animal o vegetal). El EDTA, un agente quelante, aumenta la actividad enzimática al eliminar los iones de calcio y magnesio. Estos iones protegen los enlaces peptídicos sobre los que actúa la tripsina, además de mejorar la adhesión de célula a célula. La concentración de tripsina necesaria para la disociación varía en función del tipo de célula

y de los requerimientos experimentales. En esta tesis se ha utilizado a una concentración de 0,05% Tripsina-EDTA para disociar las células y el pasaje de cultivos.

PBS pH 7,2 (GIBCO)

La solución amortiguadora de fosfatos salino (PBS) estéril se utiliza para el lavado de células antes de la disociación, el transporte de muestras de células o tejido, la dilución de células para el recuento y la preparación de reactivos.

Bromuro de tetrazolio azul de tiazolilo (MTT) [CAS 298-93-1] (MERCK)

El MTT es un colorante que se utiliza en la medición de la proliferación celular. MTT produce una solución amarillenta que se convierte en cristales insolubles de formazán, de color azul oscuro, por la acción de las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas. Los cristales azules se disuelven con dimetil sulfoxido (DMSO) y la intensidad se mide colorimétricamente a 570 nm [Putnam y cols., 2001].

3.1.5 Otros componentes químicos

3.1.5.1 Solventes

Agua (Millipore)

Se ha utilizado agua desionizada filtrada, obtenida mediante un sistema Mili-Q®. Este proceso de purificación implica etapas sucesivas de filtración y desionización (mediante la

electrodesionización) para conseguir la pureza adecuada. Su resistividad es de 18,2 MΩ·cm a 25 °C.

Acetonitrilo [CAS 75-05-8] (Carlo Erba)

El acetonitrilo es un solvente orgánico utilizado como fase móvil orgánica en cromatografía. Presenta una pureza $\geq 99,9\%$ y su fórmula química es C_2H_3N . Es un líquido incoloro con un peso molecular de 41,05 g/mol y una densidad 0,786 g/cm³ a 20 °C.

Dimetil sulfóxido (DMSO) [CAS 67-68-5] (Carlo Erba)

El dimetil sulfóxido es un solvente polar. Posee una pureza $\geq 99,5\%$ y su fórmula química es C_2H_6SO . Su aspecto es incoloro, el peso molecular es 78,13 g/mol y es miscible en agua. En esta Tesis se usó para en el ensayo MTT para disolver los cristales de formazán.

Acetato de etilo [CAS 141-78-6] (MERCK)

El acetato de etilo o etanoato de etilo se emplea como fase orgánica para disolver el PLGA. Su fórmula química es $C_4H_8O_2$ y es un líquido incoloro. Es miscible con hidrocarburos, alcoholes y ésteres y poco soluble en agua. Su peso molecular es de 88,11 g/mol, su punto de ebullición de 77 °C y su densidad es de 0,9 g/cm³ a 20 °C.

Etanol [CAS 64-17-5] (Alcoholes Montplet) y Etanol [CAS-N 64-17-5] (Carlo Erba)

Es un solvente orgánico utilizado para la disolución de ML. Su fórmula química es C_2H_6O y es un líquido incoloro. Tiene un peso molecular de 46,07 g/mol, con un punto de

ebullición de 78 °C y una densidad de 0,79 g/cm³ a 20 °C. El etanol utilizado en la preparación de principio activo fue de alta pureza de 96°.

3.1.5.2 Soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7,4

La solución de PBS pH 7,4 se utilizó en la preparación de emulsiones y como medio receptor en los ensayos de liberación. La solución está compuesta por 0,27 g de KH₂PO₄, 1,59 g de Na₂HPO₄ y 8 g NaCl en 1000 mL agua desionizada filtrada (Milli-Q®) y se ajustó el pH a 7,4 con ácido ortofosfórico.

Solución acuosa pH 2,5

La solución acuosa pH 2,5 se utilizó como fase móvil en la cuantificación de hidroclicloruro de CL mediante HPLC. La solución está compuesta por 2,81 g Na₂HPO₄ (hidrogenofosfato de sodio) y se ajusta a pH 2,5 con ácido ortofosfórico en 1000 mL de agua desionizada filtrada (Milli-Q®) [Stanković y cols., 2013].

Solución reguladora pH 5,8

La solución reguladora de fosfatos 0,1M pH 5,8 se utilizó en la cuantificación de hidroclicloruro de MF mediante HPLC. Se preparó con 1,3 g de Na₂HPO₄·2H₂O y 13,12 g de Na₂HPO₄·H₂O y se ajustó a pH 5,8 con ácido ortofosfórico en 1000 mL de agua desionizada filtrada (Milli-Q®) [Chhetri y cols., 2014].

3.1.5.3 Marcadores fluorescentes

Isotiocianato de fluoresceína [CAS 33.26-32-7] (MERCK)

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es un marcador fluorescente (**Figura 22**) que es de color amarillo anaranjado con un máximo de absorción a 495 nm. Tras la excitación, se observa un color amarillo verdoso con un máximo de emisión 525 nm. Tiene un peso molecular de 389,39 g/mol y una solubilidad de $5 \cdot 10^{-3}$ mg/L en DMSO [Merck, 2017]. En esta Tesis se utilizó como marcador fluorescente del caseinato de sodio.

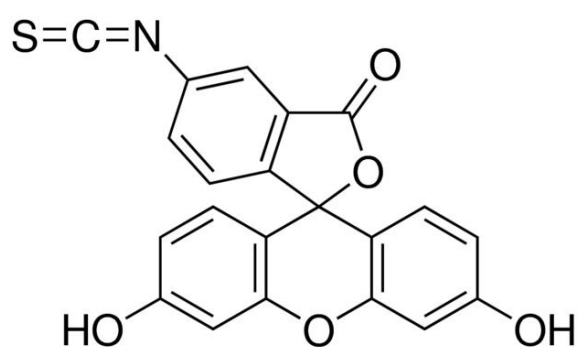


Figura 22. Estructura química del isotiocianato de fluoresceína [Merck, 2017].

Isotiocianato de rodamina [CAS 36877-69-7] (MERCK)

El isotiocianato de rodamina B (RhBITC) (**Figura 23**) es un marcador de fluorescencia orgánico, que es de color rojo con un máximo de absorción a 555 nm. Tiene un peso molecular de 536,08 g/mol y es soluble en etanol y DMSO aproximadamente a $15 \cdot 10^{-3}$ mg/L [Merck, 2020]. En este trabajo se utilizó para marcar mucina en nanopartículas de PLGA.

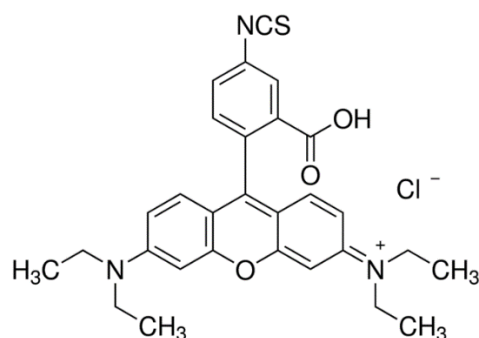


Figura 23. Estructura química del Isotiocianato de rodamina [Merck, 2020].

3.1.5.4 Otros componentes

Azida de sodio [CAS 26628-22-8] (Thermo Scientific)

La azida de sodio es un compuesto inorgánico, de un peso molecular de 65,01 g/mol. Es utilizado como conservante para inhibir el crecimiento de contaminantes como bacterias u hongos en reactivos de laboratorio, muestras de suero y equipo de diálisis. Es un producto tóxico para el ser humano, debido a que es considerado un potente vasodilatador, además que no existe un antídoto para la intoxicación por este componente [Sweetman, 2011]. En esta tesis doctoral se ha utilizado este reactivo como agente conservante a una concentración inferior al 0,04% en peso.

Tween® 20 [CAS 9005-64-5] (Sigma Aldrich)

Tween 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) es un tensioactivo no iónicos del grupo de los ésteres de sorbitano polioxietilenados, también denominados Polisorbatos. Tween 20 o polisorbato 20 está constituido por la cadena hidrocarbonada del ácido láurico y contiene 20 moles de óxido de etileno. Es un líquido amarillento viscoso a 20 °C.

PLGA Resomer® RG 752 H [CAS 26780-50-7] (MERCK)

El Poli (D, L-lactida-co-glicolida) (**Figura 24**) es un copolímero del ácido láctico y el ácido glicólico. El PLGA utilizado tiene una relación láctico:glicólico 75:25 p/p, con peso molecular 4000-15000 g/mol. Está aceptado por la FDA como excipiente para proporcionar una liberación sostenida de fármacos, debido a su biodegradabilidad y biocompatibilidad [Wang y cols., 2021]. Se ha utilizado para la preparación de nanopartículas.

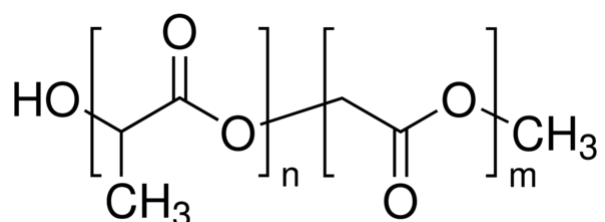


Figura 24. Estructura química del PLGA.

3.1.6 Otros materiales

Membrana de diálisis OrDial D14 (Orange Scientific)

Membrana de celulosa regenerada en forma de tubo, de diámetro 15 mm, con 2,02 ml/cm de volumen, un espesor de 20 μm y un tamaño de poro de 12000 a 14000 MWCO (molecular weight cut off). Esta membrana fue utilizada en los estudios de liberación de principios activos a partir de emulsiones.

Membrana de diálisis Spectra/Por® Biotech CE (SpectrumLabs)

Membrana de celulosa regenerada en forma de tubo, de diámetro de 10 mm, 0,78 ml/cm de volumen y un tamaño de poro de 3500 a 5000 MWCO. Esta membrana fue utilizada en los estudios de liberación de principios activos de emulsiones con nanopartículas incorporadas.

Unidad de filtración Millex® -GP; 0.22 µm (MERCK)

Unidades de filtrado de poliétersulfona de tamaño de poro de 0,22 µm, esterilizadas por radiación. Estos filtros soportan una presión máxima de 10,5 bares. Se utilizaron para filtrar las muestras provenientes de los estudios de liberación antes de ser analizadas por HPLC.

Centriprep® YM-3, 3 kDa (MERCK)

Los filtros centrífugos Centriprep® de membrana de celulosa regenerada (**Figura 25**) son dispositivos de ultrafiltración desechables que se utilizan para purificar, concentrar y desalar muestras biológicas de un rango de volumen de 2 a 15 mL. Proporciona una ultrafiltración de 30000 Dalton en un área de 1 cm². Consisten en un recipiente de muestra con una tapa con cierre giratorio, un colector de filtrado que contiene una membrana de celulosa regenerada Ultracel® de baja adsorción. Se utilizaron para concentrar las nanopartículas de PLGA.



Figura 25. Unidades de filtrado centrífugo Centriprep® YM-3, 3 kDa.

3.2 Equipos

3.2.1 Equipos para la preparación de emulsiones y nanopartículas

Homogenizador de alta cizalla, ULTRA-TURRAX® (IKA)

El homogenizador IKA® ULTRA-TURRAX® T-18 digital (**Figura 26** ¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.), permite dispersar un volumen de 5 a 15 mL y tiene un rango de velocidad de 3.000 a 25.000 rpm. El equipo lleva acoplado el vástago S18N-10G. Se utilizó para la preparación de emulsiones.



Figura 26. Homogenizador ULTRA-TURRAX® T-18 digital (IKA®).

Rotavapor (Büchi®)

El sistema de rotaevaporación Büchi® (**Figura 27**) consta de: un baño calefactor, una bomba de vacío V-100, un refrigerador recirculante Chiller F-10, y un controlador. Se puede regular la temperatura de 20 a 180 °C, según el solvente a evaporar. Este equipo se utilizó en la preparación de nanopartículas.



Figura 27. Rotavapor R-215 (Büchi®), acoplado a una bomba de vacío V-700 (Büchi®)

Bomba peristáltica 323 DU (Watson-Marlow)

La bomba peristáltica utilizada posee un flujo de 0,09 a 2000 mL/min, con una velocidad de 3 a 400 rpm (**Figura 28**). Se utilizó para la preparación de nano-emulsiones utilizadas como plantilla para la preparación de nanopartículas de PLGA.



Figura 28. Bomba peristáltica 323 DU (Watson-Marlow).

Sonda de ultrasonidos (HIELSCHER)

El homogeneizador ultrasónico portátil modelo UP200Ht (**Figura 29**), posee una sonda ultrasónica de 200 vatios y está protegida con una caja acústica SPB-L, de cristal acrílico. Se utilizó para la dispersión de las partículas de mucina.



Figura 29. Homogeneizador ultrasónico portátil modelo UP200Ht (HIELSCHER).

pHmetro y conductímetro (Mettler Toledo)

Se utilizó el equipo Seven compact Duo (**Figura 30**), acoplado al electrodo de pH InLab[®] Expert Pro-ISM (Mettler Toledo) y la sonda de conductividad InLab[®]710 (Mettler Toledo), ambas con un sensor de temperatura incorporado, para las mediciones de pH y conductividad en soluciones y emulsiones.



Figura 30. (A) pHmetro y conductímetro, Seven compact Duo, (B) electrodo de pH InLab® Expert Pro-ISM, (C) sonda de conductividad InLab®710, (Mettler Toledo).

3.2.2 Equipos para la caracterización

Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments)

Es un equipo que permite determinar el tamaño de partícula basado en la tecnología de la luz dinámica dispersada (DLS, Dynamic light scattering) (**Figura 31**), también permite conocer el potencial Z de diferentes partículas. La tecnología de DLS, está basada en las fluctuaciones de un láser dispersado por las partículas, que produce su movimiento browniano, debido a las interacciones con el solvente. Este equipo fue utilizado para la determinación del tamaño, polidispersidad y potencial zeta de nano-emulsiones y nanopartículas.



Figura 31. Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).

Micro-Raman confocal (Jobin-Yvon LabRam HR800)

La espectroscopía Raman es una técnica de alta resolución que permite identificar químicamente la estructura de la materia. El fundamento se basa en medir la luz dispersada por un material sobre el cual se hace incidir un haz monocromático, esta luz dispersada presenta cambios en la longitud de onda respecto al haz incidente dependiente de la estructura química que posea la muestra. Los haces son recogidos por diversos filtros de muesca y detectores de carga aplicada (CDD) [Huong y cols., 2010].

La luz del micro-Raman (**Figura 32**) proviene de un láser de diodo (TEC-120 de Sacher Lasertechnik), que emite a $\lambda = 532 \text{ nm}$ y una potencia del láser sobre la muestra de 0,5-4 mV. El detector utilizado es un CCD enfriado a una temperatura de $-70 \text{ }^\circ\text{C}$. La muestra se observa a través de un microscopio óptico (Olympus BXFM). Este equipo se ha utilizado para identificar el sólido presente en algunas emulsiones. Este equipo está ubicado en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.

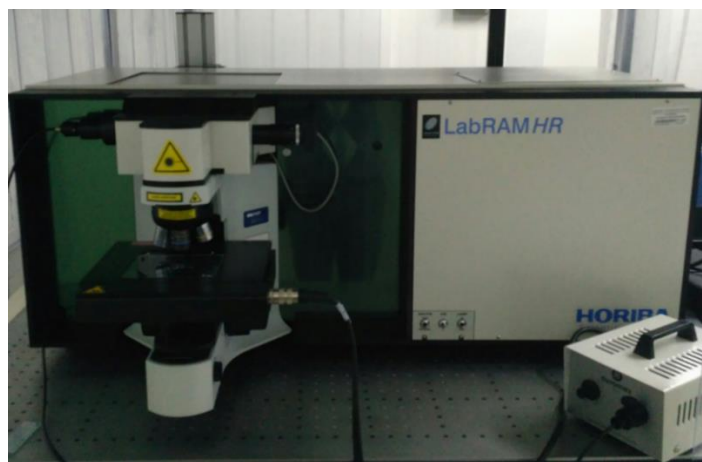


Figura 32. Micro-Raman confocal (Jobin-Yvon LabRam HR800), acoplado a un microscopio óptico (Olympus BXFM).

Reómetro (Thermo Fisher Scientific)

El equipo utilizado fue el reómetro HAAKE Rheostress 1 (**Figura 33**) que permite realizar diferentes mediciones como, por ejemplo, viscosidad a una velocidad de corte

definida o esfuerzo cortante, determinación del límite elástico con pruebas de tensión controladas, pruebas de fluencia y recuperación para mediciones de estabilidad, mediciones dinámicas (oscilación) para la determinación de la elasticidad. Además, permite el control de la temperatura de las muestras. Este equipo se utilizó para estudiar la estabilidad mediante reología de las diferentes emulsiones estudiadas.



Figura 33. Reómetro HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific).

Microscopio óptico (LEICA), microscopio fluorescencia (Olympus) y microscopio óptico confocal de fluorescencia (Zeiss)

El microscopio óptico Leica DM1000 Led (**Figura 34A**) fue utilizado para caracterizar las emulsiones y en los estudios de estabilidad. Las imágenes de las emulsiones se trataron con el software Leica Application Suite.

El microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX54TRF-6, tiene acoplada una cámara digital (Olympus DP73) (**Figura 34B**). Este equipo fue utilizado para la toma de imágenes fluorescentes de las emulsiones y está ubicado en la unidad de caracterización de líquidos nanoestructurados (U12) del NANBIOSIS (CIBER-BBN) en el IQAC-CSIC.

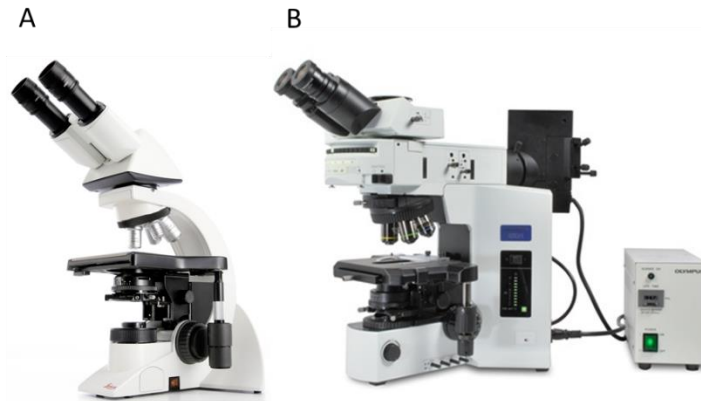


Figura 34. (A) microscopio óptico Leica DM1000 Led, (B) el microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX54TRF-6, acoplada a una cámara digital Olympus DP73.

Se utilizó el microscopio Zeiss LSM 880 Airyscan (**Figura 35**), con la lente de objetivo Plan-Apochromat 63x 1,4 Oil DIC M27 para caracterizar las emulsiones y nanopartículas, marcadas fluorescentemente. Con las imágenes obtenidas se hicieron reconstrucciones en tres dimensiones. Este equipo está ubicado en los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona.



Figura 35. El microscopio LSM 880 Airyscan (Zeiss).

3.2.3 Equipos para cesión y cuantificación de principios activos

Equipo de disolución (Hanson)

El equipo de disolución Vision® G2 Elite 8™ Dissolution Test (**Figura 36**) consta de un controlador Autoplus Maximizer™, el cual programa la toma de muestra y las condiciones de trabajo controlando las demás partes del equipo; un recolector de muestras automático Autoplus MultiFill™, que permite tomar muestras a diferentes tiempos; un baño termostático, donde las soluciones receptoras se mantienen a una temperatura establecida, esta solución receptora se usa para mantener el volumen fijo en el equipo de disolución gracias al controlador (USP 42-NF 37)[USP31, 2008].

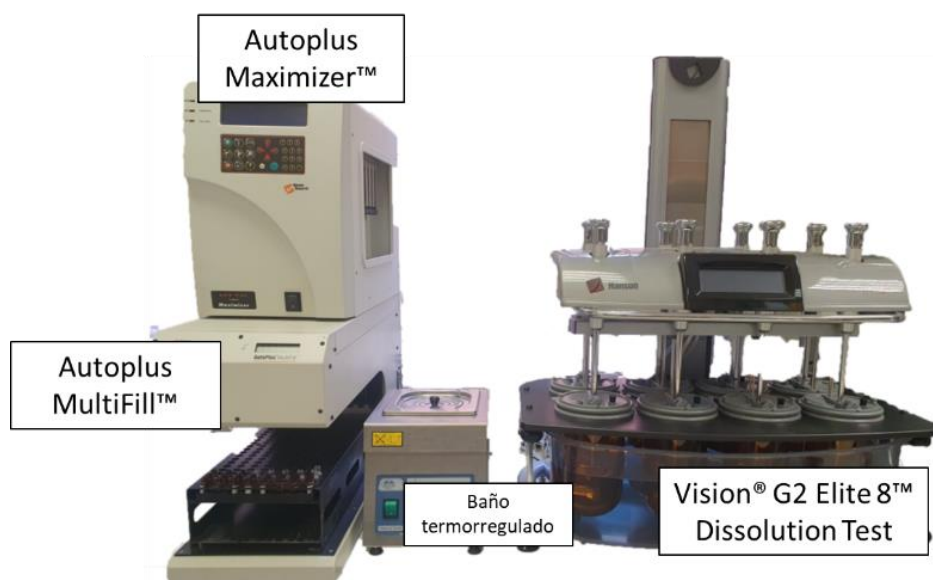


Figura 36. Equipo de disolución Vision G2 Elite 8 con muestreo automático (Hanson).

En esta tesis doctoral, se han utilizado vasos de 150 mL donde se incorpora una forma farmacéutica (solución, emulsión, etc.) que contiene un principio activo, ya sea en bolsas de diálisis o células de inmersión. En el vaso se vierte una solución receptora, PBS a 37°C. Al incorporar la forma farmacéutica se extrae muestra en diferentes tiempos para estudiar la liberación desde la misma. Se utilizó una agitación de 25 rpm, y se le adaptó la automatización de la toma de muestra para evitar el error humano al extraer muestras.

Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) (Shimadzu)

El equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Shimadzu, Nexera series (**Figura 37**). Este equipo permite separar analitos mediante diferentes fases y columnas de separación. El HPLC se utilizó para la cuantificación de principios activos.

Consta de: un controlador, que permite ajustar los diferentes parámetros para el funcionamiento; un desgasificador, que permite eliminar aire presente en las diferentes fases; dos bombas para fase acuosa y orgánica; un muestreador automático, que permite seleccionar las muestras previamente numeradas; y un detector UV/VIS donde se visualiza la señal de los analitos.

Las columnas de fase reversa utilizadas fueron: para hidrocloreto de CL la columna Xbridge® BEH C18 2,5 μm y longitud de 75 mm; para hidrocloreto de MF la columna Cortecs® C18 2,7 μm y longitud de 75 mm; y para ML la columna Cortecs® T3 2,7 μm y longitud de 50 mm, Waters. Cada columna se utilizó con su respectiva precolumna (CORTECS C18 VanGuard Cartridge Cart 2.7 μm , 3.9X5mm y XBridge BEH C18 V-Gd Cart 2.5 μm 3.9X5 XP).



Figura 37. Equipo de HPLC, Nexera series (Shimadzu).

3.2.4 Equipos para estudios de citotoxicidad

Espectrofotómetro para Microplacas (Epoch™)

Este equipo es un espectrofotómetro UV/Visible que puede cuantificar varias muestras en microplacas (**Figura 38**). Este equipo se utilizó para el ensayo de MTT, en el cual era necesario leer a una longitud específica.



Figura 38. Espectrofotómetro para Microplacas (Epoch™).

Cabina de seguridad biológica (Telstar)

La cabina de seguridad biológica de Clase II (**Figura 39**) se ha utilizado debido a que proporciona la protección: al personal, el producto y del medio ambiente de partículas peligrosas, tales como agentes que requieren de bioseguridad de nivel 1, 2 o 3 de contención. Posee un flujo laminar horizontal y un sistema de filtración de dos filtros HEPA; uno colocado sobre la superficie de trabajo y el segundo en el sistema de extracción de la cabina. Esta cabina se utilizó para trabajar con células en los ensayos de toxicidad, evitando contaminación de parte del exterior afectado al ensayo.



Figura 39. Cabina de seguridad biológica de Clase II (Telstar).

Incubador CO₂ (ThermoFisher Scientific)

El incubador de CO₂ Heracell 150i de 150 litros (**Figura 40**), permite mantener concentraciones de humedad (95 ±3%) CO₂ (0 a 20%), O₂ (1 a 90%) y temperatura (3 a 55°C). Posee un método de descontaminación con calor húmedo automático. Este equipo se utilizó para mantener células a una concentración de CO₂ y temperaturas controladas en un ambiente estéril, para realizar estudios de citotoxicidad.



Figura 40. Incubador de CO₂ Heracell 150i (ThermoFisher Scientific).

Centrífuga refrigerada Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific)

La centrifuga modelo Heraeus Megafuge 16R de Thermo Scientific (**Figura 41**) ofrece una gran capacidad, permitiendo adaptar diversos rotores para diferentes aplicaciones. El control de temperatura es de -10 a 40 °C. Tiene una velocidad máxima de 15200 rpm y 25830 *g*. Se utilizó para la concentración de nanopartículas y determinación de eficiencia de incorporación de principios activos.



Figura 41. Centrífuga refrigerada Megafuge 16R (Thermo Fisher Scientific).

3.3 Métodos

3.3.1 Preparación de las emulsiones

Se prepararon soluciones concentradas de cada biopolímero (polisacáridos y proteínas), para ello se pesó cada biopolímero y se incorporó PBS pesándolo en un vaso precipitado para llegar a la concentración deseada, luego mediante agitación magnética durante 1 hora a 250 rpm a 25°C. Posteriormente, las muestras se ultrasonicaron en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos para facilitar la disolución y se mantuvieron durante 12 horas a 25 °C, en un baño termostático, para eliminar burbujas de aire que se formaron durante la dispersión, obteniéndose las soluciones concentradas de cada biopolímero. Después, se prepararon mezclas de alginato-BSA (AB), alginato-caseinato (AC) y pectina-caseinato (PC), a diferentes concentraciones a temperatura ambiente. Para ello, las soluciones concentradas se mezclaron utilizando un homogeneizador de alta cizalla a 25.000 rpm durante 2 min para obtener las emulsiones, agregando una solución concentrada de biopolímero sobre el otro. (**Figura 42**). Después de 24 horas a 25°C, en un baño termostático, las emulsiones se utilizaron para los diferentes ensayos.

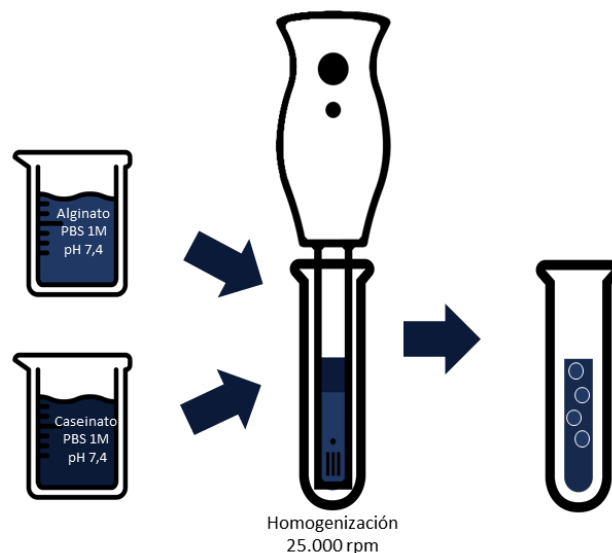


Figura 42. Esquema de formación de una emulsión de caseinato en alginato, a partir de dos soluciones concentradas de los biopolímeros, mediante homogeneización por ultraturrax.

Para cada formulación, se prepararon 6 g finales. Para ello, se mezclaron cantidades iguales en peso de solución de polisacárido y de solución de proteína, y cantidades extremas de cada una de las fases. Cuando la proporción de las fases era distinta, siempre se adicionó la fase que estaba en mayor proporción sobre la de menor proporción. En cambio, cuando el peso de las dos soluciones era el mismo, se mezclaron las dos fases a la vez. La composición de cada formulación, así como el orden de incorporación se detalla en el apartado de resultados para cada sistema estudiado.

En las formulaciones que contenían caseína o caseinato de sodio se adicionó un 0,04% de azida de sodio, que es un conservante antimicrobiano que evita la rápida contaminación de la proteína. Este conservante aparece en numerosas publicaciones donde se estudia el comportamiento físico o la reología de formulaciones con caseína, para evitar el crecimiento de microorganismos [Maestro y cols., 2020]. Aunque es un producto tóxico, se utiliza a muy baja concentración, por lo que no interfiere en las propiedades de las emulsiones y en un futuro se estudiará su sustitución por otro conservante adecuado para uso farmacéutico.

En el caso del sistema alginato-caseinato etanol (ACe), la solución concentrada de caseinato se preparó en una relación 70:30 en volumen de PBS:etanol.

3.3.2 Incorporación de principios activos

El hidrocloreuro de CL se incorporó en el sistema alginato-caseinato y pectina-caseinato al 2% de concentración final. De manera general, cuando se prepararon las soluciones concentradas poliméricas en PBS, el principio activo se incorporó en la solución polimérica que constituirá la fase interna de las emulsiones.

En relación con el hidrocloreuro de MF, se adicionó a las emulsiones del sistema pectina-caseinato a una concentración del 2% en peso. La incorporación del principio activo se realizó del mismo modo que en el caso del hidrocloreuro de CL.

La ML se incorporó al 1% en peso a emulsiones de caseinato en PBS-etOH en alginato. Debido a la baja solubilidad en agua de este principio activo, se disolvió en soluciones de

caseinato con una relación en volumen 70:30 de PBS y etanol. El alginato de sodio posee una baja solubilidad en etanol [Hermansson, 2016], en cambio, fue posible preparar soluciones de caseinato de sodio en la mezcla hidroalcohólica PBS: etanol en una relación en volumen de 70:30.

Todas las emulsiones con principios activos se caracterizaron macroscópica y microscópicamente y se estudió su estabilidad a 25 °C.

Nomenclatura de las emulsiones

Los nombres de las soluciones poliméricas se han abreviado de la siguiente forma: A, alginato de sodio; C, caseinato de sodio; P, pectina. Cuando la solución de caseinato de sodio se preparó en una mezcla hidroalcohólica se indicó como Ce. Las abreviaturas de los principios activos son: CL, hidrocóloruro de clindamicina; MF, hidrocóloruro de metformina y ML, melatonina.

Las mezclas de soluciones poliméricas se nombraron en función de los polímeros constituyentes y su concentración en la formulación final (**Figura 43**). El primer polímero es el que constituye la fase interna y el segundo la fase externa de las emulsiones. Por ejemplo: la emulsión C1,25/A2,75 indica que, la solución de caseinato de sodio (C) constituye la fase interna y el caseinato de sodio está en una concentración de 1,25% p/p en la mezcla final, y la solución de alginato de sodio (A) constituye la fase externa y el alginato de sodio está a una concentración del 2,75% p/p en la mezcla final. Cuando las emulsiones contienen un principio activo como, por ejemplo, clorhidrato de CL, se indica la concentración final de la mezcla. La emulsión C1,25CL2/A2,75 indica que la concentración de CL en la mezcla final era del 2% p/p y se incorporó el principio activo en la solución de caseinato de sodio, en cambio, en la emulsión C1,25/A2,75CL2 el hidrocóloruro de CL se incorporó en la solución de alginato.

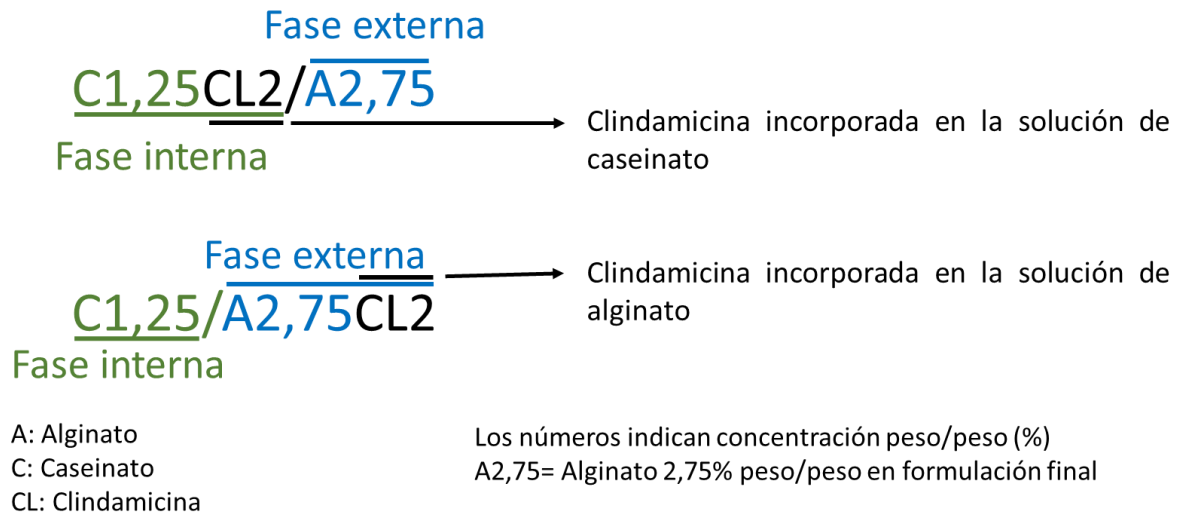


Figura 43. Ejemplo de nomenclatura de emulsiones.

Las mezclas que no formaron emulsión y las que poseen una estructura bicontinua, no se nombraron según la composición de las fases interna y externa sino según el orden de incorporación de las soluciones poliméricas.

3.3.3 Caracterización macroscópica y microscópica de las emulsiones

Se prepararon 6 g de mezclas de soluciones de polisacárido y proteína (alginato-caseinato y pectina-caseinato) en tubos de vidrio con tapón de rosca y se mantuvieron en un baño termostático a 25 °C. Después de 7 días, las mezclas se observaron macro y microscópicamente, para comprobar la formación de gotas de emulsión y para identificar las fases. De este modo se pudieron representar en diagramas pseudobinarios, las zonas de formación de emulsiones.

Para determinar el tipo de la emulsión se marcó el BSA y el caseinato con fluoresceína, con la finalidad de caracterizar las emulsiones mediante microscopía confocal de fluorescencia. Esto debido a que el grupo reactivo isotiocianato reacciona con los grupos amina y sulfhidrilo de las proteínas, formando un enlace covalente [Maeda y cols., 1969]. Para ello, se preparó una solución de isotiocianato de fluoresceína (FITC) al 2% p/v en

dimetilsulfóxido (DMSO), se mezcló al 0.1 % en peso con las soluciones concentradas de caseinato y BSA, se conservaron durante 2 h a 25 °C. Las mezclas de caseinato-FITC, BSA-FITC, y las emulsiones formadas con caseinato y BSA marcado con FITC, se protegieron de la luz, debido a que el marcador fluorescente es fotosensible.

3.3.4 Determinación de tamaño de gota de las emulsiones y estudio de estabilidad

Se determinó el tamaño de gota de las emulsiones mediante microscopía óptica y microscopía confocal de fluorescencia. Las muestras analizadas se tomaron de la zona media del recipiente, a los siete días de su preparación y después de una agitación moderada. Las imágenes de fluorescencia se analizaron mediante el software ImageJ y se reestructuraron tridimensionalmente.

Para los estudios de estabilidad y conteo de gotas, se prepararon emulsiones con y sin principio activo y se mantuvieron por un tiempo determinado a 25°C o 4°C, protegidas de la luz cuando contenían ML. Se efectuó un recuento de gotas de algunas emulsiones tomando 300 gotas y aplicando el software Adobe Photoshop® CS6. Los resultados se expresaron en porcentaje de gotas.

Todos los ensayos de determinación del tamaño y recuento de gotas se realizaron por triplicado.

3.3.5 Identificación de sólido por espectroscopía confocal RAMAN

Con la finalidad de determinar la composición del sólido presente en algunas mezclas, poliméricas se utilizó la técnica de espectroscopía confocal Raman, transcurridos 7 días desde la preparación de las muestras. Se tomaron las muestras sólidas presentes en el fondo del recipiente y se introdujeron en una estufa a 50° C durante 48 h. Posteriormente se analizaron las muestras sólidas mediante espectroscopía confocal, por triplicado.

3.3.6 Determinación de la viscosidad y propiedades reológicas

Para los estudios de comportamiento reológico se utilizó el reómetro Haake Rheostress 1, equipado con una configuración de geometría placa-placa, con una placa inferior fija y una placa superior móvil PP60 Ti, de 6 cm de diámetro. El espacio entre las placas se fijó en 1 mm.

En primer lugar, se estableció la zona lineal de viscosidad, es decir, el intervalo al cual el módulo elástico (G') y el módulo viscoso (G''), son independientes de la deformación aplicada a una frecuencia determinada. Para ello se efectuó un ensayo de deformación entre 0 y 200 Pa a una frecuencia constante de 1 Hz. Una vez obtenida la zona lineal, se estudiaron los módulos G' y G'' , los cuales se midieron en el rango de 0,01-20 Hz a una tensión constante de 5 Pa. Se registraron curvas de viscosidad y flujo durante 3 min durante el período de aceleración ($0 - 100 \text{ s}^{-1}$), 1 min a 100 s^{-1} y 3 min durante el período de desaceleración ($100-0 \text{ s}^{-1}$). Los ensayos oscilatorios y rotacionales se llevaron a cabo a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y por triplicado.

La determinación inicial tras la preparación de las muestras se realizaba a las 48 horas para evitar el error de las burbujas de aire generadas en la formación de la emulsión.

Todos estos estudios se realizaron cada semana tras la preparación de la emulsión hasta la separación de fases.

3.3.7 Estabilización de emulsiones W/W por métodos químicos

Como método químico de estabilización se ha utilizado la incorporación de glucono-delta-lactona (δ). Para ello se utilizaron concentraciones entre el 0,5 y el 2 %, este agente, el cuál fue utilizado para la gelificación de alginato y caseinato. En primer lugar, al momento de preparar cada solución concentrada se le incorporó glucono-delta-lactona, luego se le añadió PBS para obtener la concentración deseada, se mezcló mediante agitación magnética a 250 rpm a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, se ha seleccionado una concentración específica para luego

formar emulsión entre una solución concentrada de biopolímero con la incorporación de glucono-delta-lactona frente a otra solución sin la presencia del agente estabilizante.

3.3.8 Estabilización por métodos físicos

Estabilización por incorporación de partículas de mucina

Se prepararon emulsiones de fase externa alginato y, de fase externa caseinato a las que se incorporó mucina. Esta se incorporó al 0,1 y 1% en peso a las soluciones poliméricas que constituían la fase interna. La mucina es insoluble en agua por lo que se preparó una suspensión. Para ello se dispersaron las partículas de mucina en PBS y durante 30 minutos a 25 rpm. A continuación, se dispersó la mucina mediante una sonda de ultrasonido según el método descrito por Beldengrün, 2020, a ciclos de 5 s encendido sobre 5 s de apagado durante 60 s a una amplitud de 40% [Beldengrün y cols., 2020]. Seguidamente, la suspensión de partículas de mucina al 0,1 y 1 % se incorporó a la solución concentrada de alginato o de caseinato y se mantuvo en agitación hasta formar la emulsión.

Para la localización de la disposición de las partículas de mucina en las emulsiones se procedió a marcar la mucina fluorescentemente de color rojo (rodamina) y el caseinato de color verde (fluoresceína). Para ello, se prepararon las soluciones fluorescentes de isotiocianato de fluoresceína (FITC), que proporcionaba una imagen fluorescente de color verde y rodamina (RITC), de color rojo, al 2% p/v en DMSO. Se mezcló la solución de marcador fluorescente al 0.1 % en peso con las soluciones concentradas de caseinato y las suspensiones de mucina y se conservaron durante 2 h a 25 °C. Las soluciones de caseinato-FITC y se mezclaron con las suspensiones de mucina-RITC para luego incorporarse a las soluciones de alginato y así formar emulsiones. También se prepararon emulsiones con las mezclas de solución de alginato y la suspensión de mucina -RITC que se incorporaron a la solución de caseinato-FITC. Las formulaciones se protegieron de la luz, debido a que el marcador fluorescente es fotosensible. Tras 24 horas se observaron al microscopio óptico confocal de fluorescencia. A partir de las micrografías confocales obtenidas, se realizó una reconstrucción

3D mediante procesamiento de imágenes con el software ImageJ. Posteriormente se hicieron estudios reológicos y cesión de hidrocloreuro de CL.

Estabilización por incorporación de nanopartículas de PLGA

En primer lugar, se han preparado nano-emulsiones siguiendo un método desarrollado por nuestro grupo de investigación y descrito en la literatura utilizando el método Phase Inversion Composition (PIC) [Calderó y cols., 2011] a 25 °C. Para la preparación de la nano-emulsión, se selecciona PBS como fase acuosa, acetato de etilo como fase orgánica y como tensioactivo el Tween 80. En un tubo de ensayo se pesa la fase orgánica y tensioactivo, que posteriormente se deja en agitación mediante vórtex a 3.200 rpm. Utilizado un soporte de tubos en agitación, se le añade gota a gota el PBS mediante el uso de la bomba peristáltica a 10 rpm, como se muestra en la **Figura 44**. Este proceso de manera semi automática permite obtener una mayor reproducibilidad al momento de formar las nano-emulsiones. La nano-emulsión final consistió en un 7% en peso de mezcla orgánica, un 3% en peso de TWEEN® 80 y un 90% en peso de PBS.



Figura 44. Sistema de formación de nano-emulsión semi-automatizado. Consta de una bomba dosificadora que mueve la fase acuosa a un flujo fijo hacia el tubo en agitación en un vórtex, donde cae gota a gota, manteniendo una alta reproducibilidad.

Una vez formadas las nano-emulsiones se procedió a la formación de nanopartículas. Para ello se utilizó el método de evaporación del solvente de las nano-emulsiones a presión reducida mediante un rotavapor. Para ello se evaporó el acetato de etilo de la nano-emulsión mediante la reducción al vacío de 200 a 43 mbar lentamente durante 15 min y luego 45 min a 43 mbar, con una velocidad de rotación de 100 rpm. El baño de agua se fijó a 25 °C y el líquido refrigerante a $-5 \pm 0,5$ °C, se ajustó el volumen de la nano-dispersión añadiendo agua MilliQ de acuerdo con el disolvente evaporado.

Las dispersiones de nanopartículas se concentraron utilizando las unidades de filtrado centrífugo Centriprep® YM-3, 3 kDa (Merck). El protocolo utilizado fue: 75 min, a 25 °C con una fuerza centrífuga relativa de $2.300 \times g$ [ch y cols., 2015].

Para los estudios de caracterización, la fase oleosa se le incorporó rodamina B (Rho). La solución orgánica de Rho se preparó con 4% en peso de PLGA, 0,01% en peso de Rho y disolvente orgánico (mezcla de etanol/acetato de etilo 20/80 v/v).

Las mediciones del diámetro hidrodinámico, el índice de polidispersidad (Pdl) y el potencial zeta (ζ) de nano-emulsiones y dispersiones de nanopartículas se realizaron utilizando el Zetasizer. El tamaño y Pdl se determinaron mediante dispersión dinámica de luz (DLS), y ζ se valoró mediante mediciones de movilidad electroforética. Para la evaluación ζ , las muestras se diluyeron 1:10 con agua MilliQ. Todos los ensayos se realizaron a 25 °C. Se realizaron mediciones por triplicado en cada muestra.

Una vez obtenidas las nanopartículas cargadas con Rho o vacías, se procedió a incorporarlas a las emulsiones. Sin embargo, antes las nanopartículas fueron concentradas 3 veces mediante el uso de las unidades de filtrado Centriprep® YM-3, 3 kDa. El protocolo utilizado fue la centrifugación durante 75 minutos a 25°C a $2300 \times g$ [Fornaguera y cols., 2015]. Una vez concentradas las nanopartículas, se añadieron a las soluciones concentradas de alginato o caseinato a una concentración específica (detallada en el apartado de resultados) y se procedió a formar emulsiones tal y como se indica en el apartado 3.3.1.

Se utilizó un microscopio confocal de fluorescencia para observar emulsiones W/W que contenían NP (cargadas con rodamina). El caseinato fue marcado con FITC. A partir de las

micrografías confocales obtenidas, se realizó una reconstrucción 3D mediante procesamiento de imágenes con el software ImageJ.

3.3.9 Estudios de liberación a partir de las formulaciones

Se estudio la liberación de los principios activos (hidrocloruro de CL, hidrocloruro de MF o ML) a partir de las formulaciones desarrolladas. Los estudios se llevaron a cabo a 37 °C durante 24 horas en el equipo de disolución.

Se realizaron cuatro réplicas de cada formulación preparada 24 horas antes del ensayo. Las muestras se depositaron en celdas de inmersión de 15 mm de diámetro, aproximadamente 0,5 g (**Figura 45**) y se separaron de la solución receptora mediante una membrana de diálisis. Posteriormente, las celdas se introdujeron en 150 mL de PBS pH 7,4 a 37 °C bajo agitación constante a 25 rpm mediante palas recubiertas de politetrafluoroetileno (PTFE).

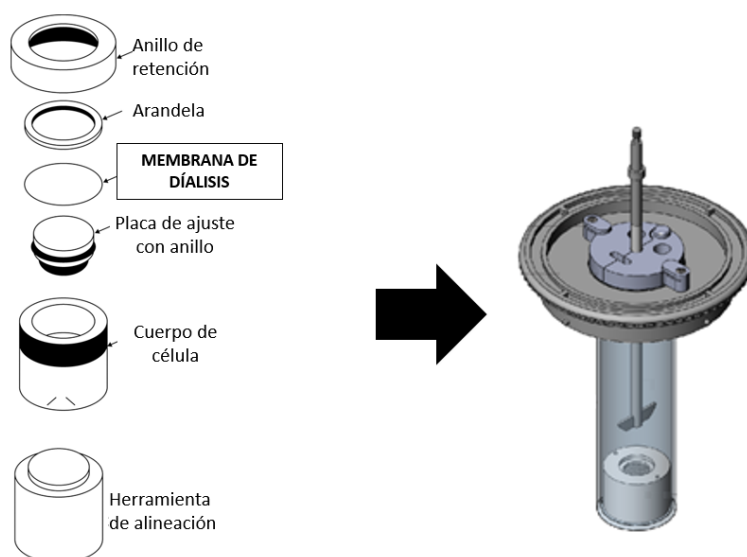


Figura 45. Dispositivo del equipo de disolución Vision Elite con celda de inmersión (Hanson, Inc). Está formada por un anillo de retención que permite contener la muestra dentro del cuerpo de la celda, sobre la membrana de diálisis; todo es ajustado con la herramienta de alineación.

Se extrajeron muestras de solución receptora de 1 mL de manera automática a 17 tiempos previamente determinados (0, 5, 15, 30, 45 minutos y 1, 1:30, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 22 y 24 horas) mediante los equipos Autoplus Maximizer™ y Autoplus MultiFill™, ambos de Hanson Research. Durante los ensayos, se mantuvieron las condiciones sink y después de cada extracción se adicionó de manera automatizada el mismo volumen extraído de PBS.

3.3.10 Cuantificación de principios activos por HPLC

La cuantificación de principios activos en las muestras de los ensayos de liberación se realizó mediante HPLC. Las condiciones experimentales para cada principio activo se resumen en la **Tabla 1**. Las columnas están descritas en el apartado 3.2.3.

Tabla 1. Condiciones experimentales para la cuantificación de los principios activos.

Condiciones cromatográficas/ principio activo	Clindamicina hidrocloruro	Metformina hidrocloruro	Melatonina
Volumen de inyección (μl)	20	20	20
Longitud de onda (nm)	195	233	229
Flujo (ml/min)	0,8	0,8	0,8
Fase acuosa (FA)	Solución Na ₂ HPO ₄	Solución Fosfatos	Agua MilliQ
Fase orgánica (FO)	Acetonitrilo	Acetonitrilo	Acetonitrilo
Relación FA:FO	70:30	35:65	45:55
Elución	Isocrática	Isocrática	Isocrática
Tiempo retención (min)	1,2	0,95	0,98
Referencia	Pashaei y cols., 2019	Chhetri y cols., 2014	Hafner y cols., 2009

*Solución de fosfato 0,1 M pH 5,8: (Na₂HPO₄ · 2 H₂O) (Na₂HPO₄ · H₂O)

Para cada uno de los principios activos se preparó una curva de calibración en PBS, realizándose diluciones seriadas desde una solución de 1 g/L. A partir de la disolución madre se prepararon los siguientes puntos, 10, 25, 50, 100, 200, 500 ppm, por triplicado.

3.3.11 Estudios de citotoxicidad

La viabilidad celular en presencia de las emulsiones W/W seleccionadas se evaluó con un ensayo colorimétrico MTT [Putnam y cols., 2001]. Este ensayo colorimétrico determina la viabilidad celular por la actividad mitocondrial. Si la formulación no es tóxica y las células son viables, a partir del reactivo MTT se forman cristales de formazan por acción de la actividad mitocondrial (**Figura 46**), que disueltos en DMSO presentan una elevada absorbancia a 570 nm. En cambio, si hay muerte celular los cristales de formazan no se forman, ya que cesa la actividad mitocondrial y la absorbancia es menor o cercana a cero.

Para cada ensayo, se sembraron baja campana de flujo laminar células HeLa (aproximadamente 2×10^3 células por pocillo) en una placa de 96 pocillos en 200 μ L de DMEM. Las células se incubaron durante 24 h, a 37 ° C bajo una atmósfera de CO₂ al 5%. El medio de cultivo se reemplazó con muestras a las concentraciones requeridas. El reactivo MTT se agregó a una concentración final de 0,5 mg/mL (25 μ L) en PBS y se incubó 2 h a 37 °C. Posteriormente, se retiró el medio y se agregaron 200 μ l de DMSO para disolver los cristales de formazan. La placa se agitó durante 15 min a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a $\lambda=570$ nm con el espectrofotómetro de microplacas.

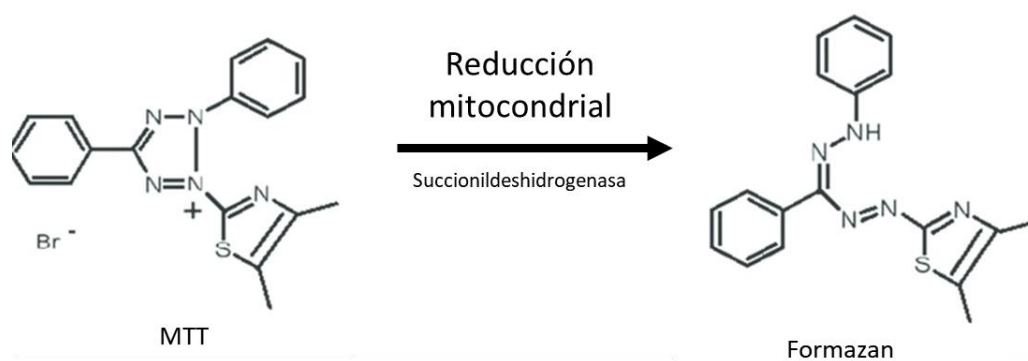


Figura 46. Reducción mitocondrial de MTT a formazan.

3.3.12 Análisis de datos

A partir de las concentraciones de fármaco en las muestras de disolución, se calcularon los porcentajes disueltos acumulados a cada tiempo. Posteriormente, se ajustaron a distintos modelos de disolución a los datos, para caracterizar cada una de las formulaciones en cuanto a la velocidad de cesión, así como para dilucidar el o los mecanismos implicados.

Los modelos que se ajustaron, de acuerdo con los perfiles observados y el tipo de formulaciones fueron: Orden 1 (**ecuación 3**), Weibull (**ecuación 4**), Higuchi (**ecuación 5**) y Korsmeyer-Peppas (**ecuación 6**). En el caso de los modelos de Higuchi y Korsmeyer-Peppas se utilizaron los datos hasta el 60% del fármaco disuelto [Costa & Lobo, 2001].

$$F = 100 \cdot (1 - e^{-k_1 \cdot t}) \text{ (Ecuación 3)}$$

$$F = 100 \cdot \left(1 - e^{-\frac{t^\beta}{\alpha}}\right) \text{ (Ecuación 4)}$$

$$F = k_H \cdot t^{0.5} \text{ (Ecuación 5)}$$

$$F = k_{KP} \cdot t^n \text{ (Ecuación 6)}$$

donde F es el porcentaje de fármaco disuelto/liberado, k_1 es la constante de disolución de orden 1, β es un parámetro de forma, α es un parámetro de escala de tiempo, k_h es la constante de Higuchi, K_{KP} es la constante de liberación de Korsmeyer-Peppas y n es el exponente disfuncional que informa acerca del mecanismo implicado en la liberación.

$$\alpha^{1/\beta} = t_d \text{ (Ecuación 9)}$$

Donde t_d representa el tiempo de disolución de Weibull.

Los criterios de selección del modelo que mejor ajustó a los datos de disolución fueron el coeficiente de correlación entre los valores observados y predichos ($R_{\text{obs-pred}}$) y el menor valor de AIC (Criterio de información de Akaike) [Akaike, 1974], de acuerdo con la **ecuación 10**.

$$AIC = n * Ln SQR + 2p \text{ (Ecuación 10)}$$

donde, n es el número de datos experimentales, p el número de parámetros del modelo, y SQR, la suma de los cuadrados de los residuales (**ecuación 11**).

$$SQR = \sum_{i=1}^n (y_{i-obs} - y_{i-pred})^2 \text{ (Ecuación 11)}$$

siendo n el número de observaciones e y_{i-obs} e y_{i-pred} los porcentajes de fármaco liberado a cada tiempo observados y predichos, respectivamente.

Se utilizó el complemento de Excel Ddsolver [Zhang y cols., 2010] para dichos ajustes.

En relación a los resultados de toxicidad fueron analizados mediante una prueba de test no paramétrico, debido a que las muestras no distribuían de manera normal, y un post-hoc de Mann-Whitney para muestras pequeñas. Para estos estudios se trabajó con n = 3-4. Y se consideró una diferencia significativa con un valor de $p \leq 0,05$ (Prism 8.0; GraphPad Software).

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudios preliminares

Para la formación de las emulsiones W/W se han seleccionado diferentes mezclas de proteínas y polisacáridos. El criterio de selección de las macromoléculas se ha basado en la biocompatibilidad y en su utilización en formas farmacéuticas. La búsqueda de proteínas y polisacáridos se basó en los estudios de Grinberg y Tolstoguzov, 1997 [Grinberg & Tolstoguzov, 1997]. Estos investigadores describieron las condiciones necesarias para la incompatibilidad termodinámica de diversos sistemas de proteína-polisacárido en solución acuosa. También se han considerado resultados previos obtenidos en el grupo de investigación [Beldengrün y cols., 2018] [Beldengrün y cols., 2020].

Mezclas poliméricas binarias

Las proteínas y polisacáridos seleccionados se muestran en la **Tabla 2**:

Tabla 2. Polisacáridos y proteínas utilizados para la formación de emulsión, con su pKa y punto isoeléctrico (pI), respectivamente.

Polisacáridos	pKa	Referencia
Alginato	3,4-4,4	Shinde & Nagarsenker, 2009
Pectina	3,5	Opanasopit y cols., 2008
Proteínas	pI	Referencias
Albúmina de suero de bovino (BSA)	4,7	Ge y cols., 1998
Caseína/caseinato	4,6	Fox & Mulvihill, 1990

La selección de las diferentes macromoléculas se basó en lo siguiente:

Polisacáridos:

- El **alginato de sodio** tiene un pKa entre 3,4 y 4,4 [Shinde & Nagarsenker, 2009], y a pH neutro sus grupos ionizables estarán preferentemente en forma aniónica. La repulsión electrostática entre dos biopolímeros en solución acuosa favorece la separación de dos fases acuosas y permite la formación de emulsiones W/W. La selección de proteínas con un punto isoeléctrico alrededor de 4 puede dar lugar a este tipo de emulsiones cuando se mezclan soluciones de alginato y proteína, tal como se ha descrito en la bibliografía [Antonov & Moldenaers, 2004]. Además, el alginato tiene varias propiedades que lo hacen un buen candidato para la formación de emulsiones biocompatibles y de uso farmacéutico. Puede formar geles y se utiliza como excipiente en preparaciones farmacéuticas [Sheskey, y cols., 2020].
- La **pectina** tiene un pKa de 3,5 [Opanasopit y cols., 2008]. Del mismo modo que el alginato de sodio, puede formar emulsiones W/W cuando se mezclan soluciones acuosas de pectina con soluciones de proteína al pH adecuado [Rediguieri, 2007]. Se utiliza en numerosas formulaciones farmacéuticas como gelificante y regulador de la viscosidad [Sheskey y cols., 2020].

Proteínas:

- La **proteína albúmina de suero de bovino** (BSA) tiene un punto isoeléctrico de 4,7. A pH neutro predominarán las cargas negativas, lo que permitirá formar emulsiones con soluciones acuosas de polisacáridos que se encuentren en forma aniónica a este pH. EL BSA es una proteína biocompatible y se ha investigado su uso para estabilizar y reducir la agregación de proteínas y como nanotransportador de fármacos [Sheskey y cols., 2020].

- La **caseína** y **caseinato** con un punto isoeléctrico de 4,6 [Fox & Mulvihill, 1990]. Las soluciones de esta proteína pueden formar emulsiones W/W cuando se mezclan con soluciones de polisacáridos a pH neutro, tal como se encuentra descrito en la bibliografía [Capron y cols., 2001]. Presentan interesantes propiedades fisicoquímicas para la liberación controlada de fármacos (Elzoghby, 2011).

En los estudios preliminares se mezclaron volúmenes iguales de solución de polisacárido y de solución de proteína, y volúmenes extremos de cada una de las fases. El método de incorporación utilizado fue la adición de la fase de mayor volumen sobre la de menor volumen. Una vez realizada la mezcla se observó su aspecto macroscópico mediante microscopía óptica y se comprobó la formación de gotas características de las emulsiones.

4.1.1 Alginato de sodio-albúmina sérica bovina (BSA)

El estudio del sistema alginato-BSA se basó en investigaciones previas de [Antonov, Grinberg, & Tolstoguzov, 1976], donde las soluciones poliméricas fueron preparadas en un medio de NaOH 0,1 M. Estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación demostraron la formación de emulsiones W/W en este sistema [Murat, 2016]. Tal como se indica en el apartado de Métodos (3.3.1) las mezclas de las soluciones de alginato de sodio y BSA se prepararon con el homogeneizador ultraturrax y a temperatura ambiente.

Se seleccionaron tres formulaciones que se describen en la

Tabla 3. La selección se ha realizado en base al diagrama de fases de los estudios previos de Murat, 2016, con la finalidad de obtener tres tipos de estructuras (emulsión de alginato en BSA, BSA en alginato y una emulsión bicontinua). Estas formulaciones se prepararon a partir de soluciones concentradas de alginato al 2% y de BSA al 10% en peso, como se presenta en el trabajo mencionado.

Tabla 3. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y suero albúmina de bovino (BSA).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A), añadido *	Peso de solución de BSA (B) añadido **	Orden de adición de los componentes
A0,3/B8,3	BSA	1 g	5 g	B sobre A
A1/B5	Bicontinua	3 g	3 g	B sobre A
B1,7/A1,7	A	5 g	1 g	A sobre B

* Solución concentrada de alginato 2%

** Solución concentrada de BSA 10%

El pKa del alginato de sodio es entre 3,4 y 4,4 [Shinde & Nagarsenker, 2009] y el punto isoeléctrico del BSA es 4,7 [Ge y cols., 1998]. Esto permite considerar que a un pH notablemente superior a 4,7 ambos polímeros se encuentran preferentemente en forma aniónica. Las soluciones concentradas de alginato y BSA se prepararon con una solución de NaOH 0,1M a pH 13, a la que se le añadieron distintas cantidades de NaCl. En la Figura 54 se muestra el aspecto microscópico de las formulaciones obtenidas (**Figura 47**).

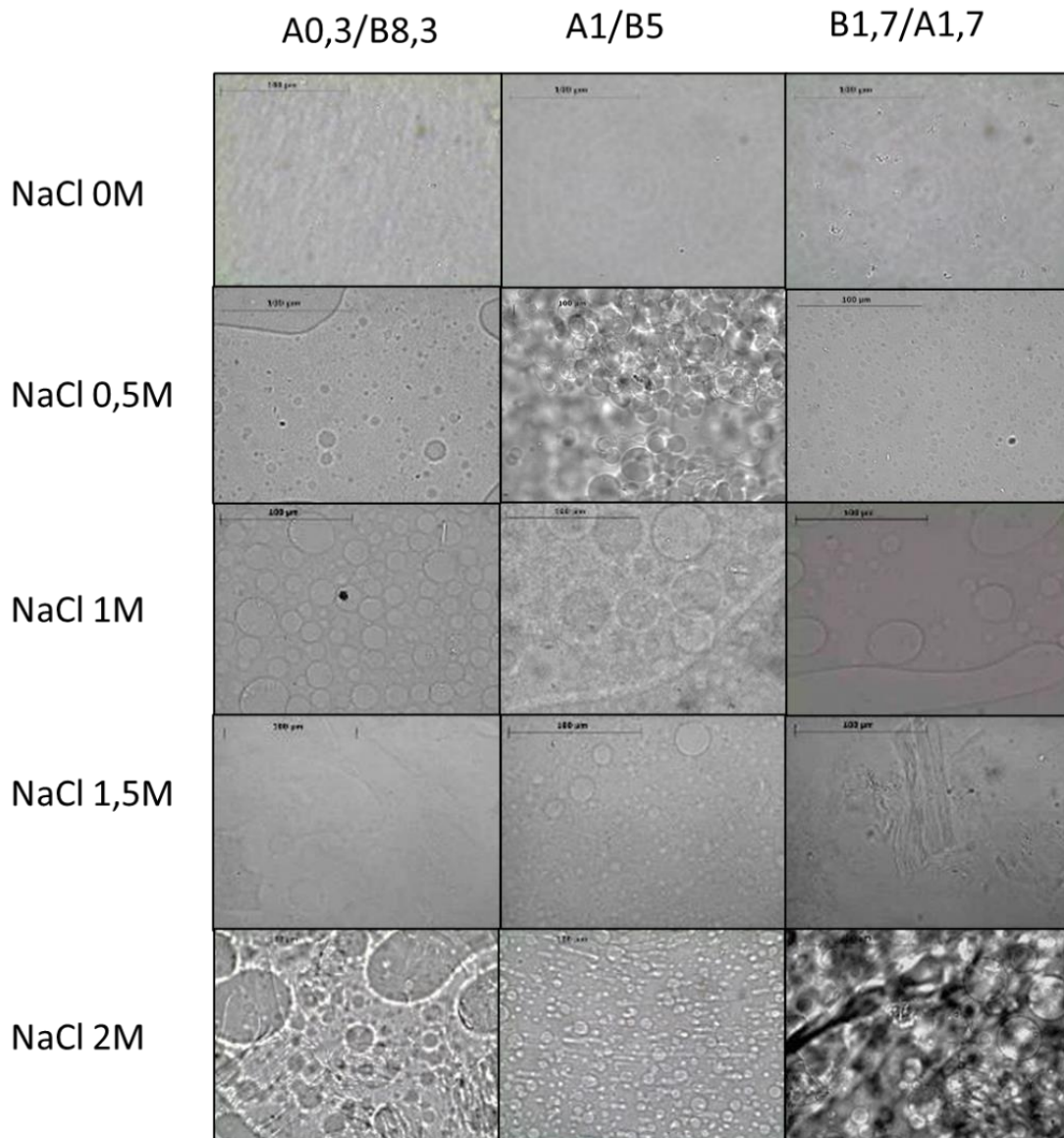


Figura 47. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/BSA a 25 °C, preparadas con una solución de NaOH 0,1M a pH 13, y a diferentes concentraciones molares de NaCl.

En ausencia de NaCl en la mezcla, se observó la formación de emulsiones muy diluidas, con un escaso número de gotas. La incorporación de NaCl produjo un incremento del número de gotas, hasta una concentración del 1,5% de NaCl. A partir de esta concentración, las gotas aparecían deformadas, especialmente en las formulaciones A0,3/B8,3 y B1,7/A1,7.

En base a los resultados anteriores, se seleccionó la concentración 1M de NaCl porque se observó la formación de un número elevado de gotas, especialmente en la emulsión A0,3/B8,3. Luego, se procedió a marcar fluorescentemente el BSA con fluoresceína (color verde) para caracterizar la estructura de las emulsiones. Para esto en la solución de BSA se agregó fluoresceína y se dejó incubar, para posteriormente mezclar la solución con alginato sin marcar y formar emulsión. Este marcaje permite identificar la naturaleza de las fases de la emulsión.

Los resultados muestran que según el volumen de las fases se forman diferentes estructuras, es decir: en la formulación A0,3/B8,3 (**Figura 48A**) se añadió 1 g de solución de alginato al 2% en 5 g de solución de BSA al 10% y la imagen muestra gotas de alginato (color oscuro) en medio de caseinato (color verde de la fase externa). La formulación A1B5 (**Figura 48B**), tiene una relación 1:1 de las soluciones de alginato y de BSA y se observa una aparente bicontinuidad donde gotas de alginato (color oscuro) coexisten con gotas de BSA (color verde). En cambio, la emulsión B1,7/A1,7, formada por 5 g de solución de alginato sobre 1 g de solución de caseinato (**Figura 48C**) presentaba gotas de BSA (color verde) en alginato (color oscuro). Las gotas tenían un diámetro entre 35 a 5 μm .

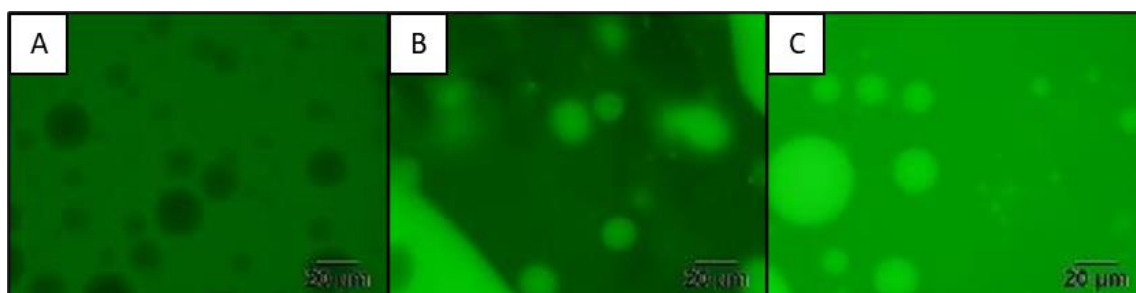


Figura 48. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/BSA a 25 °C, preparadas con una solución de NaOH 0,1M NaCl 1M a pH 13. (A) A0,3/B8,3; (B) A1/B5; (C) B1,7/A1,7. FITC-BSA.

Con la finalidad de obtener emulsiones W/W en condiciones más cercanas a las fisiológicas a un pH cercano a la neutralidad, se intentó formar emulsiones a pH 7,4, mediante una solución amortiguadora de fosfato salino (PBS), en la que se prepararon las soluciones poliméricas concentradas.

La caracterización microscópica de las formulaciones resultantes no permitió observar la formación de gotas de emulsión para las mismas formulaciones estudiadas anteriormente, probablemente debido a una variación en la fuerza iónica al utilizar la solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) que contiene 0,1 M de NaCl, en lugar de la solución de NaOH 0,1M con NaCl 1M.

En base a estos resultados, este sistema fue descartado, ya que se consideró más oportuno preparar emulsiones a pH neutro, sin una excesiva concentración de NaCl. Sin embargo, estos resultados previos nos indican que la fuerza iónica y un pH adecuado son imprescindibles para la formación de la emulsión W/W y que el volumen de fases es determinante para la estructura de las emulsiones.

4.1.2 Alginato de sodio-Caseína

Se seleccionó el sistema alginato de sodio-caseína según los estudios descritos en la bibliografía [Antonov & Grinberg, 1975], en los que se describía la formación de emulsiones W/W a pH neutro. Se prepararon las soluciones de alginato de sodio y de caseína con PBS a pH 7,4 para luego formar emulsiones (**Tabla 4**), que se analizaron macro y microscópicamente a las 24 h de preparación. Se partió de soluciones concentradas de alginato al 2% y de caseinato al 10% y variando los pesos de cada solución en las mezclas, se obtuvieron formulaciones con distintas concentraciones de ambos polímeros. En las formulaciones que contenían caseína o caseinato de sodio se adicionó un 0,04% de azida de sodio, que es un conservante antimicrobiano que evita la rápida contaminación de la proteína. Este conservante aparece en numerosas publicaciones donde se estudia el comportamiento físico o la reología de formulaciones con caseína, para evitar el crecimiento de microorganismos [Maestro y cols., 2020]. Aunque es un producto tóxico, se utiliza a muy baja concentración, por lo que no interfiere en las propiedades de las emulsiones y en un futuro se estudiará su sustitución por otro conservante adecuado para uso farmacéutico.

Tabla 4. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseína (C) y alginato (A).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A) añadido *	Peso de solución de caseína (C) añadido **	Orden de adición de los componentes
C5/A1	Bicontinua	3 g	3 g	A sobre C
C4/A1,2	A	3,6 g	2,4 g	A sobre C
C3/A1,4	A	4,2 g	1,8 g	A sobre C
C2/A1,6	A	4,8 g	1,2 g	A sobre C
C1/A1,8	A	5,4 g	0,6 g	A sobre C

* Solución concentrada de alginato 2%

** Solución concentrada de caseína 10%

Las observaciones macroscópicas de las formulaciones C5/A1 y C4/A1,2 mostraron separación de fases inmediatamente después de su preparación, en cambio, las emulsiones restantes (C3/A1,4, C2/A1,6 y C1/A1,8) no presentaron separación de fases a las 24 horas de preparación (**Figura 49**). Si bien, en este sistema no se estudió el comportamiento fásico, las emulsiones que presentaron separación de fases contenían una baja concentración de alginato. En cambio, a mayor concentración de alginato las emulsiones presentaron una mayor estabilidad.

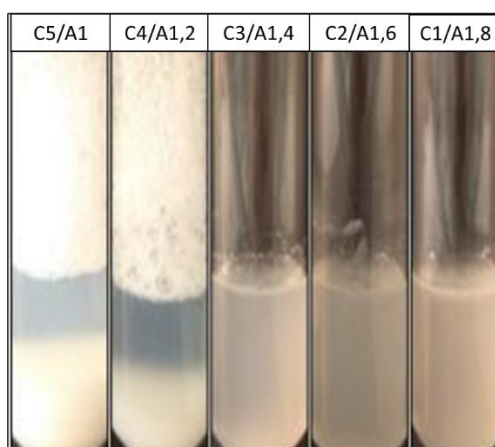


Figura 49. Emulsiones después de 24h de su preparación a 25 °C en PBS a pH 7,4.

En los estudios realizados con microscopía óptica se observó la presencia de gotas en las formulaciones que no presentaban separación de fases (**Figura 50**). La disminución aparente del tamaño de las gotas (desde 40 a 5 μm), se puede deber a que existe una diferencia de viscosidad, observada por la menor fluidez de la mezcla, entre la solución

concentrada de alginato al 2% y la solución concentrada de caseína al 10%. Al tener una mayor viscosidad la solución de alginato, las gotas podrían estar sometidas a un cizallamiento mayor durante la emulsificación.

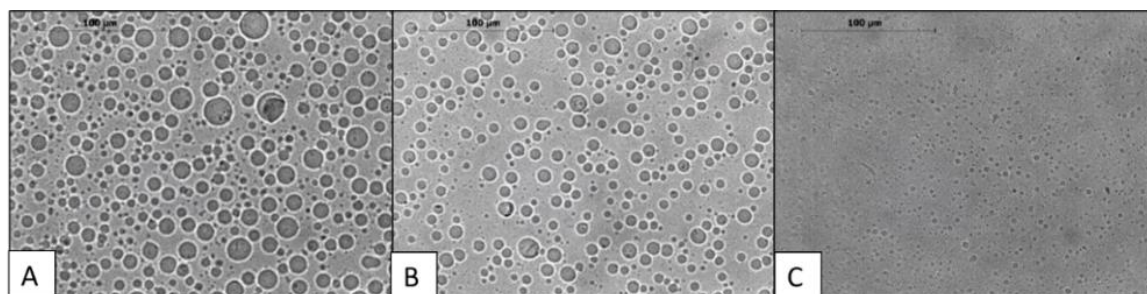


Figura 50. Microfotografías (40x) del sistema alginato/caseína a 25 °C, preparadas en PBS. (A) C3/A1,4; (B) C2/A1,6; (C) C1/A1,8.

4.1.3 Alginato de sodio-Caseinato de sodio

Debido a las consideraciones anteriores y basándose en estudios descritos en la bibliografía [Capron y cols., 2001][Antonov & Moldenaers, 2011][Maestro y cols., 2020], donde se han formado emulsiones mezclando soluciones concentradas de alginato de sodio al 3% con soluciones concentradas de caseinato de sodio al 15%, se ha pretendido utilizarlas como forma de aumentar viscosidad e intentar también mejorar la estabilidad. Para este estudio se ha utilizado PBS a pH 7,4 para la preparación de las soluciones concentradas.

Se han preparado las formulaciones que se muestran en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y caseinato (C).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A) añadido *	Peso de solución de caseinato (C) añadido **	Orden de adición de los componentes
A0,5/C12,5	C	1 g	5 g	C sobre A
A1/C6	Bicontinua	3 g	3 g	A sobre C
C2,5/A2,5	A	5 g	1 g	A sobre C

* Solución concentrada de alginato 3%

** Solución concentrada de caseinato 15%

El caseinato de sodio se marcó con fluoresceína y, tal como se observa en la **Figura 51**, se han podido identificar tres tipos de estructuras según la proporción de las soluciones poliméricas en las emulsiones. En la formulación A0,5/C12,5 (**Figura 51A**), la fase externa está constituida por caseinato de sodio (color verde) ya que la proporción de la solución concentrada de caseinato es muy superior a la de la solución concentrada de alginato; en cambio, en la emulsión C2,5/A2,5 ocurre lo contrario (**Figura 51C**). Cuando las soluciones poliméricas se encuentran en igual proporción se forman emulsiones bicontinuas (**Figura 51B**).

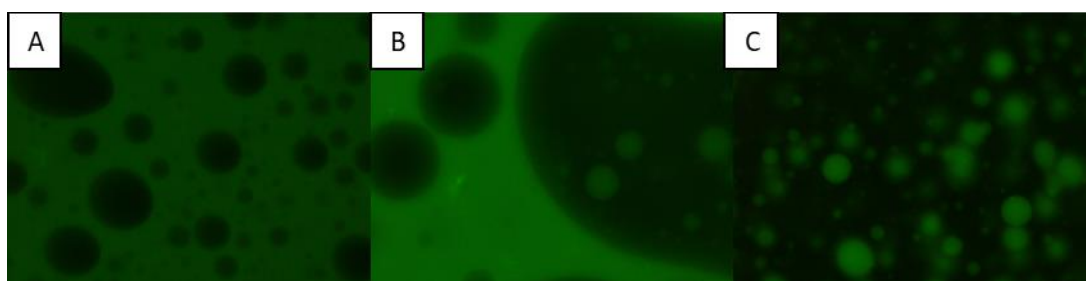


Figura 51. Microfotografías (40x) del sistema alginato/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS. (A) A0,5/C12,5; (B), A1/C6; (C), C2,5/A2,5. FITC-caseinato.

En base a estos resultados, se ha seleccionado el sistema solución de PBS pH 7,4/alginato de sodio/caseinato de sodio a 25°C para realizar estudios de incorporación de principios activos.

Con la finalidad de incorporar un principio activo poco soluble en agua en las emulsiones W/W formadas en el sistema alginato de sodio/caseinato de sodio, se consideró la posibilidad de incorporar un pequeño porcentaje de etanol a dichas emulsiones. De efectuaron unos estudios preliminares de formación de emulsiones incorporando etanol, que se detallan a continuación.

El caseinato es soluble en una relación PBS:etanol 70:30 [Mezdour y cols., 2006] [Mezdour y cols., 2008], por ello se preparó una solución concentrada de caseinato con

PBS:etOH en relación 70:30 mientras que la solución concentrada de alginato se preparó en PBS.

Se prepararon las mismas emulsiones que en el sistema alginato-caseinato descritas en la **Tabla 5**, pero incorporando etanol. Se marcó fluorescentemente el caseinato y la composición, estructura y método de preparación se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y caseinato con etanol (Ce).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de alginato (A) añadido *	Peso de caseinato-etOH (Ce) añadido **	Orden de adición de los componentes	Concentración final de etOH
A0,5/Ce12,5	C	1 g	5 g	C sobre A	18,75%
A1/Ce6	Bicontinua	3 g	3 g	A sobre C	11,25%
Ce2,5/A2,5	A	5 g	1 g	A sobre C	3,75%

* Solución concentrada de alginato 3%

** Solución concentrada de caseinato 15%

Los resultados mostraron que el etanol no fue un impedimento para la formación de las emulsiones, tal como se observa en la **Figura 52**. Igual como en las emulsiones sin etanol se observan tres tipos de emulsiones: alginato en caseinato, emulsión A0,5/Ce12, (**Figura 52A**), caseinato en alginato Ce2,5/A2,5 (**Figura 52C**), y estructuras bicontinuas A1/Ce6 (**Figura 52B**).

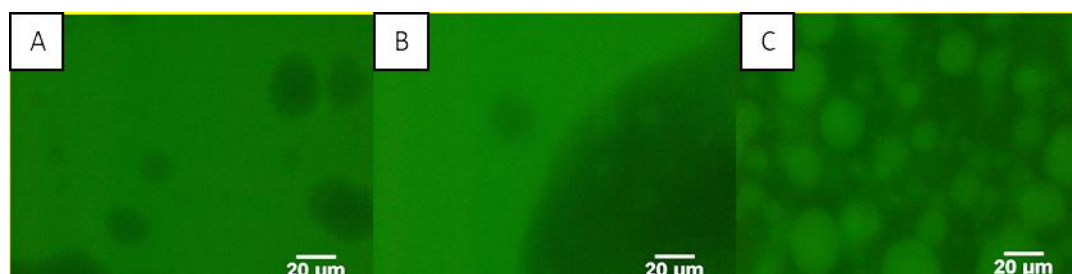


Figura 52. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS:etanol 70:30. (A) A0,5/Ce12,5; (B) A1/Ce6; (C) Ce2,5/A2,5.

4.1.4 Pectina-Caseinato de sodio

Se estudió la formación de emulsión con las mezclas de soluciones poliméricas de pectina y caseinato de sodio a pH 7,4. El comportamiento fásico de mezclas de soluciones de pectina y de caseinato de sodio en un amplio rango de pH se encuentra descrito en la bibliografía [Redigueri y cols., 2007].

Se han preparado las formulaciones que se indican en la **Tabla 7**, partiendo de una solución concentrada de pectina al 3% en peso y una solución concentrada de alginato de sodio al 15% en peso.

Tabla 7. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato (C) y pectina (P).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de pectina (P) añadido **	Peso de solución de caseinato (C) añadido *	Orden de adición de los componentes
C1,25/P2,75	P	5,5 g	0,5 g	P sobre C
C7,5/P3	Bicontinua	3 g	3 g	C sobre P
P0,25/C13,75	C	1 g	5 g	C sobre P

* Solución concentrada de pectina 3%

** Solución concentrada de caseinato 15%

Se observa en la **Figura 53** que predominan los tres tipos de estructuras mencionados anteriormente. Es decir, emulsión C1,25/P2,75 de caseinato en pectina (**Figura 53A**), P0,25/C13,75 de pectina en caseinato (**Figura 53C**) y una estructura bicontinua para C7,5/P3 (**Figura 53B**).

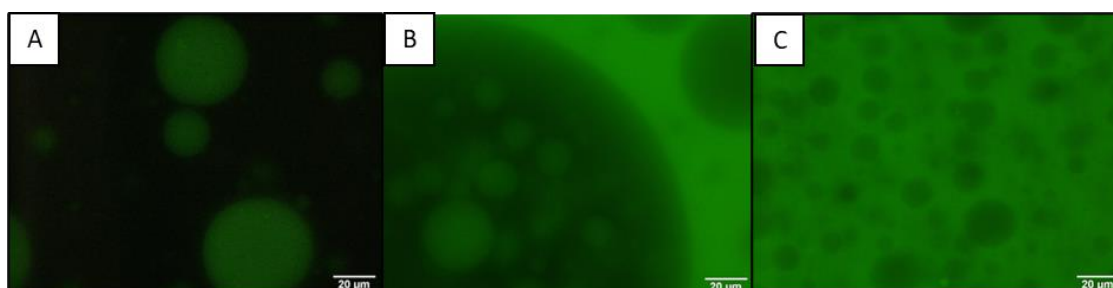


Figura 53. Microfotografías (40x) del sistema pectina/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS. (A) C1,25/P2,75; (B), C7,5/P3; (C), P0,25/C13,75. FITC-caseinato.

Emulsiones W/W del sistema pectina-caseinato de sodio fueron seleccionadas para la incorporación de dos principios activos hidrófilos, hidrocloreuro de CL y MF, y para estudiar la cesión de estos fármacos a partir de estas emulsiones.

4.2 Sistema Alginato de sodio-Caseinato de sodio

A partir de los estudios preliminares de formación de emulsiones se seleccionaron los sistemas constituidos por solución de PBS pH7,4/alginato de sodio/caseinato de sodio para estudiar de una manera más sistemática la formación y la estabilización de las emulsiones W/W, así como la incorporación y la liberación de principios activos de interés farmacéutico.

4.2.1 Diagrama pseudobinario

Para estudiar el comportamiento físico del sistema solución de PBS 7,4/alginato de sodio/caseinato de sodio, se prepararon mezclas de soluciones poliméricas en PBS a pH 7,4 y a diferentes concentraciones de polímero y se observaron las fases que se formaban a 25°C. Se observó la formación de gotas de emulsión mediante microscopía óptica. Se prepararon soluciones de alginato de sodio entre el 0,1 y el 3% en peso y soluciones de caseinato de sodio entre el 0,1% y el 15% en peso, en base a otros estudios descritos en la bibliografía [Capron y cols., 2001] [Antonov y cols., 2011] [Maestroy cols., 2020]. Capron y cols. estudiaron el mismo sistema a pH 7 y a 20°C, ajustando el pH con una solución de NaOH 0,1M, Antonov y cols. a pH 7 y a 23 °C, ajustando el pH con una solución reguladora de fosfatos, mientras que Maestro y cols., lo estudiaron a pH 8 y a 25 °C, también ajustando el pH con NaOH.

En el diagrama de fases realizado con la solución de PBS a pH 7,4 se representa, en abscisas, el porcentaje en peso de alginato de sodio en las soluciones concentradas y, en ordenadas, el porcentaje en peso de caseinato de sodio en las soluciones concentradas de este polímero (**Figura 54**). Las observaciones se realizaron 48 horas después de la preparación de las mezclas, conservadas a 25°C. Se pueden identificar dos regiones, una región I monofásica líquida, a bajas concentraciones de los polímeros, y una región II con dos fases líquidas. Ambas regiones están separadas por la denominada línea binodal. Estos resultados se aproximan a los descritos en la bibliografía para el mismo sistema a diferentes pH.

Se marcó el caseinato de sodio con isotiocianato de fluoresceína, para identificar las estructuras formadas al mezclar las dos fases líquidas. En la **Figura 54** se muestran a título de

ejemplo tres micrografías de emulsiones formadas al mezclar las soluciones poliméricas: la emulsión C2,5/A2,5, constituida por gotas de alginato en caseinato (**Figura 54A**), la emulsión A0,5/C10,5 formada por gotas de caseinato en alginato (**Figura 54C**) y la emulsión A1/C6 con estructura bicontinua, donde coexisten gotas de alginato y gotas de caseinato.

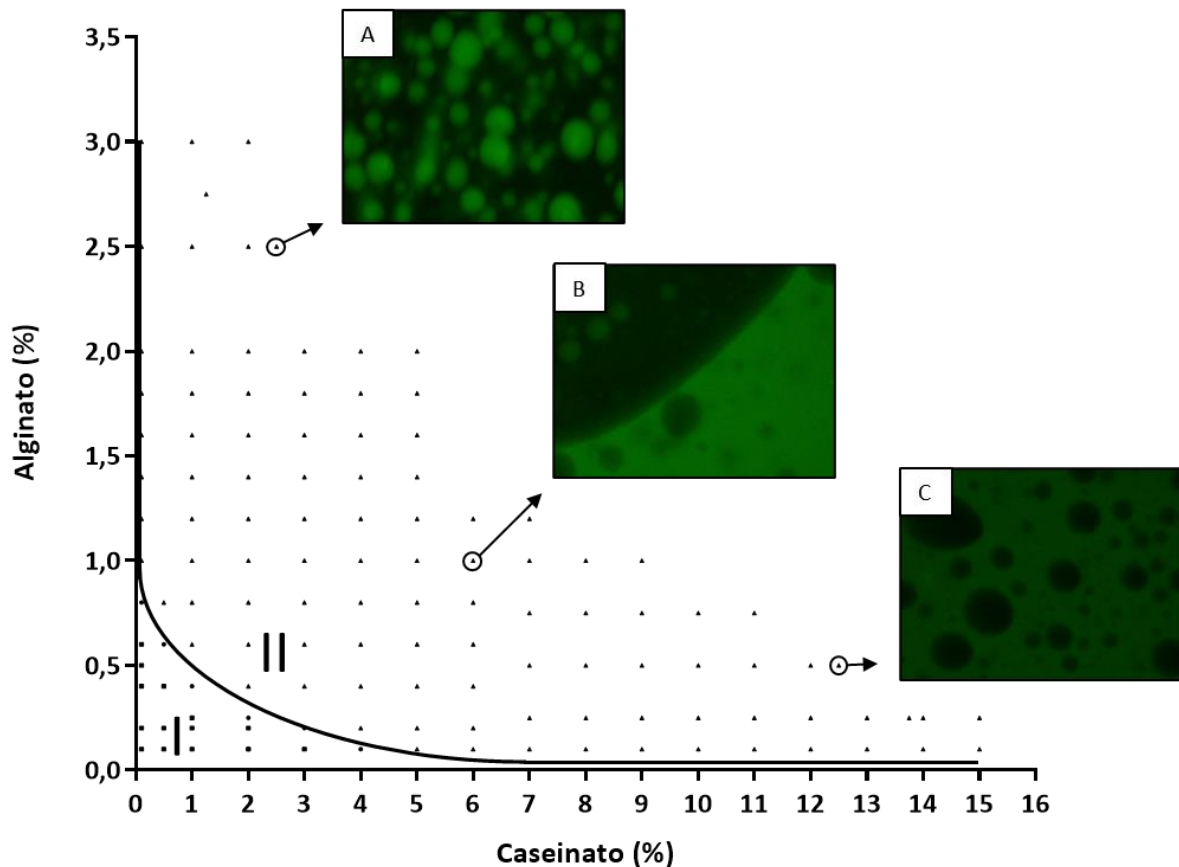


Figura 54. Diagrama de fase en no equilibrio de alginato/caseinato (pH 7), observado a 25 ° C después de 48 horas de preparación. El diagrama de fases se puede dividir en dos regiones: (I) una fase líquida y (II) dos fases líquidas. Se pueden obtener diferentes microestructuras: (A), C2,5/A2,5, emulsión de caseinato en alginato; (B) A1/C6, emulsión bicontinua; y (C) A0,5/C12,5, emulsión de alginato en caseinato. Los puntos indican las mezclas ensayadas. Estas micrografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseinato marcado con FITC).

El primer diagrama de fases publicado sobre este sistema, fue descrito por Capron y cols., 2001 [Capron y cols., 2001] (**Figura 8B**). Estos investigadores publicaron un diagrama más detallado indicando las líneas de reparto, que indican la composición de las fases, que indican la composición de las fases que constituyen cada mezcla. Antonov y Moldanaers, 2011

[Antonov & Moldenaers, 2011](**Figura 8C**), presentaron un diagrama de fases en equilibrio a pH 7 y 23 °C en solución reguladora de fosfatos. Al compararlo con nuestro estudio, observamos que nuestra línea binodal está ligeramente más cercana a los ejes, es decir, la zona multifásica aparece a una concentración polimérica ligeramente inferior. Esto se podría atribuir al cloruro de sodio que forma parte de la solución reguladora de fosfato salino (PBS), que en consecuencia disminuye la región monofásica.

Estas emulsiones se desestabilizan con el tiempo y especialmente cuando se han preparado con elevadas concentraciones de caseinato de sodio, aparece un sólido precipitado en la parte inferior del recipiente. La aparición de una fase sólida se ha descrito en numerosas publicaciones sobre el sistema alginato de sodio-caseinato de sodio y normalmente el sólido se elimina por centrifugación [[Antonov & Moldenaers, 2011]. También se ha descrito en otras mezclas poliméricas, como por ejemplo en el sistema constituido por gelatina y maltodextrina [Beldengrün y cols., 2018] [Kasapis y cols., 1993] [Hoey y cols., 2016].

Para conocer la naturaleza del sólido se analizó mediante microscopía confocal Raman el precipitado formado en 4 emulsiones, cercanas a la línea binodal. Para ello se eliminaron las fases líquidas, se secaron las muestras en estufa a 40 °C y se analizaron los sólidos por Raman. A título comparativo también se analizó el alginato de sodio y el caseinato de sodio en polvo. Los resultados muestran que el caseinato de sodio (color rojo) presenta 3 picos característicos, cercanos a 550, 900 y 1400 cm^{-1} , que no aparecen en el espectro del alginato de sodio (color negro) (**Figura 55**). Los sólidos presentes en las emulsiones muestran los picos característicos del caseinato, con lo que se deduce que el precipitado corresponde a este polímero.

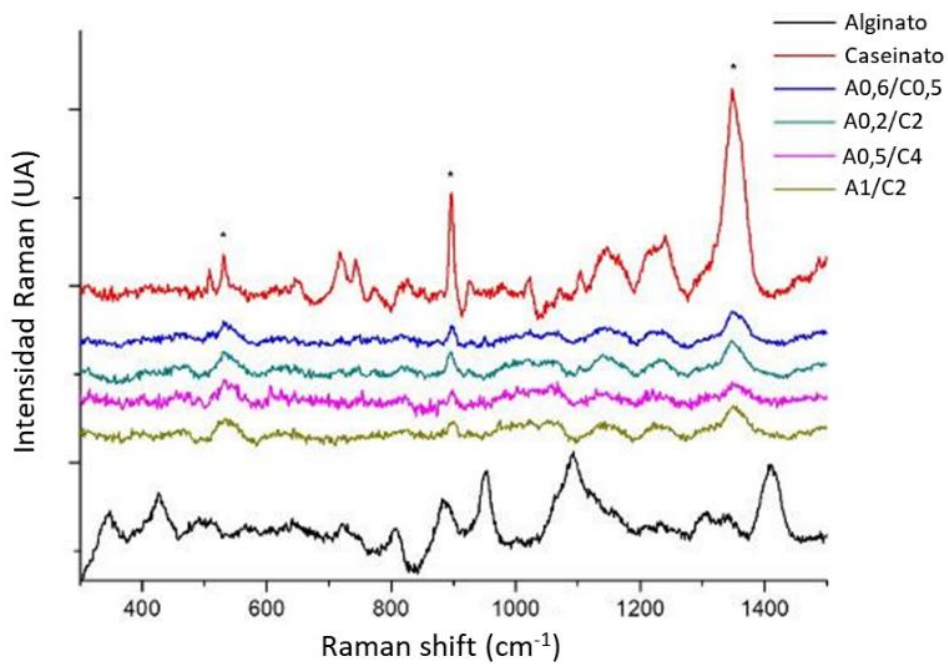


Figura 55. Espectros confocales micro-Raman de caseinato de sodio, alginato de sodio y de muestras sólidas que aparecen en emulsiones después de 7 días de preparación a 25 ° C. En * representa 3 picos propios del caseinato que se repiten con menor intensidad en las emulsiones y no en el alginato de sodio.

A partir de estos ensayos, se seleccionaron emulsiones que no presentan precipitados sólidos a nivel macroscópico después de 7 días y que tienen una estabilidad superior a una semana (**Tabla 8**).

Tabla 8. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato (C) y alginato (A).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A) añadido	Peso de solución de caseinato (C) añadido	Orden de adición de los componentes	Pruebas que se han utilizado
A0,25/C13,75	C	0,5**	5,5*	C sobre A	Incorporación de CL y MF
A0,17/C11	C	0,5''	5,5'	C sobre A	Incorporación de MF
A0,5/C12,5	C	1**	5*	C sobre A	Incorporación de MF y M
A0,33/C10	C	1''	5'	C sobre A	Incorporación de MF y δ
C2,5/A2,5	A	5**	1*	A sobre C	Incorporación de MF y M
C2/A1,67		5''	1'	A sobre C	Incorporación de MF
C1,25/A2,75	A	5,5**	0,5*	A sobre C	Incorporación de CL y MF
C1/A1,83	A	5,5''	0,5'	A sobre C	Incorporación de MF y δ

- * Solución concentrada de caseinato 15%
 ** Solución concentrada de alginato 3%
 ' Solución concentrada de caseinato 12%
 '' Solución concentrada de alginato 2%
 CL Hidrocloruro de clindamicina
 MF Hidrocloruro de metformina
 δ Glucono-delta-lactona
 M Mucina

Las emulsiones caseinato en alginato (C2,5/A2,5 y C1,25/A2,75) y las emulsiones alginato en caseinato (A0,5/C12,5 y A0,25/C13,75), se han seleccionado para la incorporación de hidrocloreuro de CL y la incorporación de mucina como agente estabilizante. La selección de estas formulaciones se debe a que presentaban una elevada viscosidad y una estabilidad superior a una semana. Se prepararon a partir de soluciones concentradas de alginato al 3% y de caseinato al 15% similares a otras composiciones descritas en la bibliografía, de las que existen estudios sobre su comportamiento reológico [Capron y cols., 2001] [Maestro y cols., 2020].

Las formulaciones de caseinato en alginato C1/A1,83 y alginato en caseinato A0,33/C10, se han utilizado para estudios de incorporación de hidrocloreto de MF y gelificación con glucono-delta-lactona. Ambas emulsiones se prepararon a partir de soluciones concentradas de alginato 2% y caseinato 12%, con la finalidad de obtener emulsiones menos estables (estabilidad inferior a una semana) y evaluar las posibles diferencias en la cesión y su estabilización por métodos químicos

4.2.2 Incorporación de principios activos

Se seleccionaron las emulsiones W/W que se muestran en la Tabla 9 y se estudió la incorporación de dos principios activos modelo, solubles en agua: hidrocloreto de CL y MF. Posteriormente se estudió la estabilidad de las emulsiones con principio activo y la cesión de los mismos desde las emulsiones a una solución receptora.

Hidrocloreto de Clindamicina

Se ha seleccionado CL como principio activo modelo hidrofílico, debido a sus propiedades fisicoquímicas. Presenta alta solubilidad en agua de 100 mg/mL [Lawrence y cols., 2018], un pKa de 7,45 [Schwab y cols., 1983] y un coeficiente de partición de 2,16 [Hansch y cols., 1995]. Dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) pertenece a la clase III, por lo que tiene una alta solubilidad y baja permeación [Papich & Martinez, 2015].

Para el estudio de la incorporación de CL, se prepararon soluciones concentradas de alginato de sodio al 3% y de caseinato de sodio al 15%. Se mezclaron pesos distintos de estas soluciones, tal como se indica en la Tabla 9 y se formaron emulsiones de alginato en caseinato y de caseinato en alginato. El principio activo se incorporó en la solución concentrada que formaría la fase interna en una cantidad suficiente para que en la emulsión su concentración fuera del 2% en peso. Las mezclas se prepararon en PBS pH 7,4 y fueron observadas a 24 horas de preparación macro y microscópicamente.

Teniendo en cuenta que las dosis orales son de 150 mg a 300 mg de CL [CIMA, 2022], si consideramos un peso final de emulsión administrada de 6 g, la dosis de principio activo es de 120 mg, próxima a las dosis usuales de este antibiótico.

Las observaciones macro y microscópicas mostraron que la incorporación de CL a las emulsiones no impedía su formación, tanto para emulsiones de caseinato en alginato (**Figura 56A, B**) como para emulsiones de alginato en caseinato (**Figura 56C, D**). Macroscópicamente, no se observó separación de fases a las 24 horas.

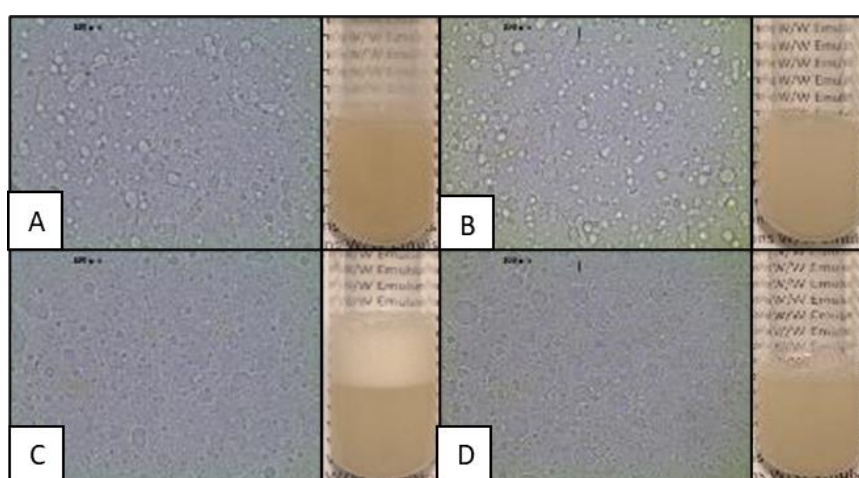


Figura 56. Micro (40x) y macrografía sistema alginato/caseinato con CL incorporada, 24 horas de su preparación. (A) C2,5CL2/A2,5; (B) C1,25CL2/A2,75; (C) A0,5CL2/C12,5; (D) A0,25CL2/C13,75.

Para determinar el comportamiento de la emulsión al incorporar CL, se estudió como afecta en el pH y la conductividad al agregar una concentración creciente de este principio activo. Para esto se prepararon diferentes soluciones a diferentes concentraciones de CL, una vez homogenizada la muestra, se procedió a la medición de pH y conductividad.

En primer lugar, se determinó el pH y la conductividad del agua, de la solución de PBS y de las soluciones concentradas de alginato de sodio (0,5% p/p) y de caseinato de sodio (2,5% p/p) en agua y en PBS, esto debido a su concentración es similar a la concentración final en la emulsión. Como se observa en la **Tabla 9**, las soluciones que contienen PBS tienen una alta conductividad debido a las sales disueltas. Se observa una ligera disminución en el valor del

pH de la solución de caseinato en PBS, probablemente debido a la interacción de las sales con la proteína.

Tabla 9. pH y conductividad de agua, PBS, y soluciones poliméricas preparadas en agua y PBS. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

	pH	DE	Conductividad ($\mu S/cm$)	DE
H ₂ O	6,998	-	0,056	-
PBS	7,410	0,001	24887	6
A0,5H ₂ O	6,895	0,006	1,679	0,022
A0,5PBS	7,397	0,008	19247	0,316
C2,5H ₂ O	6,879	0,003	1,309	0,010
C2,5PBS	7,010	0,008	18607	0,040

Posteriormente, se determinó el pH y la conductividad de soluciones de CL a distintas concentraciones (entre el 2% y el 24% en peso) en agua y en PBS, así como de las soluciones de alginato al 0,5% en peso y de caseinato al 2,5% en peso, preparadas en agua y en PBS, con distintas concentraciones de principio activo (**Figura 57**).

Como era previsible, la incorporación de cantidades crecientes de CL, que es un principio activo que se ioniza en medio acuoso, da lugar a un aumento en la conductividad en todas las soluciones. Este principio activo produce una ligera disminución del pH a concentraciones crecientes, que alcanza valores ligeramente inferiores a 6 en PBS cuando la concentración de CL es muy elevada (24%). En agua se observa la misma tendencia, aunque los valores de pH más bajos se observan en la solución que no contiene ni alginato ni caseinato. En presencia de caseinato, los valores de pH son muy similares en agua y en PBS. En PBS, el pH de las soluciones de alginato y caseinato siempre presenta valores superiores a 5, aun con concentraciones muy elevadas de CL. Estos valores de pH son superiores al pKa del alginato y al pI del caseinato, por lo que no se espera que la estabilidad de las emulsiones W/W se vea afectada por la variación del pH.

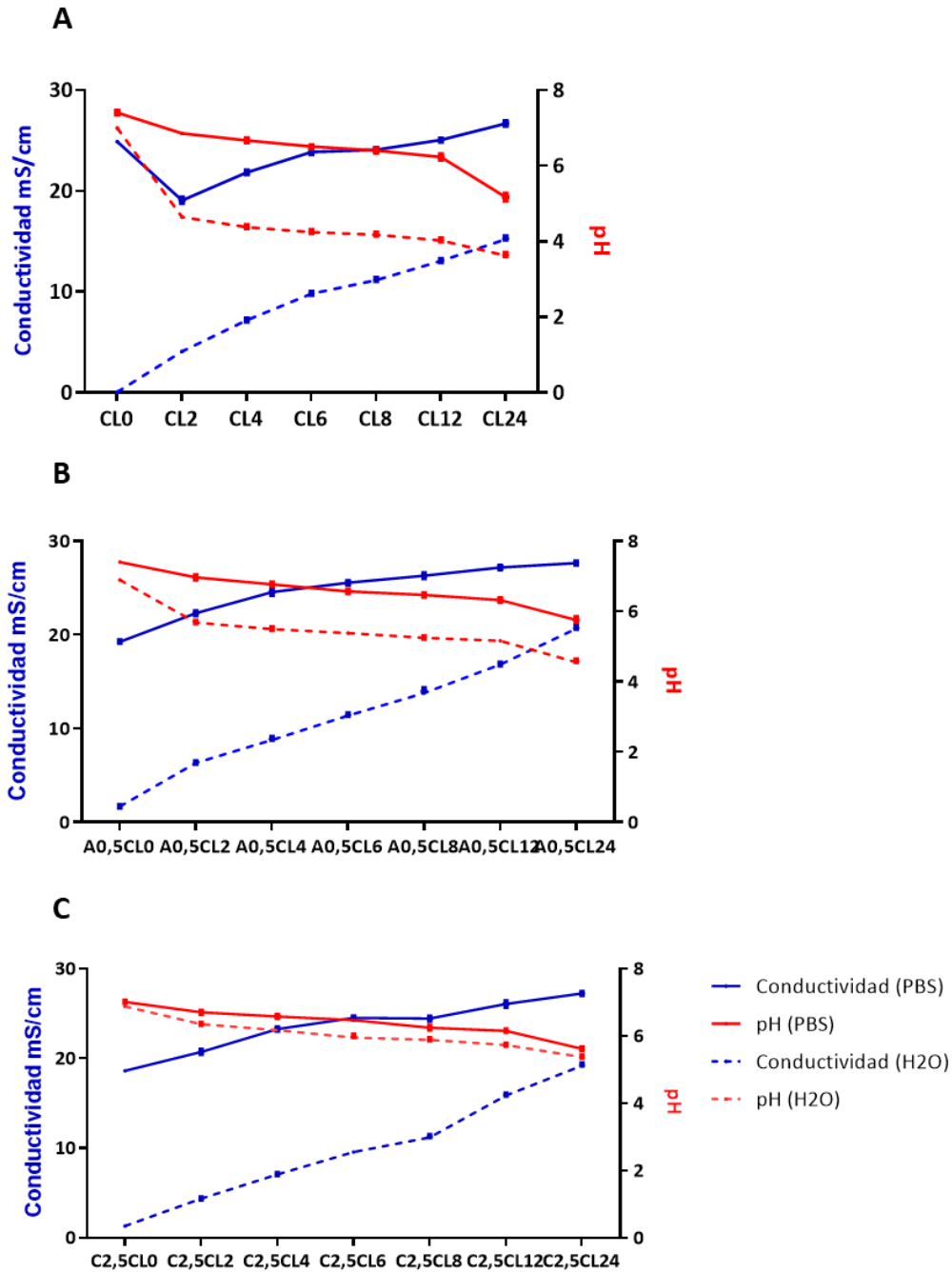


Figura 57. Efecto de hidrocloreto de CL en el pH y conductividad a 25 °C, En agua (línea discontinua) y en PBS (línea continua). (A) CL en solución; (B) CL en solución de alginato al 0,5% en peso; (C) CL con caseinato al 2,5% en peso.

Se preparó una emulsión de caseinato en alginato (C1,25/A2,75) y otra emulsión de alginato en caseinato (A0,25/C13,75), con y sin el principio activo. Para esto se incorporó CL en la solución polimérica que constituirá la fase interna en una cantidad suficiente para que

en la emulsión final estuviera en una concentración del 2% en peso. Las emulsiones con y sin CL se conservaron a 25 °C y se observaron micro y macroscópicamente durante 4 semanas. También se realizó conteo de gotas mediante microscopía óptica con la finalidad de obtener una distribución del tamaño de las gotas, donde los resultados se expresaron en porcentaje (300 gotas representaron el 100% de las gotas).

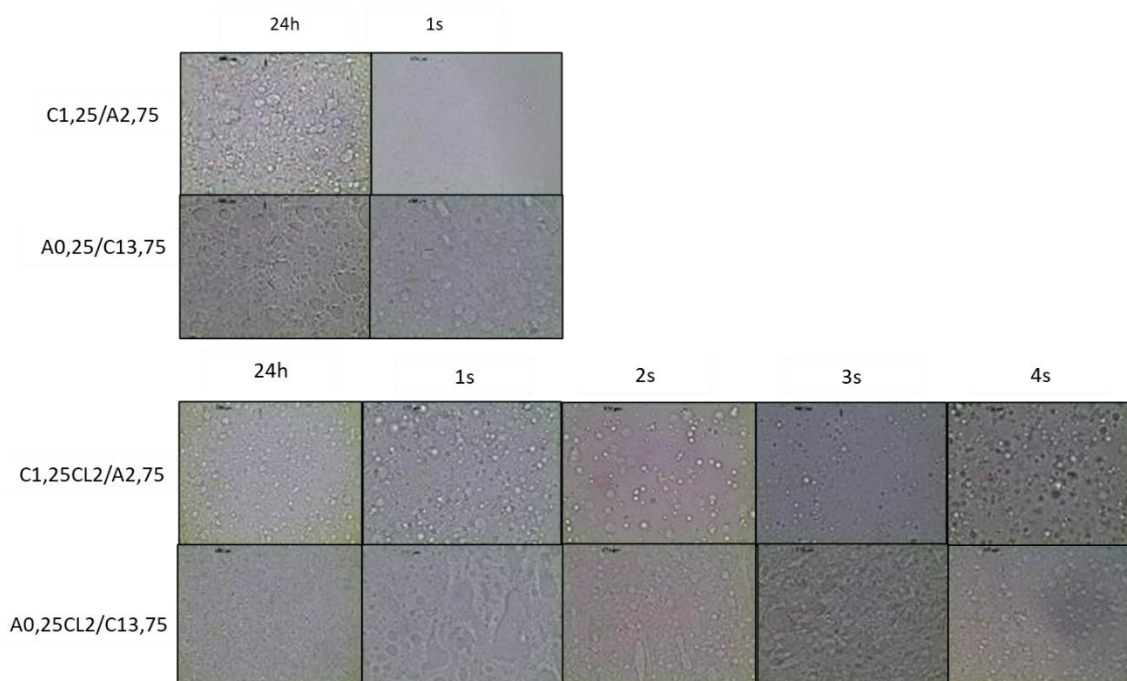


Figura 58. Micrografías de emulsión de caseinato en alginato (C1,25/A2,75) y emulsión de alginato en caseinato (A0,25/C13,75), con y sin CL, después de 24h y 1- 4 semanas después de su preparación.

Estos resultados muestran que las emulsiones sin CL presentan una estabilidad máxima de una semana mientras que en las que contienen CL se pueden observar gotas hasta 4 semanas después de su preparación (**Figura 58**). En relación al aspecto visual, las emulsiones sin CL presentaron separación de fases a una semana de estudio, mientras que aquellas emulsiones que contenían CL presentaron un aspecto homogéneo (**Figura 59**).

Los resultados del recuento de gotas mostraron la presencia de gotas durante 4 semanas para las emulsiones que contenían CL, con una tendencia similar en ambas formulaciones, predominando las gotas de 5-10 μm de diámetro. Sin embargo, al comparar con las emulsiones sin principio activo, después de una semana, el número de gotas disminuye considerablemente y no es posible contar 300 gotas (**Figura 59**).

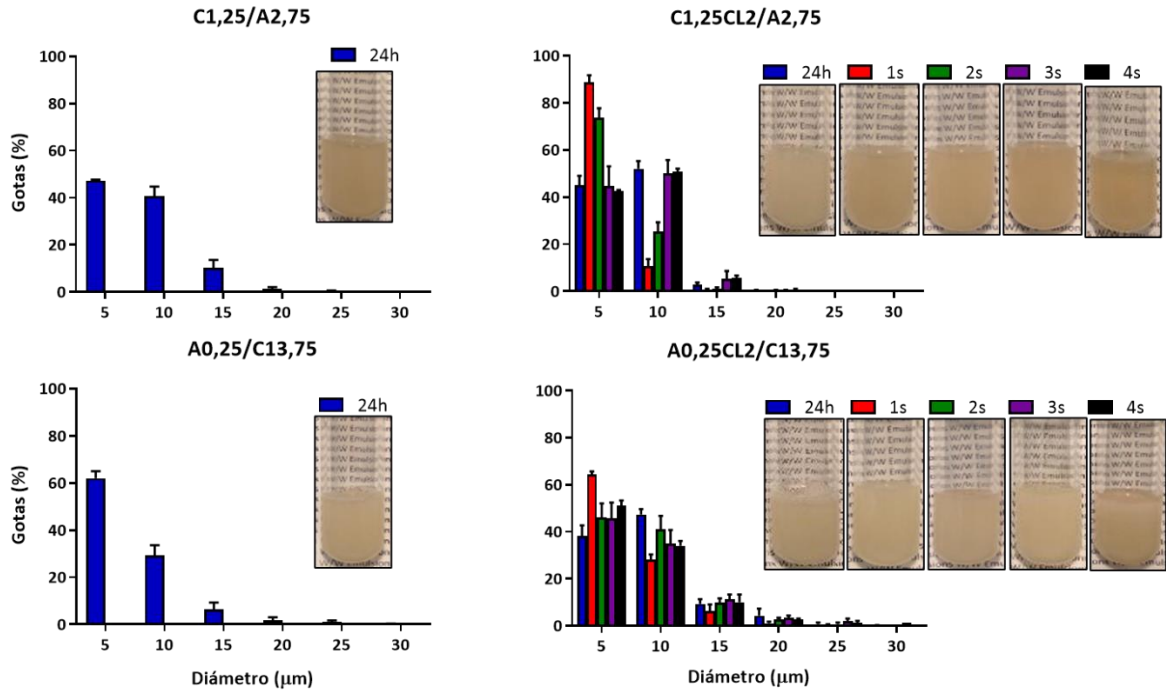


Figura 59. Recuento de gotas de las formulaciones C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75 con y sin CL conservadas a 25 °C durante 4 semanas. Las formulaciones C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75 después de una la semana hay menos de 300 gotas. El 100% indica una cantidad de 300 gotas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

Como se ha observado, las emulsiones presentan una diferente estabilidad cuando se encuentra CL incorporada. Este aumento de estabilidad puede atribuirse a la contribución iónica del principio activo.

Se han estudiado las propiedades reológicas de las emulsiones, tanto la viscosidad como medidas oscilatorias, y la influencia de la incorporación de CL, durante 4 semanas. En primer lugar, se prepararon las emulsiones (C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75), y se ha comparado su viscosidad con la de soluciones poliméricas con la misma concentración de alginato (0,25% y 2,75%) o de caseinato (1,25% y 13,75%) que en las emulsiones, con y sin CL.

Tabla 10. Viscosidad de soluciones poliméricas (C1,25, A2,75) y emulsiones del sistema alginato-caseinato (C1,25/A2,75) con la incorporación de clindamicina (CL2). Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s.

	C1,25	C1,25CL2	C1,25/A2,75	C1,25CL2/A2,75	A2,75
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=25$ 1/s	0,001	0,001	8,137	6,156	6,232
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=50$ 1/s	0,001	0,001	5,694	4,523	4,336

	A0,25	A0,25CL2	A0,25/C13,75	A0,25CL2/C13,75	C13,75
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=25$ 1/s	0,001	0,001	1,439	0,795	3,591
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=50$ 1/s	0,001	0,001	1,289	0,716	3,451

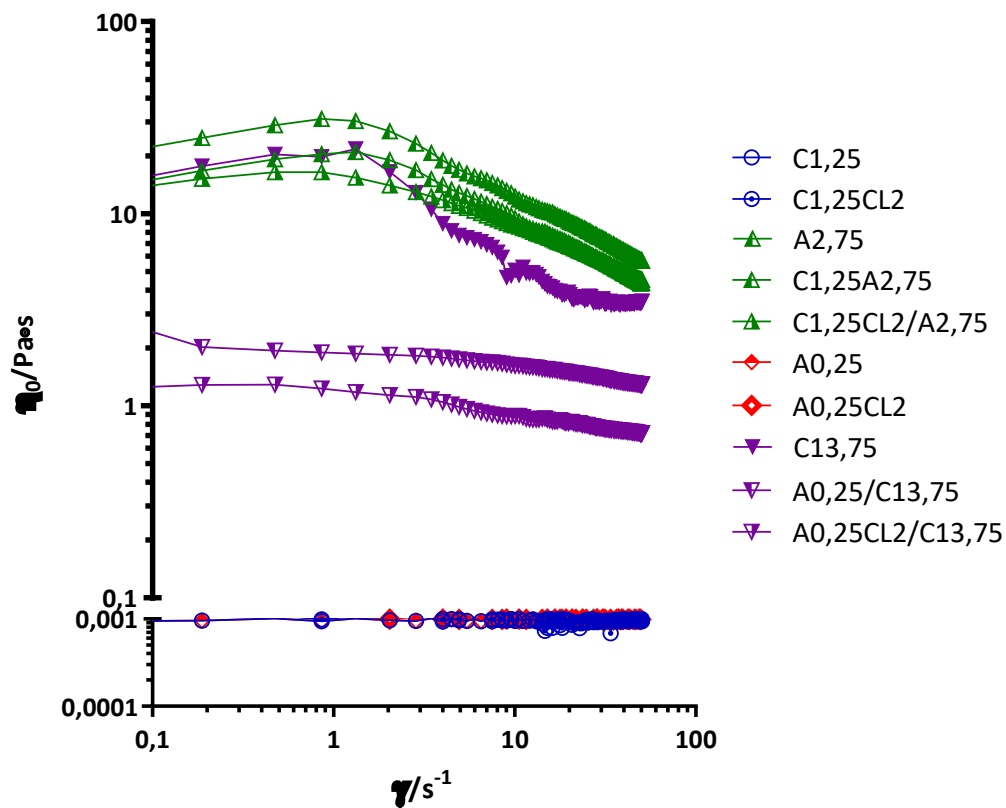


Figura 60. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C.

En relación a la viscosidad se muestra que tanto las emulsiones como las soluciones poliméricas que constituyen la fase externa de las emulsiones, exhiben un comportamiento pseudoplástico. Sin embargo, las soluciones poliméricas que componen la fase interna de las formulaciones se comportaron como un fluido newtoniano, debido a la baja concentración de las soluciones poliméricas predominando el comportamiento del agua (**Tabla 10 y Figura 60**). Estos estudios están en concordancia donde soluciones a bajas concentraciones poliméricas tienen un comportamiento Newtoniano y a una concentración sobre un 1% al alginato, y sobre un 6% para caseinato presentan un comportamiento pseudoplástico [Capron y cols., 2001] [Southward, 1985].

Tabla 11. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato- caseinato (C1,25/A2,75) con la incorporación de clindamicina (CL2) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	C1,25/A2,75 48h	C1,25/A2,75 1s	$\Delta\eta$ (%)	C1,25CL2/A2,75 48h	C1,25CL2/A2,75 2s	C1,25CL2/A2,75 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	12,350	0,888	-92,813	12,840	15,200	2,394	-81,355
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	8,416	0,784	-90,689	8,881	10,250	1,943	-78,122
	A0,25/C13,75 48h	A0,25/C13,75 1s	$\Delta\eta$ (%)	A0,25CL2/C13,75 48h	A0,25CL2/C13,75 2s	A0,25CL2/C13,75 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	1,136	0,119	- 89,551	1,656	5,195	3,410	-34,359
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	1,111	0,104	- 90,675	1,577	4,600	2,862	-37,782

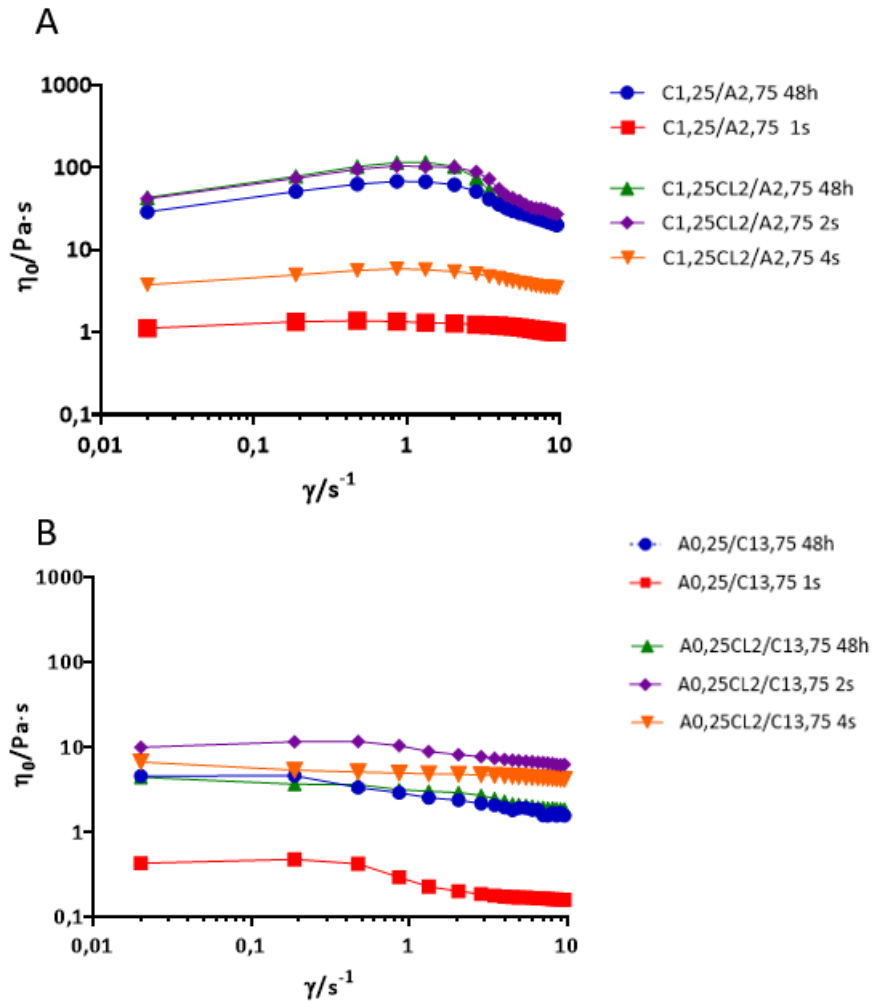


Figura 61. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C1,25/A2,75 y C1,25CL2/A2,75; y (B) A0,25/C13,75 y A0,25CL2/C13,75.

En cuanto a las emulsiones y su estabilidad en el tiempo, la viscosidad de la formulación de caseinato en alginato (C1,25/A2,75) sin CL mostró una disminución de la viscosidad de 48 horas a 1 semana (12 a 0,8 a $\dot{\gamma}=25$ 1/s), al igual que la emulsión alginato en caseinato (A0,25/C13,75) (1,1 a 0,1 a $\dot{\gamma}=25$ 1/s), obteniéndose una pérdida de viscosidad del 90% aproximadamente ($\Delta\eta$). Por el contrario, las emulsiones con CL mantienen la viscosidad en comparación con las emulsiones que no tienen CL por 4 semanas, siendo la emulsión C1,25CL2/A2,75 la que presentaba una disminución en la viscosidad (pérdida del 80% entre las 2 y las 4 semanas). Esto último se puede deber al comienzo del proceso de desestabilización (**Figura 61**). En cambio, la emulsión A0,25CL2/C13,75 presentó una menor disminución de viscosidad entre la semana 2 y 4, con una pérdida del 34 a 37 %. Estos

resultados muestran que la incorporación de CL permite mantener la viscosidad de la emulsión por mayor tiempo.

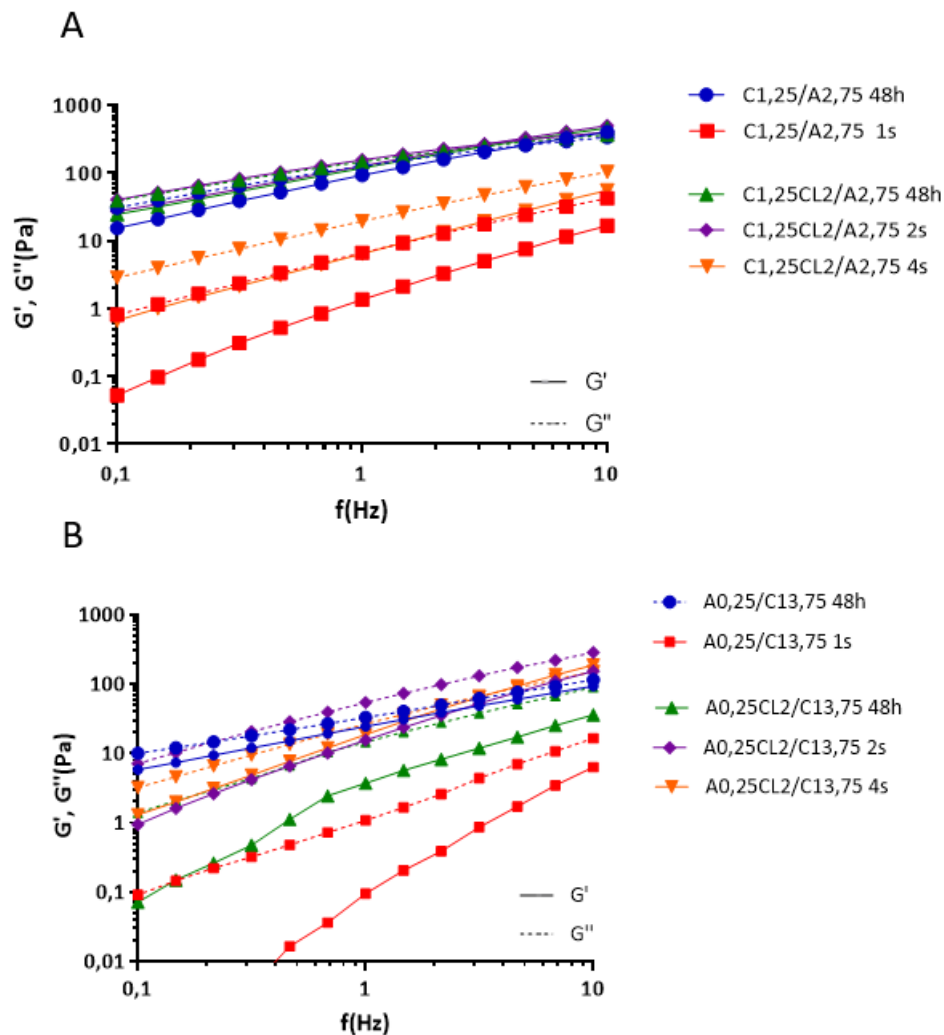


Figura 62. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G''), (A) C1,25/A2,75 y C1,25CL2/A2,75; y (B) A0,25/C13,75 y A0,25CL2/C13,75.

En las mediciones oscilatorias dinámicas para las formulaciones control (sin CL), se observa que ambos módulos G' y G'' disminuyeron desde 48 horas a una semana y que el comportamiento líquido (G'') siempre predomina a lo largo del barrido de frecuencia. Para las formulaciones CL, ambos módulos están más cerca, incluso se puede observar el punto crítico donde los módulos se cruzan, es decir, desde ese punto predomina un comportamiento sólido sobre el líquido. Estas formulaciones que contienen CL mantienen tanto el módulo G' como

G'' en pendiente durante todo el tiempo de estudio (**Figura 62**). Este comportamiento donde se observa un comportamiento líquido por sobre el sólido está en concordancia con estudios previos de estos sistemas [Capron y cols., 2001] [Maestro y cols., 2020], sin embargo, no se han realizado estudios reológicos en el tiempo para este sistema y condiciones trabajadas.

Clorhidrato de Metformina

Otro principio activo utilizado fue MF, el cual es un antidiabético muy soluble en agua ($1,06 \cdot 10^6$ mg/L a 25 °C) [NCBI, 2021], con un pKa de 12,4 [NCBI, 2022]. Se ha seleccionado este principio activo debido a que presenta un pKa diferente al hidrocloreto de CL. Es por esto que se ha querido estudiar la incorporación de MF dentro de estas emulsiones, ya que no sólo podría ser determinante el carácter hidrofílico de una molécula, si no también, el grado de ionización al pH de la emulsión.

Se ha determinado la conductividad y el pH. Cuando se utiliza MF se observa un fenómeno diferente al observado con CL (**Figura 57**). En agua, el hidrocloreto de MF no ocasiona una gran variación del pH y la conductividad aumenta al aumentar la concentración de esta. En PBS, no genera también una variación en el pH y la conductividad aumenta con la concentración de MF (**Figura 63**).

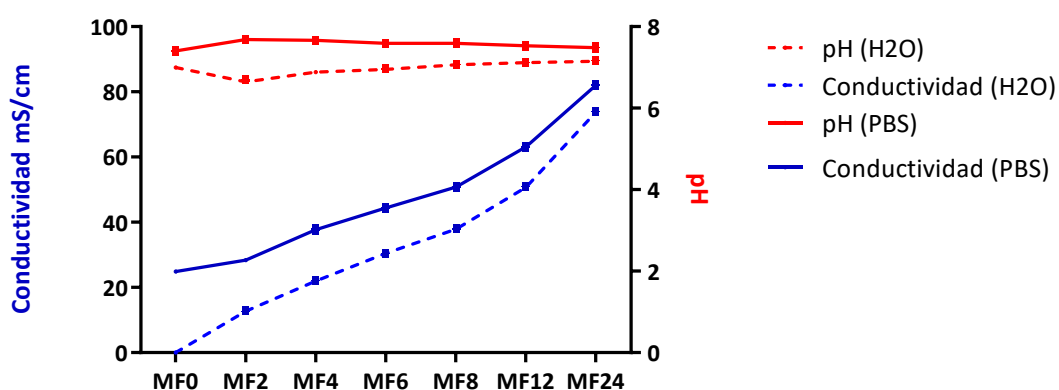


Figura 63. Efecto de hidrocloreto de MF en el pH y conductividad, en agua miliQ y solución de PBS a 25 °C. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

Para la formación de emulsiones con MF, se prepararon mezclas de soluciones de alginato de sodio al 2% y de caseinato de sodio, al 12%. Las concentraciones de las soluciones concentradas son menores a las utilizadas con CL, debido a que se intenta obtener emulsiones más fluidas y con la posibilidad de notar cambios cuando se incorporen agentes estabilizantes. Posteriormente a las soluciones concentradas se les incorporó MF en cantidad suficiente en la solución que constituirá la fase interna para que en la emulsión resultante se encuentre en una concentración del 2% en peso. Cabe destacar que las soluciones concentradas de alginato de sodio y de caseinato de sodio tenían una concentración inferior de los polímeros que las que se utilizaron para la preparación de emulsiones a las que se incorporó CL (2% en lugar de 3% para el alginato y 12% en lugar de 15% para el caseinato). Se utilizó la misma concentración de MF que la de CL (2%). Las emulsiones preparadas fueron dos del tipo caseinato en alginato (C2/A1,67 y C1/A1,83) y dos del tipo alginato en caseinato (A0,33/C10 y A0,17/C11). Una vez preparadas las mezclas, se evidenció la formación de emulsiones mediante la identificación de la presencia de gotas por microscopía óptica. Los resultados muestran la formación de gotas de emulsión tanto para emulsiones del tipo caseinato en alginato (**Figura 64A, B**) como del tipo alginato en caseinato (**Figura 64C, D**). Macroscópicamente, al igual que emulsiones con CL, no presentaron separación de fases a las 24 h.

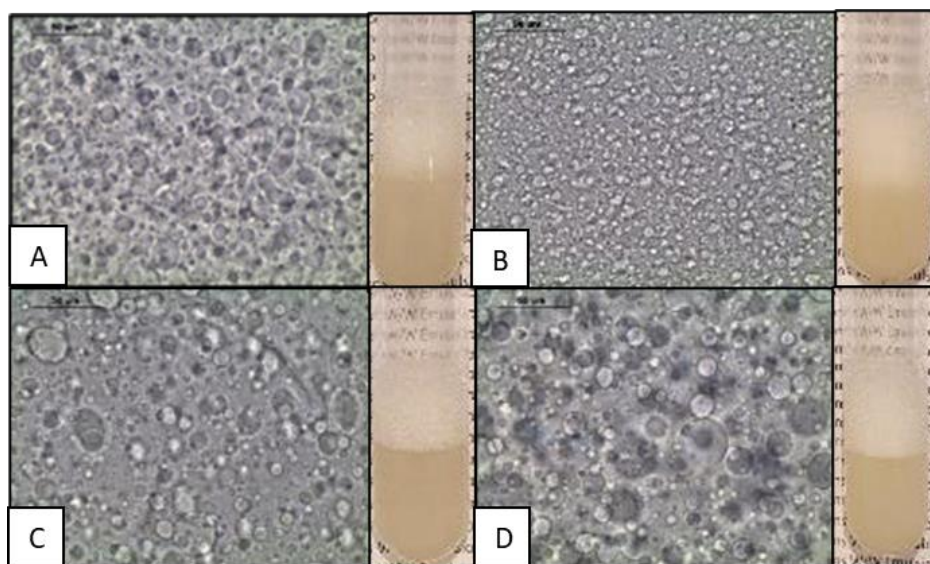


Figura 64. Aspecto microscópico (40x) y macroscópico de emulsiones del sistema alginato/caseinato con un 2% p/p de MF incorporada, después de 24 horas de su preparación. (A) C2,5MF2/A2,5; (B) A0,5MF2/C12,5; (C) C1,25MF2/A2,75; (D) A0,25MF2/C13,75.

Para el estudio de la incorporación de MF, se utilizaron 4 formulaciones (**Tabla 8**): caseinato en alginato (C2/A1,67 y C1/A1,83) y alginato en caseinato (A0,33/C10 y A0,17/C11). Las formulaciones estudiadas con y sin MF mostraron una estabilidad inferior a 1 semana.

Los resultados muestran que la estabilidad de las emulsiones con y sin MF fueron de 1 semana. Lo anterior se evidencia tanto micro (**Figura 65**) como macroscópicamente (**Figura 66**). Algunos viales presentaban separación de fases a una semana con y sin MF (**Figura 66**).

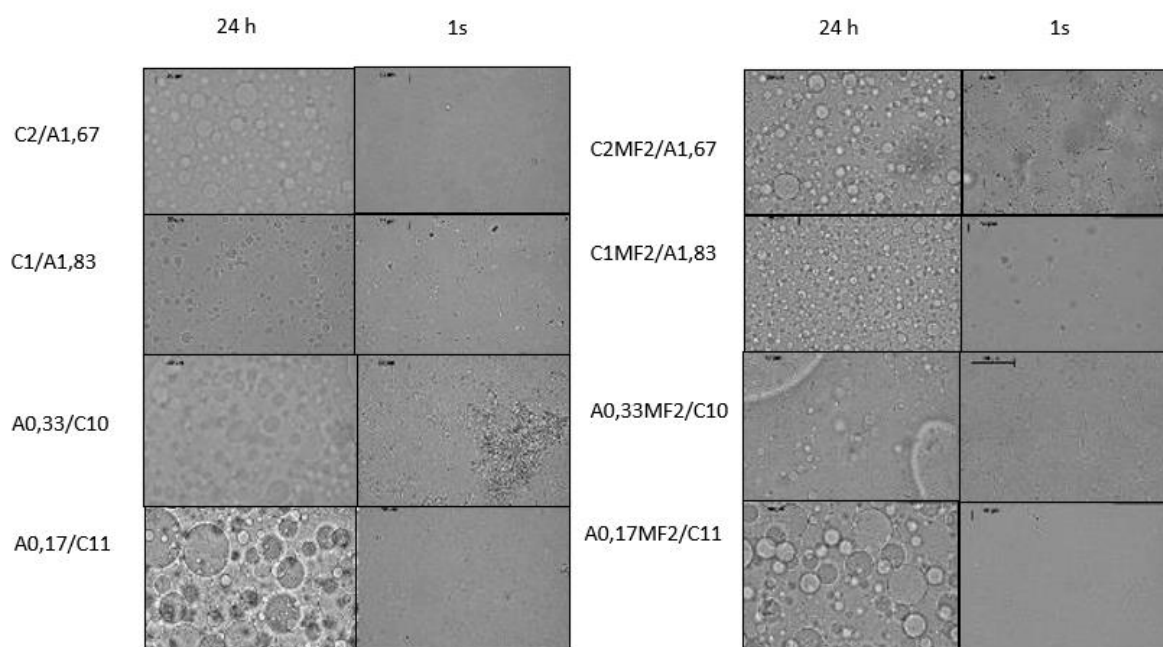


Figura 65. Estabilidad de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 1 semana.

Se determinó además el tamaño de 300 gotas (100%) y se indicaron los resultados en porcentaje. Los resultados muestran que las formulaciones de una semana de estabilidad presentaron una reducción de aproximadamente un 80% de gotas respecto al total, esto debido a la desestabilización de la emulsión. El promedio de diámetro estaba entre las 5 y 10 μm (**Figura 66**).

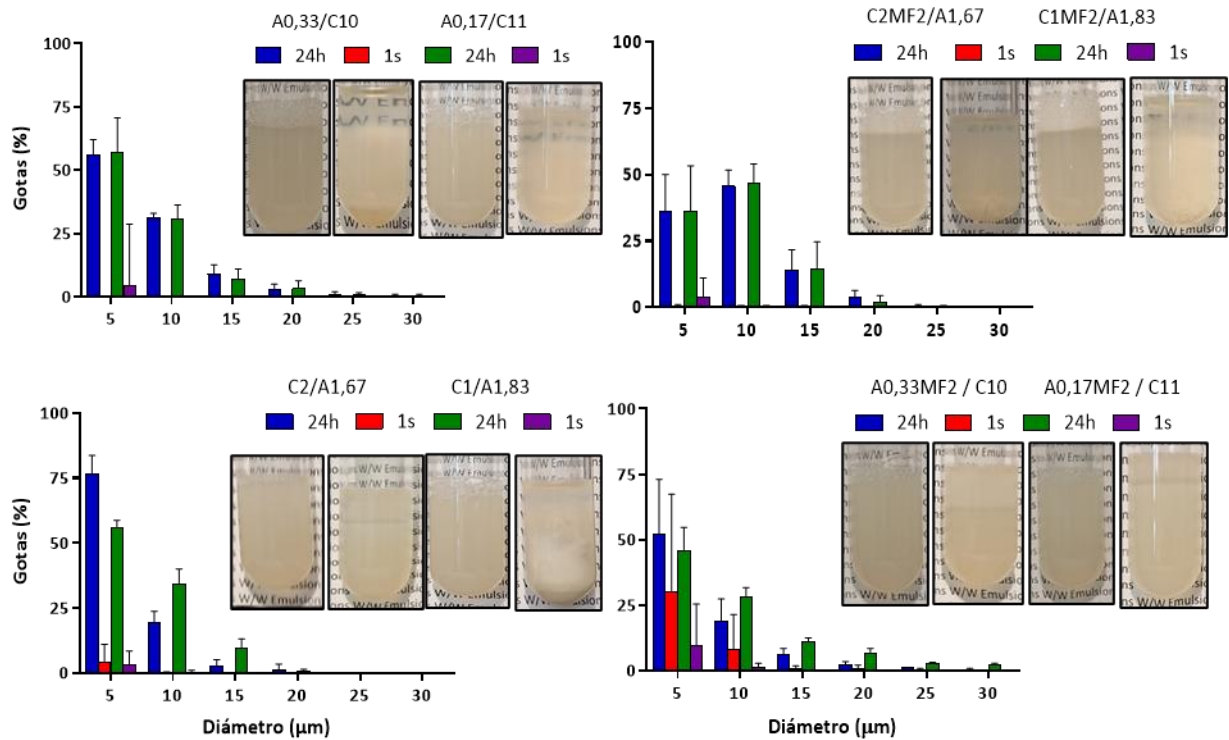


Figura 66. Recuento de gotas de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 1 semana. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

4.2.3 Estabilización

Estabilización por métodos químicos

Delta glucono lactona

La delta glucono lactona (δ) es utilizado en procesos lácteos, en la producción de quesos [Rollema & Muir, 2009] y en la industria farmacéutica como agente viscosizante [Sheskey y cols., 2020]. Se ha descrito la utilización de este excipiente en procesos de gelificación de caseinato [Takeuchi & Cunha, 2008] y para retardar la gelificación de mezclas de alginato y CaCO_3 [Kalaf, 2016].

Se realizaron pruebas preliminares mediante el conocido test del recipiente invertido para determinar la concentración de este gelificante a incorporar a las soluciones concentradas de alginato y caseinato, con la finalidad de obtener emulsiones de distinta viscosidad. Para ello se ensayaron diferentes concentraciones de delta-glucono-lactona (entre el 0,5 y el 1,5%) en una solución concentrada de caseinato al 12% en PBS (**Figura 67**) y en una solución de alginato al 2% (**Figura 68**).

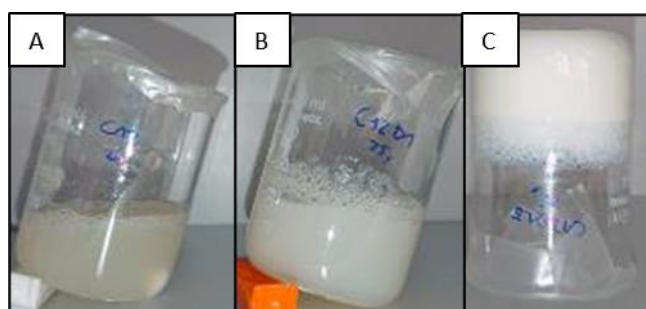


Figura 67. Solución concentrada de caseinato 12% con δ a diferentes concentraciones. (A) C12 δ 0, (B) C12 δ 1, (C) C12 δ 1.5.

Como δ se ha utilizado en la formación de hidrogeles de alginato [Kalaf y cols., 2016], se ha utilizado en este estudio. Es por ello que se probó en una solución concentrada un stock de alginato al 2% a diferentes concentraciones de gelificante (0,5, 1, 1,5 y 2%), como se observa en la **Figura 68**. A partir de 1% de gelificante, el alginato comenzó a gelificar lentamente y a un 2%, ya no fluía.

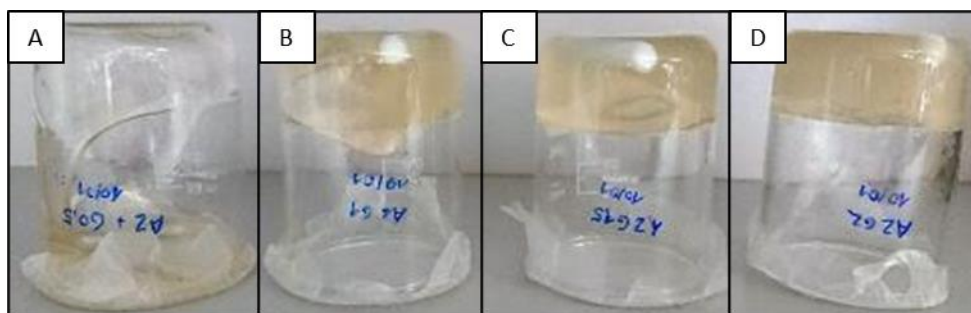


Figura 68. Stock de alginato 2% con δ a diferentes concentraciones. (A) A2 δ 0,5, (B) A2 δ 1, (C) A2 δ 1,5, (D) A2 δ 2.

El fundamento para explicar la gelificación mediada por la delta-glucono-lactona es debido a que, en solución acuosa, se hidroliza parcialmente en ácido glucónico, lo que se traduce en una disminución de pH [Pocker, 1973]. La disminución del pH produce la formación de una red de gel tridimensional a partir de la neutralización grupos cargados del caseinato, en donde a un pH cercano a 4,6 se obtiene una red más porosa lo que permite aumentar el tiempo de envejecimiento [Takeuchi & Cunha, 2008], en nuestro caso el pH obtenido estaba en un rango de 4,4 a 3,6 para una concentración de gelificante del 0,5 y 2%, respectivamente. También se ha indicado que la estabilización de la microestructura del gel, depende principalmente de interacciones electrostáticas, seguidas de enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno [Takeuchi & Cunha, 2008].

Respecto a la gelificación del alginato, existen estudios que indican que el alginato gelifica básicamente por adición de iones divalentes [Braccini & Pérez, 2001]. La gelificación del alginato se puede deber principalmente a la disminución del pH dada por delta-glucono-lactona, ya que, se ha reportado que en pH ácido el alginato puede gelificar por el aumento de grupos carboxilos no ionizados por la disminución de la solubilidad del polímero [Yotsuyanagi y cols., 1987] [Gurikov & Smirnova, 2018]. Sin embargo, es necesario indicar que la gelificación del caseinato ocurre más rápidamente que la del alginato.

Como hemos observado, la delta glucono lactona en solución acuosa se hidroliza dando lugar a ácido glucónico produciendo una disminución del pH lo que puede afectar a la formación de las emulsiones. El cambio de pH que produce el gelificante puede alterar a la repulsión electrostática que tienen el alginato y caseinato en PBS. Para comprobar lo anterior, se formaron emulsiones con gelificante en la solución polimérica de alginato o en la de caseinato, y se mezcló con la solución del otro polímero sin gelificante. El gelificante se preparó a una concentración de 0,5 a 1 % en la solución concentrada de caseinato y de alginato entre 0,5 a 2% (**Tabla 12**). Las observaciones se realizaron a las 24 horas luego de la mezcla de las soluciones correspondiente.

Tabla 12. Nomenclatura y composición de formulaciones del sistema alginato-caseinato con la incorporación de glucono-delta-lactona.

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A) añadido	Peso de solución de caseinato (C) añadido	Concentración inicial de δ (%)	Orden de adición de los componentes
A0,33 δ 0,33/C10	C	1"	5'	2	C sobre A
C1 δ 0,08/A1,83	A	5,5"	0,5'	1	A sobre C
C1 δ 0,04/A1,83	A	5,5"	0,5'	0,5	A sobre C
C1/A1,83 δ 1,38	A	5,5"	0,5'	1,5	A sobre C
C1/A1,83 δ 0,92	A	5,5"	0,5'	1	A sobre C
C1/A1,83 δ 0,46	A	5,5"	0,5'	0,5	A sobre C

' Solución concentrada de caseinato 12%

" Solución concentrada de alginato 2%

δ Glucono-delta-lactona

Las emulsiones con el caseinato con gelificante presentaron gotas, y ambas fluían (**Figura 69**), sin embargo, la emulsión C1 δ 0,04/A1,83 se observaban gotas alargadas a las 24 horas de preparación lo que indicio de desestabilización. Caso contrario, al gelificar alginato, había formulaciones que no presentaban gotas, excepto para A0,33 δ 0,33/C10 que presentaba gotas (**Figura 69**).

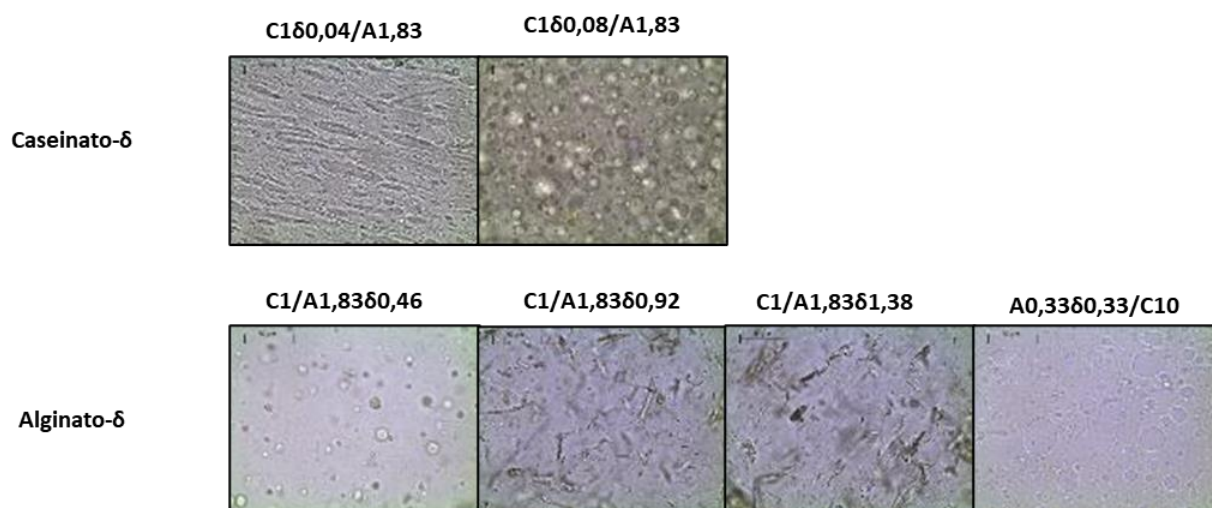


Figura 69. Microfotografías a 40x de emulsiones con la incorporación de gelificante 24 horas desde su preparación.

Estos resultados nos indican que la concentración usada de δ no afectó a la formación de gotas, en las emulsiones que tenían una concentración más baja del gelificante (C160,08/A1,83, A0,3360,33/C10 y C160,04/A1,83). Estos resultados se pueden deber a los diferentes tiempos que toma gelificar el caseinato y el alginato. Como se mencionó anteriormente el caseinato gelifica más rápidamente que el alginato.

Se seleccionaron las formulaciones con una mayor presencia de gotas con la incorporación del gelificante y se comparó su estabilidad con las mismas formulaciones sin gelificante (**Figura 70**).

Microscópicamente las gotas fueron de mayor tamaño ($<20 \mu\text{m}$) en la última formulación donde la fase interna era alginato (**Figura 70**). Estas emulsiones fluían en menor grado al compararla con emulsiones sin gelificante, y su estabilidad fue de una semana tanto para controles como las que incorporan el principio activo.

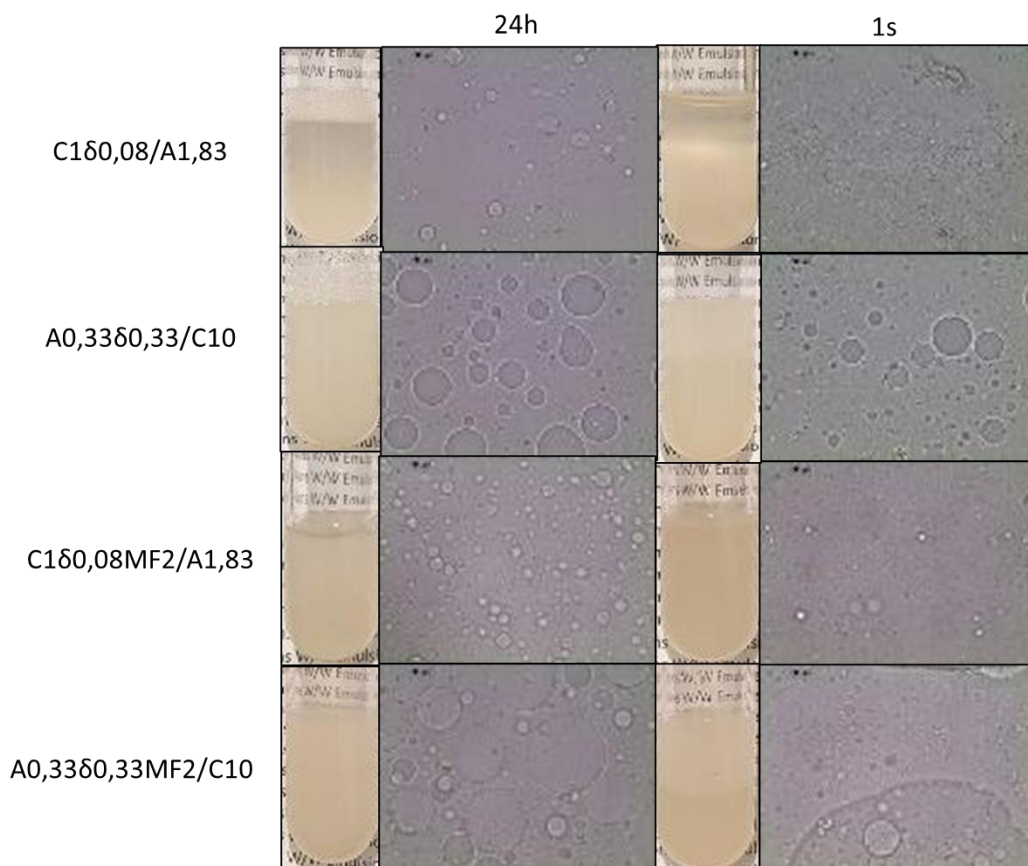


Figura 70. Macro y microfotografías a 40x de emulsiones gelificadas.

Si bien se ha formado emulsión con glucono-delta-lactona, se observa un aumento de tamaño de las gotas, esto da indicio de inestabilidad de la emulsión. Es por ello que se descartó el uso de este gelificante en esta tesis doctoral.

Estabilización por métodos Físicos

Formación de emulsiones Pickering

La finalidad de incorporar partículas, es aumentar la estabilidad retardando la separación de fases. Cuando la emulsión se comienza a desestabilizar nos encontramos con procesos de floculación y coalescencia, al usar estas partículas podemos impedir la desestabilización.

Mucina

Se ha seleccionado mucina, debido a que es una glicoproteína insoluble en agua, la cual en solución acuosa forma redes reversibles que incluyen interacciones hidrofóbicas y que son estabilizadas por repulsiones electrostáticas con carga negativa [Schipper y cols., 2007]. Esta repulsión de cargas y su insolubilidad en agua, le permite estabilizar emulsiones, tal como se demostró en estudios previos del grupo de investigación, relacionados con la formación de emulsiones múltiples (W/W/W) en el sistema gelatina/maltodextrina [Beldengrün y cols., 2020].

La mucina en medio acuoso forma agregados que es necesarios dispersar. Para esto se preparó una suspensión de mucina en PBS y posteriormente fue dispersada mediante una sonda de ultrasonido. Se midió el tamaño antes y después de sonicar, y se obtuvo un tamaño de $891,3 \pm 46,5$ nm con una PDI de $0,144 \pm 0,173$ antes de sonicar y posterior a sonicar se obtuvo un tamaño de $230,8 \pm 12,1$ y una PDI de $0,465 \pm 0,013$.

A la hora de incorporar mucina, se probó preparar la mucina en la solución concentrada de alginato para posteriormente, mezclarlo con la solución caseinato. En caso contrario, se incorporó mucina en la solución concentrada de caseinato y se mezcló con el alginato.

Se utilizó una emulsión de caseinato en alginato C2,5/A2,5 y una emulsión de alginato en caseinato A0,5/C12,5, como se menciona en la **Tabla 8**, con la finalidad de estudiar la estabilidad y el aumento de viscosidad que pudiera aportar la mucina en emulsiones más fluidas que las utilizadas anteriormente. Se incorporó mucina en dos concentraciones: 0,1% y 1% respecto a la emulsión final.

En la preparación de la emulsión de caseinato en alginato (C2,5/A2,5) se incorporó mucina en la solución de caseinato al 15% en una concentración de 0,1 y 1% inicial para que en la emulsión la mucina estuviera al 0,02% o al 0,16% (C2,5M0,02/A2,5 y C2,5M0,16/A2,5), respectivamente (**Tabla 13**). El caseinato se marcó con fluoresceína (color verde) y la mucina se marcó con rodamina (color rojo). Como se observa en la **Figura 71** cuando la mucina se mezcla junto al caseinato, se forma la emulsión. Por otra parte, en la emulsión de alginato en caseinato (A0,5/C12,5), se incorporó mucina a la misma concentración anterior (A0,5M0,02/C12,5 y A0,5M0,16/C12,5) (**Tabla 13**), y se observa una emulsión con una estructura bicontinua y con la mucina dispersa (color rojo).

Tabla 13. Nomenclatura y composición de formulaciones del sistema alginato-caseinato con la incorporación de mucina.

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de alginato (A) añadido	Peso de solución de caseinato (C) añadido	Concentración inicial de M (%)	Orden de adición de los componentes
A0,5M0,02/C12,5	C	1**	5*	0,1	C sobre A
A0,5M0,16/C12,5	C	1**	5*	1	C sobre A
C2,5M0,02/A2,5	A	5**	1*	0,1	A sobre C
C2,5M0,16/A2,5	A	5**	1*	1	A sobre C

* Solución concentrada de caseinato 15%

** Solución concentrada de alginato 3%

M Mucina

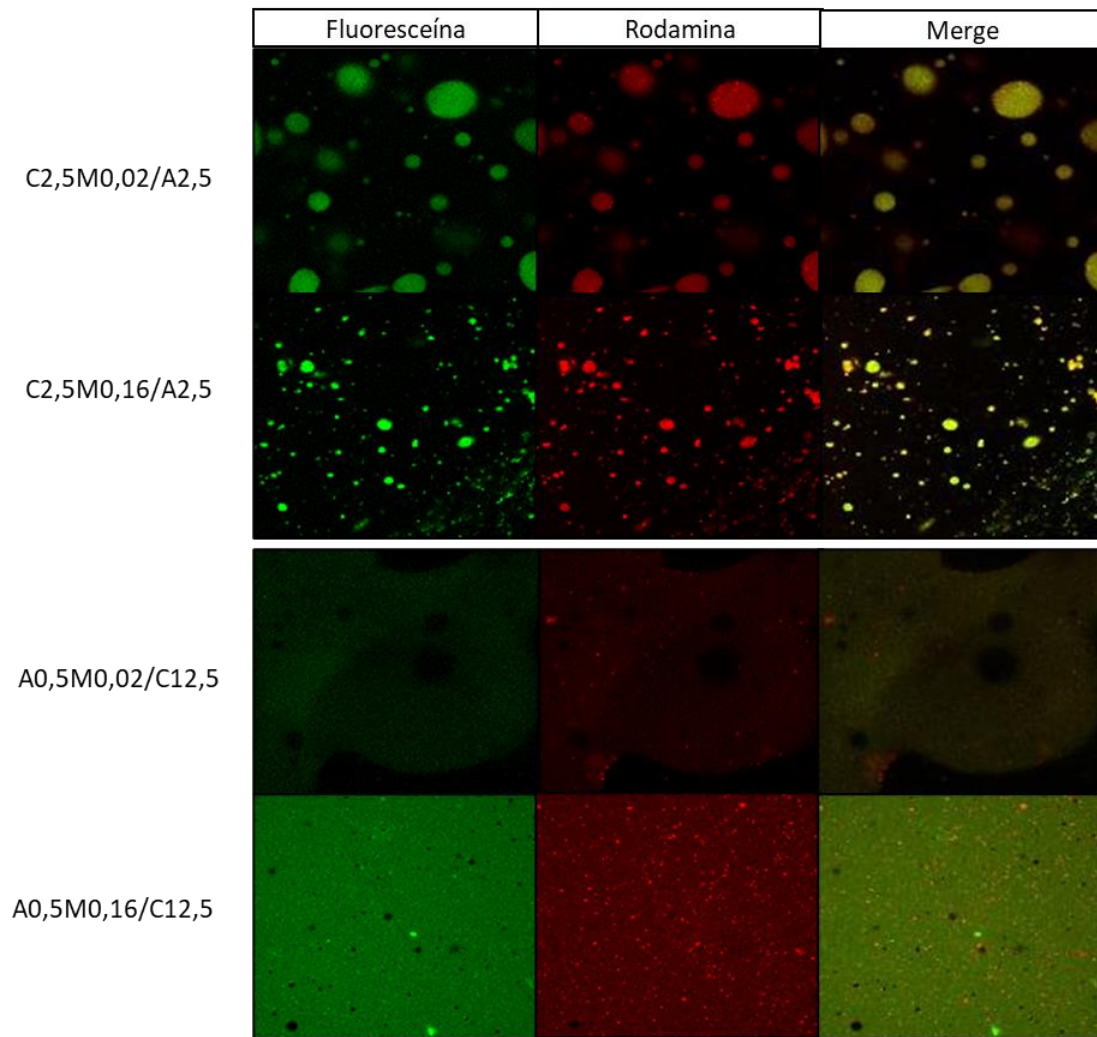


Figura 71. Microfotografía a 40X en microscopio confocal fluorescente de la incorporación de mucina marcada con rodamina (color rojo) y el caseinato marcado con fluoresceína (color verde). La emulsión C2,5/A2,5 se incorporó mucina a dos concentraciones (0,1 y 1% inicial) en la solución concentrada de caseinato, mientras que la emulsión A0,5/C12,5 se incorporó mucina en la solución concentrada de alginato.

Para las emulsiones C2,5M0,02/A2,5 y C2,5M0,16/A2,5 donde mucina se incorporó a la solución concentrada de caseinato, se observó que a una baja concentración de mucina inicial 0,1%, y al 1%, no afectan a la formación de la emulsión. Posteriormente, se ha seleccionado la emulsión C2,5/A2,5 con mucina al 1%, esto debido a la mayor marca obtenida, para realizar microscopia confocal (**Figura 72**). Con la marca de caseinato (color verde) y de mucina (color rojo), se realizó un merge de ambas imágenes, donde se observa que la mucina se encuentra en la interfase (**Figura 72C**). Para observar mejor la mucina se realizó una

reconstrucción en 3 dimensiones (**Figura 72D**), donde se muestra que mucina se encuentra alrededor de las gotas de caseinato.

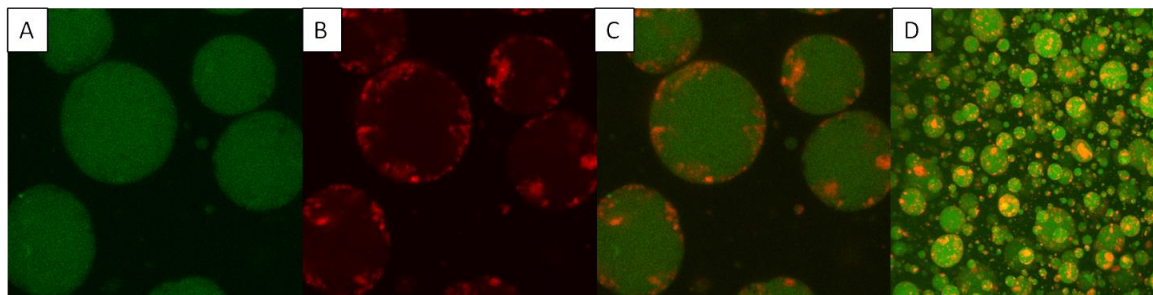


Figura 72. Micrografías a 40x de microscopio confocal fluorescente de la emulsión C2,5M0,16/A2,5. (A) Caseinato FITC, (B) mucina RhBITC, (C) merge y (D) Reconstrucción 3D.

En relación a la estabilidad, se estudió durante un mes las siguientes formulaciones: control (C2,5/A2,5), emulsión con CL (C2,5CL2/A2,5), emulsión con mucina (C2,5M0,16/A2,5) que contiene una concentración de mucina inicial del 1% y final de 0,16 %; y la última con CL y mucina (C2,5CL2M0,16/A2,5). Para esto se incorporó la mucina con la solución concentrada de caseinato con o sin CL y luego se mezclaron con la solución concentrada de alginato.

Se estudio la estabilidad macroscópica, durante 4 semanas. Los resultados muestran que las formulaciones con CL, mucina y con ambos productos no mostraron separación de fases durante el periodo de estudio; sin embargo, en la formulación control C2,5/A2,5 se observó separación de fases después de 3 semanas (**Figura 73**). En relación a la distribución de tamaño de gota (**Figura 74**), presentaba un máximo alrededor de los 10 μm . Aunque no se realizó un estudio estadístico con los valores obtenidos, se observó una distribución similar durante todo el periodo de estudio.

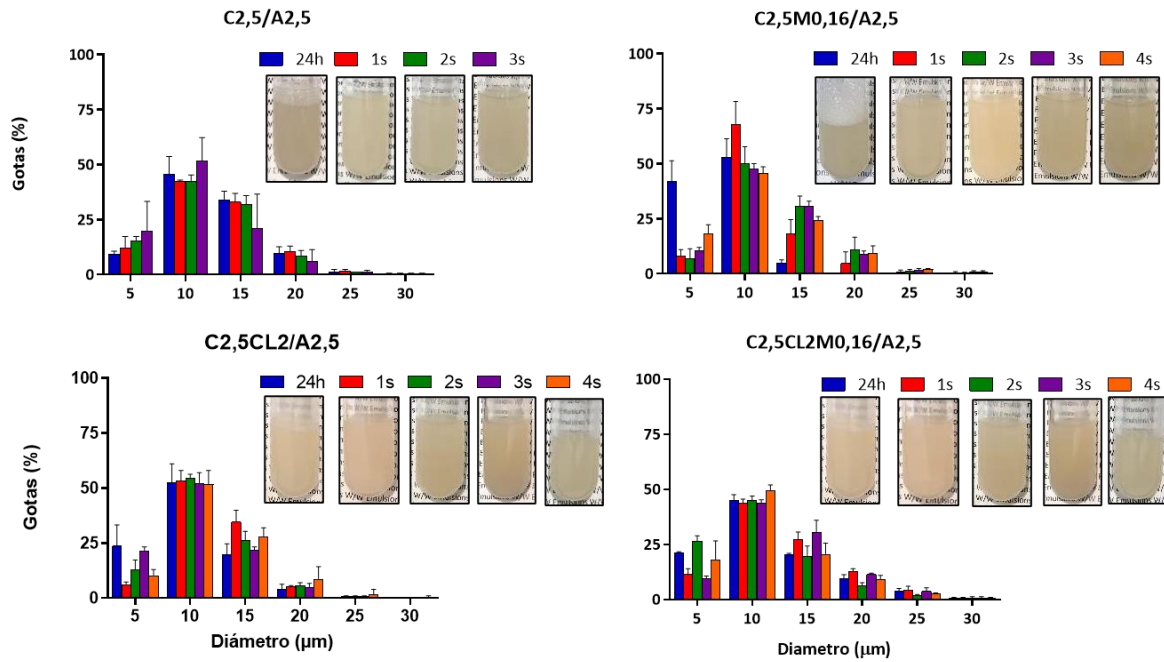


Figura 73. Aspecto macroscópico de las emulsiones C2,3/A2,5 con la incorporación de CL (C2,5CL2/A2,5), mucina (C2,5M0,16/A2,5) y mucina + CL (C2,5CL2M0,16/A2,5) y recuento de gotas en función del tiempo a partir de microfotografías durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm$ DE.

En relación a la estabilidad de un mes de duración, se decidió continuar el estudio por 6 meses. Donde se observó que las emulsiones que presentaban mucina fueron estables durante este período de tiempo, sin embargo, la emulsión C2,5M0,16/A2,5 comenzó a separarse macroscópicamente (**Figura 74**). Este estudio demuestra que la mucina estabiliza la emulsión al menos por 6 meses.

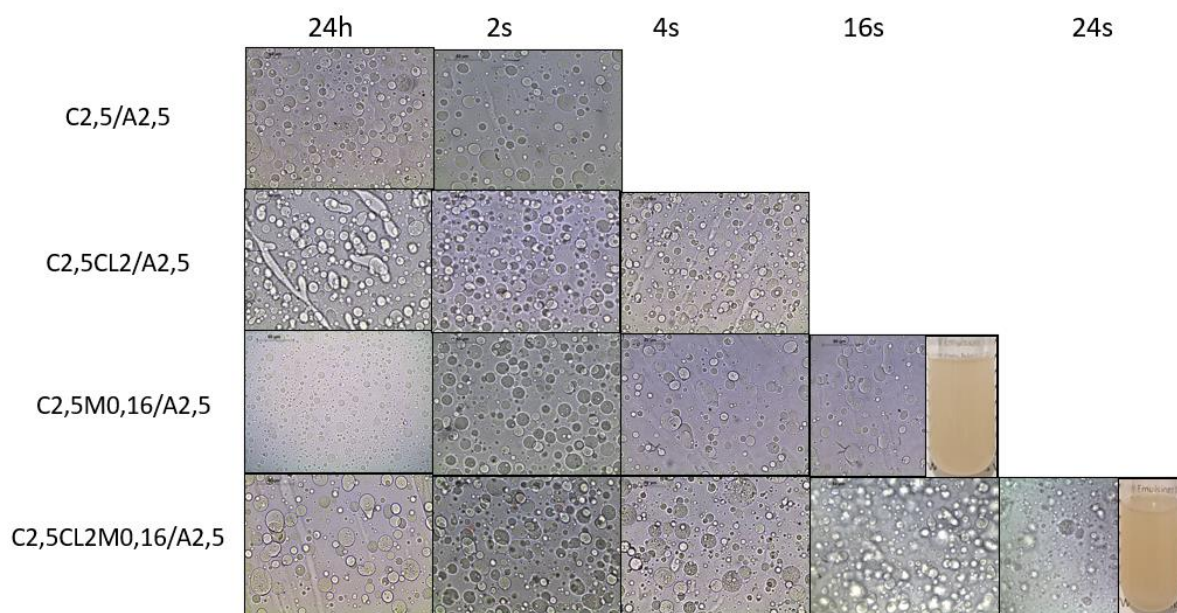


Figura 74. Microfotografías de emulsiones C2,3/A2,5 con la incorporación de CL (C2,5CL2/A2,5), mucina (C2,5M0,16/A2,5) y mucina + CL (C2,5CL2M0,16/A2,5) durante 4 meses, los tubos de emulsión son de las 16 y 24 semanas de las emulsiones con mucina.

En relación a los estudios reológicos (**Figura 75** y **Tabla 14**), las emulsiones presentaron una viscosidad similar sin variaciones a las primeras semanas. En cambio, a las 4 semanas para las emulsiones sin mucina, tanto para las que incorporaban CL como las que no, su viscosidad disminuyó entre un 50 a 25 % aproximadamente. Sin embargo, las emulsiones que contenían mucina, su viscosidad fue aumentando en el tiempo, siendo el cambio más notorio la emulsión C2,5CL2M0,16CL2/A2,5 a las 24 semanas (**Figura 75D**). En relación a las medidas oscilatorias, es necesario indicar, que las medidas obtenidas a 48 horas pueden dar medidas erróneas debido a que aún presentan burbujas.

En relación a las medidas oscilatorias, los resultados muestran que las emulsiones presentaban una cierta estabilidad a la hora de compararlas con el control (C2,5/A2,5), debido a que en el tiempo disminuían ambos módulos, sin embargo, las demás emulsiones fueron estables, donde siempre predominaba el módulo viscoso (G'') sobre el elástico (G'). Además, las emulsiones que contenían mucina, la diferencia entre los módulos eran menor, lo que daría cuenta del aumento de viscosidad observado.

Tabla 14. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato (C2,5/A2,5) con la incorporación de clindamicina (CL) y la adición de mucina (M) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	C2,5/A2,5 48h	C2,5/A2,5 3s	$\Delta\eta$ (%)	A2,5M0,16/A2,5 48h	A2,5M0,16/A2,5 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	6,323	3,075	-51,368	3,268	4,823	47,583
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	6,238	3,040	-51,266	3,266	4,772	46,111
	C2,5CL2/A2,5 48h	C2,5CL2/A2,5 4s	$\Delta\eta$ (%)	C2,5CL2M0,16/A2,5 48h	C2,5CL2M0,16/A2,5 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	5,797	4,317	-25,530	5,675	13,920	145,286
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	5,809	4,284	-26,252	5,689	10,150	78,414

Estos resultados indican que emulsiones que contenían mucina, presentaban un aumento de viscosidad y una relación menor entre comportamiento sólido y líquido. Esto se puede deber a que se ha descrito que la mucina es una molécula capaz de captar moléculas de agua [Bansil y cols., 1995]. La mucina en solución se puede reticular formando agregados a través de puentes de hidrógenos, interacciones electrostáticas e hidrófobas, así como también fuerzas débiles de Vander Waals. Estas interacciones entre las cadenas lineales de la mucina, formados por dos bloques unidos covalentemente, tienden a asociarse en medio acuoso excluyendo el disolvente [Bansil y cols., 1995] [Schipper y cols., 2007].

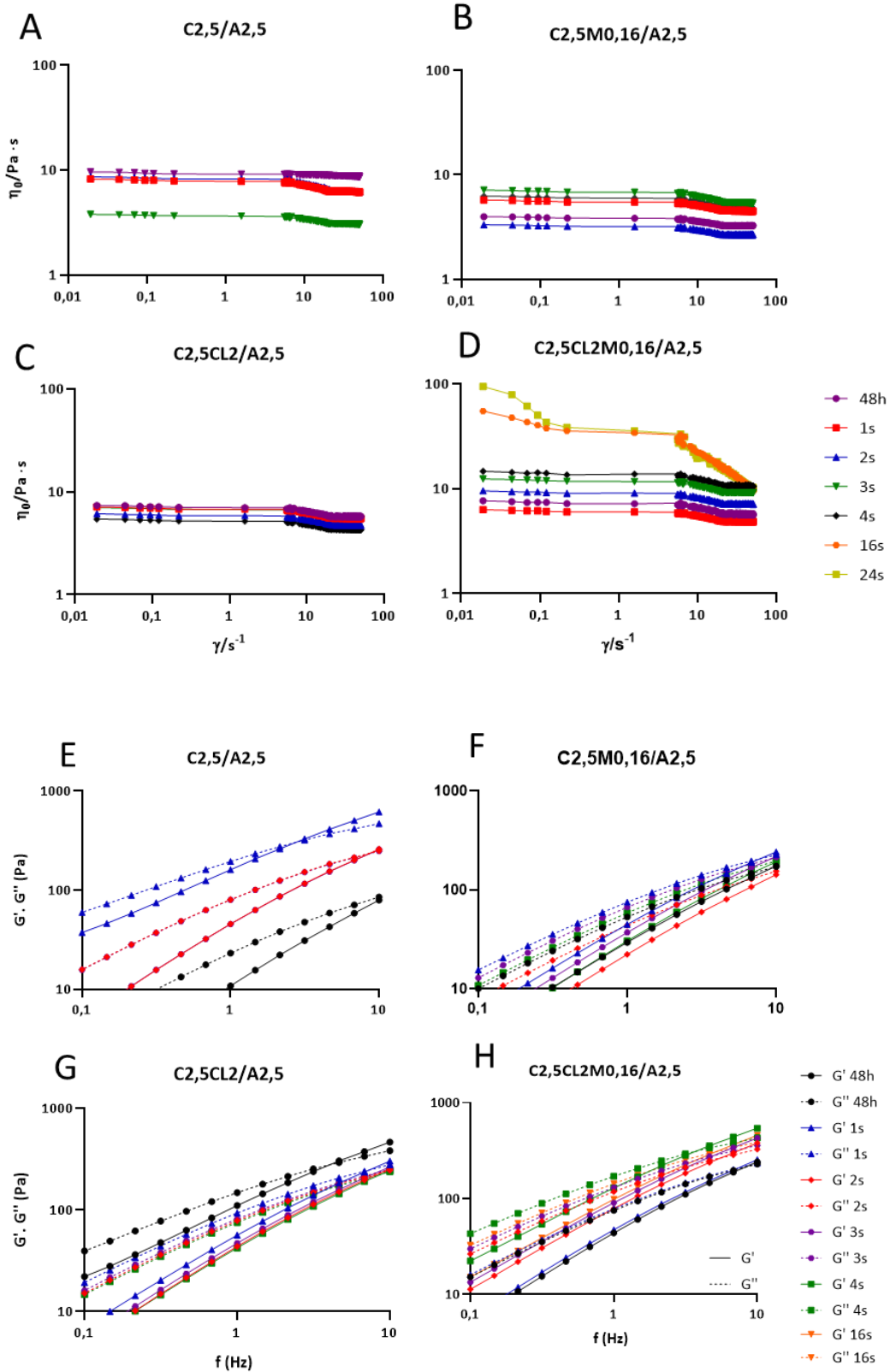


Figura 75. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C2,5/A2,5, (B) C2,5M0,16/A2,5, (C) C2,5CL2/A2,5 y (D) C2,5CL2M0,16/A2,5. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (E) C2,5/A2,5, (F) C2,5M0,16/A2,5, (G) C2,5CL2/A2,5 y (H) C2,5CL2M0,16/A2,5.

4.2.4 Estudios de liberación

El objetivo del estudio ha sido determinar el comportamiento de las emulsiones W/W como sistemas de liberación de fármacos. Numerosos estudios se han realizado con emulsiones convencionales (O/W o W/O) [Marti-Mestres & Nielloud, 2002] y también con emulsiones múltiples [Yaqoob y cols, 2006], para vehicular principios activos. Las emulsiones se han utilizado como reservorio para retardar o controlar la liberación de fármacos incorporados en las gotas de emulsión en función de cómo éstos se reparten entre las fases acuosa y oleosa. Sin embargo, en las emulsiones W/W, dado que la solubilidad del principio activo en la fase interna y externa es similar, el reparto entre ambas fases dependerá de otros factores, como la viscosidad de cada fase, que facilitarán o no la difusión desde éste entre las fases

4.2.4.1 Estudios preliminares de cesión

Los estudios se iniciaran utilizando dos sistemas distintos para incorporar la formulación a estudiar: bolsas de diálisis y células de inmersión a fin de dilucidar el método o-óptimo para los estudios de liberación. Las bolsas de diálisis tienen la dificultad de tener una baja reproducibilidad [Chaibva & Walker, 2007] debido a que hay pequeñas diferencias en los cortes del tubos de diálisis (afectará al área de contacto con la solución receptora) y a que a veces se pierde algo de muestra por los extremos donde se suelen usar pinzas o amarres. En comparación, las celdas de difusión son dispositivos pensados para muestras con una cierta viscosidad, y la ventaja que tiene es que el área de contacto es fija [Chapter, 2018], por lo que su reproducibilidad es mayor.

Se ha utilizado una solución de CL al 2% p/p en PBS; la concentración se ha fijado de acuerdo con las formulaciones comerciales (2%). Como solución receptora se utilizó PBS a 37 °C. Los resultados se presentan en la **Figura 76**, donde se observa que la cesión de CL a partir de bolsa de diálisis (CL2 bolsa), produce una cesión más rápida en comparación con la célula

de inmersión (CL2 inmersión). También se puede observar una mayor variabilidad en los datos, especialmente en los primeros tiempos, cuando se usa la bolsa de diálisis.

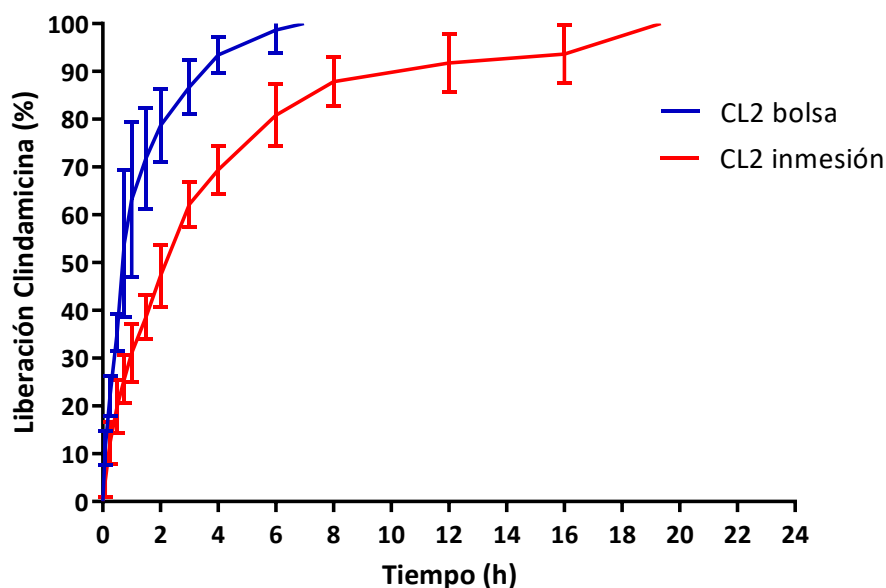


Figura 76. Porcentaje de hidrocóloro de CL cedido a 25 °C en PBS, a partir de la bolsa de diálisis (CL2 bolsa) en comparación la célula de inmersión (CL2 inmersión). Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

Se ha estudiado la cesión de CL a partir de caseinato en células de inmersión a dos diferentes agitaciones 25 y 250 rpm. En la **Figura 77** se muestran los resultados obtenidos, donde se observa que no existe una diferencia en la velocidad de liberación al aumentar la velocidad de agitación entre las diferentes soluciones utilizadas (C2,5CL2 y C1,25CL2), por lo que no es un factor relevante. Sin embargo, para los estudios de cesión presentados en esta tesis se consideró trabajar a 25 rpm, con la finalidad de no generar un efecto de alta cizalla a una alta agitación, debido a que las emulsiones W/W están compuestas por más de un 90% de agua.

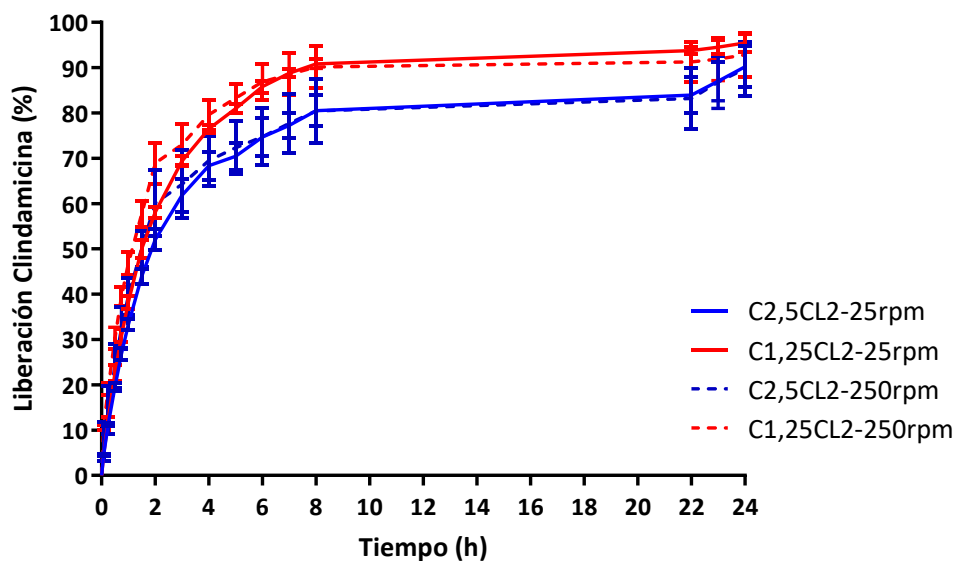


Figura 77. Porcentajes de hidrocloreto de CL cedidos a 25 °C en PBS en células de inmersión de las soluciones C2,5CL2 y C1,25CL2. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

De acuerdo a estos resultados preliminares, se fijaran las condiciones de los ensayos de liberación de los principios activos a partir de las formulaciones desarrolladas: la celda de inmersión como dispositivo para incorporar las formulaciones, de agitación 25 rpm con tal de no tener una fuerza de cizalla que afecte a la muestra, y concentración de CL del 2% p/p.

4.2.4.2 Hidrocloreto de Clindamicina

Para investigar la cesión de CL a partir de las emulsiones del sistema alginato-caseinato, se seleccionó un principio activo soluble en agua, el clorhidrato de CL y dos emulsiones W/W constituidas por alginato y caseinato en PBS. En una de las emulsiones, el alginato era la fase interna (A0,25C13,75), y en la otra emulsión, el caseinato era la fase interna (C1,25/A2,75). Se incorporó un 2% de CL y se obtuvieron las emulsiones denominadas A0,25CL2/C13,75 y C1,25CL2/A2,75. Se realizó el estudio de liberación de CL en PBS a 37°C, bajo agitación de 25 rpm, cumpliendo condiciones sink.

Los resultados obtenidos se compararon con los de una solución de CL en PBS (CL2) y también con los de una solución de CL en alginato (A0,25CL2) y una solución de CL en caseinato (C1,25CL2), a la misma concentración del 2%. Estas soluciones resultaron muy fluidas (fluido newtoniano) (**Figura 60**), como se observó en los estudios reológicos. La cesión de CL a partir de las emulsiones (A0,25CL2/C13,75 y C1,25CL2/A2,75) fue más lenta frente a las soluciones en PBS y en cada uno de los polímeros.

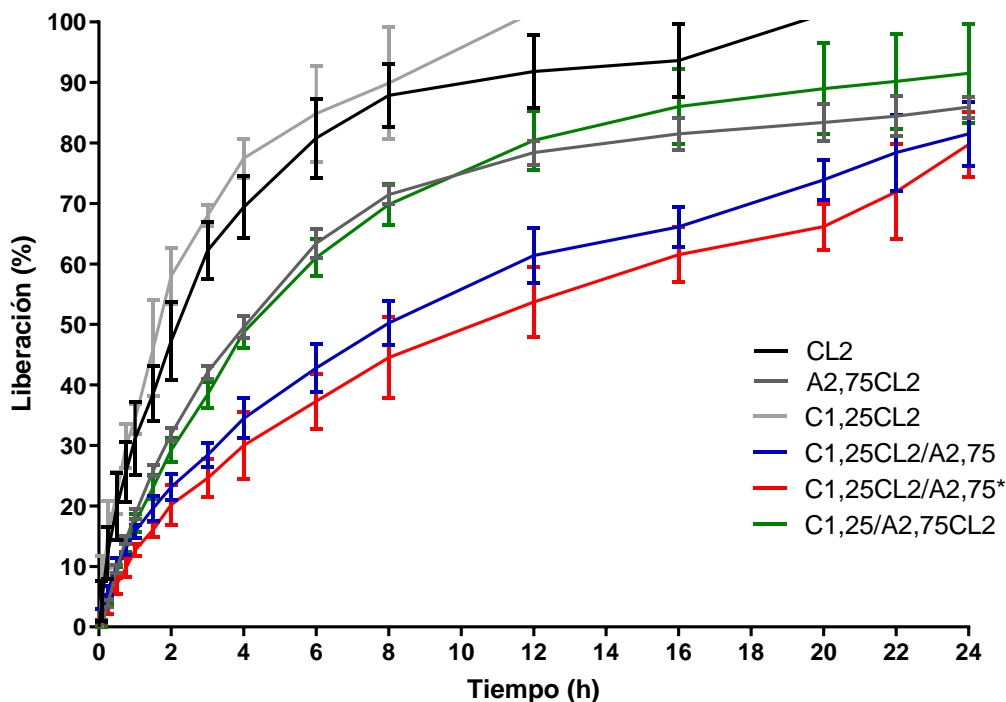


Figura 78. Porcentajes de hidrocóloro de CL cedidos a través de la membrana de diálisis (célula de inmersión) de las emulsiones caseinato en alginato en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * Indica cambio en el orden de incorporación.

A pesar de que las emulsiones tienen componentes acuosos y altamente hidrofílicos, no se comportan como una solución acuosa, el hecho de aumentar la viscosidad de la emulsión produce un enlentecimiento en la cesión. La viscosidad es la que dificulta la difusión del principio activo al PBS, y por lo tanto, al aumentar la viscosidad la cesión es más lenta.

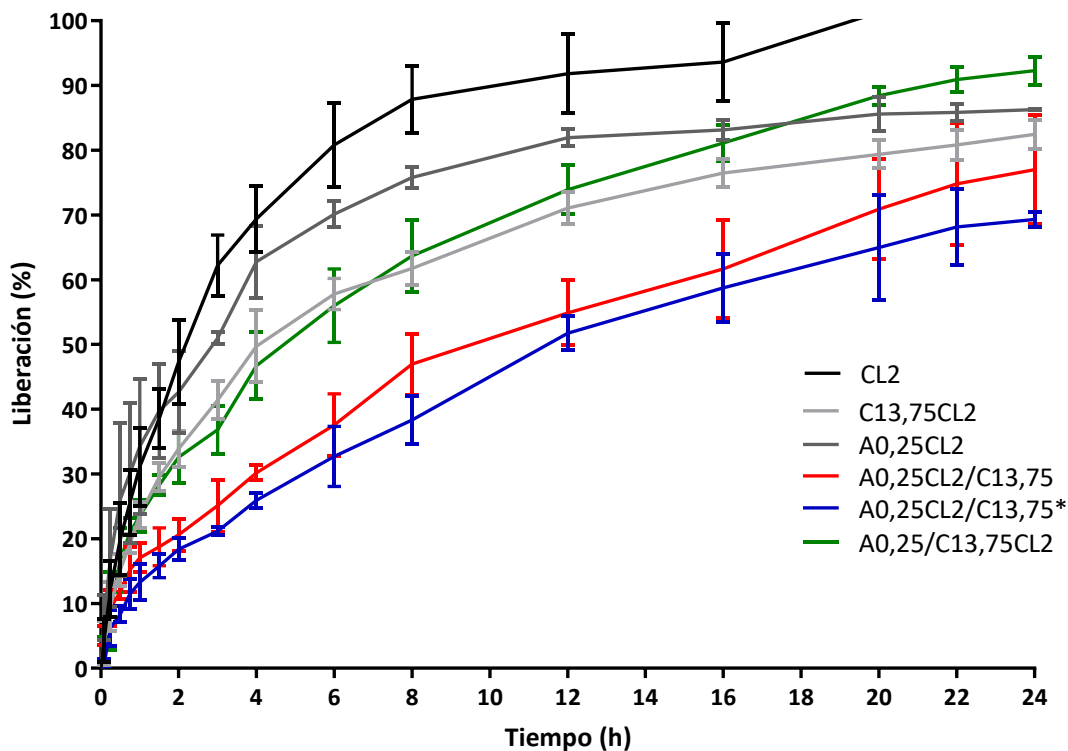


Figura 79. Porcentajes de hidrocóloro de CL cedidos a través de la membrana de diálisis (célula de inmersión) de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * Indica cambio en el orden de incorporación.

Otro factor que puede afectar en la cesión de principio activo, es el orden de incorporación de los polímeros para formar la emulsión. Es decir, al incorporar el alginato con CL al caseinato (A0,25CL2/C13,75*) o viceversa (A0,25CL2/C13,75), o caso contrario, incorporar el caseinato con CL al alginato (C1,25CL2/A2,75*) o viceversa (C1,25CL2/A2,75). Como se observa en la **Figura 78** y **Figura 79**, no existe una gran diferencia en la cesión entre las distintas emulsiones al cambiar el orden de incorporación. Estas emulsiones son preparadas con métodos de alta energía al aplicar una alta cizalla, los componentes se van mezclando hasta tener una mezcla lo más homogénea posible. Esto último, puede explicar los resultados obtenidos, a pesar de tener una alta viscosidad.

Dado que las fases de la emulsión W/W son hidrofílicas y el principio activo es soluble en ambas fases, resulta de interés conocer en qué fase queda incorporado el principio activo. Para ello se prepararon emulsiones, en la cual CL estaba en la fase externa (A0,25/C13,75CL2), y de caseinato en alginato (C1,25/A2,75CL2). Además, se prepararon soluciones poliméricas

con CL, a la misma concentración de la fase externa (C13,75CL2 y 2,75CL2). Los resultados obtenidos (**Figura 78** y **Figura 79**) muestran que cuando la CL estaba en la fase externa presentaba una liberación más rápida que cuando estaba en la fase interna. Además, al comparar dicha cesión con las correspondientes soluciones poliméricas C13,75CL2 y A2,75CL2, ambas presentaban un comportamiento similar. Esto indica, que el orden de incorporación de las soluciones poliméricas (la que se encuentra en más volumen frente a la de menor) que forman la emulsión juega un rol importante en el comportamiento de la cesión. Es decir, en este caso al preparar los polímeros que serán la fase interna con CL, y luego aplicar cizalla, predominan fuerzas como la viscosidad que podrían no verse afectadas con la cizalla. A pesar de que el principio activo sea soluble en ambas fases, el comportamiento será determinado en el polímero donde se incorpore y que forme la fase interna o externa.

Cabe destacar que estos son los primeros estudios de la liberación de un fármaco a partir de una emulsión W/W y que aún se desconocen los mecanismos implicados. Para comprender mejor el proceso de liberación de este nuevo tipo de formas farmacéuticas, pretendimos modelizar matemáticamente los perfiles de liberación. De acuerdo con los resultados de la **Tabla 15**, en el sistema A0,25/C13,75, la liberación de la CL es más rápida ($p < 0,05$) cuando ésta, está localizada en la fase externa. Este hecho resulta coherente debido a la mayor accesibilidad de la CL con el medio de disolución. De acuerdo con el exponente difusional de la función de Korsmeyer-Peppas obtenido ($n \sim 0,5$), el mecanismo de liberación implicado es la difusión [Costa & Lobo, 2001]. Estos resultados están de acuerdo con los expuestos en la **Tabla 16**, en la que se resumen los resultados de cesión obtenidos a partir de una solución de CL en PBS y a partir de las distintas soluciones poliméricas a la misma concentración de principio activo. Considerando la liberación de la CL a partir de la fase C13,75CL2, dado que, en cualquier caso, la CL debe difundir a través de la misma, ésta sigue un mecanismo de difusión ficsiano acorde con el valor de beta de la función de Weibull obtenido ($\beta = 0,6 \pm 0,02$). El estudio realizado por [Papadopoulou y cols., 2006] demostró que el valor de beta de la función de Weibull está linealmente relacionado con el exponente difusional n de la función de Korsmeyer-Peppas, y en este sentido, valores de beta inferiores a 0,75 indicarían una liberación de acuerdo con la difusión ficsiana.

Tabla 15. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W según la localización del principio activo (fase interna o externa) para los sistemas C1.25/A2.75 y A0.25/C13.75: parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).

Modelos cinéticos de cesión		Emulsiones			
		C1,25CL2/A2,75	C1,25/A2,75CL2	A0,25CL2/C13,75	A0,25/C13,75CL2
Orden 1	k1	0,083 \pm 0,012	0,151 \pm 0,019	0,071 \pm 0,011	0,141 \pm 0,011
	R*	0,9947 \pm 0,0006	0,9963 \pm 0,0027	0,9965 \pm 0,0007	0,9918 \pm 0,0028
	AIC	102,91 \pm 1,01	84,24 \pm 27,25	106,32 \pm 0,49	109,62 \pm 6,73
Weibull	α	6,37 \pm 0,62	5,17 \pm 0,77	6,58 \pm 0,54	4,12 \pm 0,25
	β	0,72 \pm 0,01	0,84 \pm 0,13	0,69 \pm 0,02	0,70 \pm 0,05
	R*	0,9984 \pm 0,0010	0,9976 \pm 0,0017	0,9948 \pm 0,0018	0,9934 \pm 0,003
	AIC	56,71 \pm 16,46	71,60 \pm 14,56	78,03 \pm 7,60	86,82 \pm 6,54
Higuchi	k _H	17,20 \pm 1,38	22,05 \pm 1,28	15,65 \pm 1,24	22,52 \pm 0,53
	R*	0,9995 \pm 0,0003	0,9973 \pm 0,0009	0,9962 \pm 0,0007	0,9261 \pm 0,0045
	AIC	46,14 \pm 2,97	57,92 \pm 1,33	46,53 \pm 3,25	53,15 \pm 2,61
Kors-PP**	k _{KP}	15,45 \pm 1,38	16,96 \pm 1,39	15,82 ^b \pm 1,45	22,44 ^b \pm 2,60
	n	0,56 ^a \pm 0,005	0,73 ^a \pm 0,026	0,50 \pm 0,006	0,51 \pm 0,12
	R*	0,9988 \pm 0,0010	0,9977 \pm 0,0005	0,9961 \pm 0,0007	0,9883 \pm 0,0032
	AIC	29,05 \pm 10,65	33,59 \pm 2,40	48,33 \pm 3,07	49,31 \pm 3,92

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas; a,b: diferencias entre grupos (p<0,05) para un mismo sistema. (test Kruskal-Wallis one-way ANOVA)

En cuanto al sistema C1,25/A2,75 (**Tabla 15**) y de acuerdo con el valor del AIC, el mejor modelo que ajustó los datos de liberación de la CL fue el modelo de Korsmeyer-Peppas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la velocidad de liberación (k_{KP} =15,45 \pm 1,38 n^{-0,56} vs. 16,96 \pm 1,39 n^{-0,73} para C1,25CL2/A2,75 y C1,25/A2,75CL2, respectivamente). En este caso, aunque la CL esté en la fase externa, al presentar esta fase una viscosidad muy superior a la de la fase interna (**Figura 80**), se enlentece la difusión de la CL hacia el medio de disolución. Por tanto, en este caso, la viscosidad es el factor limitante de la liberación de CL, y no la localización del principio activo lo que ha condicionado la velocidad

de liberación a partir de estas emulsiones W/W. Por tanto, en este sistema, el mecanismo de liberación viene determinado por la fase A2,75, y los valores del exponente difusional n estuvieron comprendidos entre 0,5-1; concretamente se obtuvieron los valores medios y desviación estándar de $0,56 \pm 0,005$, y $0,73 \pm 0,026$ para C1,25CL2/A2,75 y C1,25/A2,75CL2, respectivamente (**Tabla 15**). De acuerdo con estos valores, el mecanismo implicado es el transporte anómalo, en el que estarían implicados un proceso de difusión y uno de degradación, en similar magnitud. Mao y cols, 2012 describieron que el mecanismo principal de degradación del polímero de alginato es por rotura de los enlaces glicosídicos dando lugar a fragmentos de menor peso molecular. Si atendemos a la liberación de CL a partir de la solución polimérica A2,75CL2 que es la fase de mayor viscosidad de este sistema, el valor de beta de la función de Weibull está muy cercana al valor del límite de 0,75 ($0,74 \pm 0,03$) (**Tabla 16**), a partir del cual el mecanismo se explica por un transporte anómalo. Probablemente, la adición de más replicados en el ensayo confirmaría este hecho.

Tabla 16. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de soluciones poliméricas de alginato (A) y caseinato (C) a dos concentraciones. Parámetros del modelo y criterios de selección del mismo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=3-4).

Modelos cinéticos de cesión		Soluciones poliméricas			
		C1,25CL2	C13,75CL2	A0,25CL2	A2,75CL2
Orden 1	k1	0,39 \pm 0,04	0,132 \pm 0,017	0,253 \pm 0,049	0,152 \pm 0,014
	R*	0,9772 \pm 0,017	0,9874 \pm 0,004	0,9911 \pm 0,005	0,9910 \pm 0,0036
	AIC	104,78 \pm 19,47	119,33 \pm 1,66	122,6 \pm 5,83	106,63 \pm 4,01
Weibull	α	2,34 \pm 0,36	3,67 \pm 0,42	2,44 ^a \pm 0,50	4,32 ^a \pm 0,11
	β	0,83 \pm 0,20	0,60 \pm 0,02	0,541 ^a \pm 0,071	0,74 ^a \pm 0,03
	R*	0,9791 \pm 0,013	0,9973 \pm 0,0004	0,9941 \pm 0,0014	0,9940 \pm 0,0016
	AIC	104,33 \pm 19,40	70,85 \pm 3,43	81,95 \pm 3,68	88,62 \pm 3,38
Higuchi	k _H	26,16 \pm 3,19	19,15 \pm 0,69	21,66 \pm 0,59	20,1 \pm 0,62
	R*	0,9402 \pm 0,038	0,9767 \pm 0,0033	0,9483 \pm 0,003	0,9659 \pm 0,0009
	AIC	119,48 \pm 17,40	108,71 \pm 4,61	128,35 \pm 6,07	113,28 \pm 0,88
Kors-PP**	k _{KP}	39,37 \pm 2,31	25,74 \pm 2,27	35,74 \pm 4,74	24,09 \pm 0,82
	n	0,34 \pm 0,03	0,39 \pm 0,021	0,305 \pm 0,043	0,43 \pm 0,003
	R*	0,9620 \pm 0,0293	0,9877 \pm 0,0016	0,9763 \pm 0,0026	0,9742 \pm 0,001
	AIC	105,89 \pm 16,68	95,06 \pm 3,05	104,31 \pm 4,10	111,89 \pm 0,99

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas.

a: diferencias entre grupos (p<0,05) para un mismo sistema. (test Kruskal-Wallis one-way ANOVA)

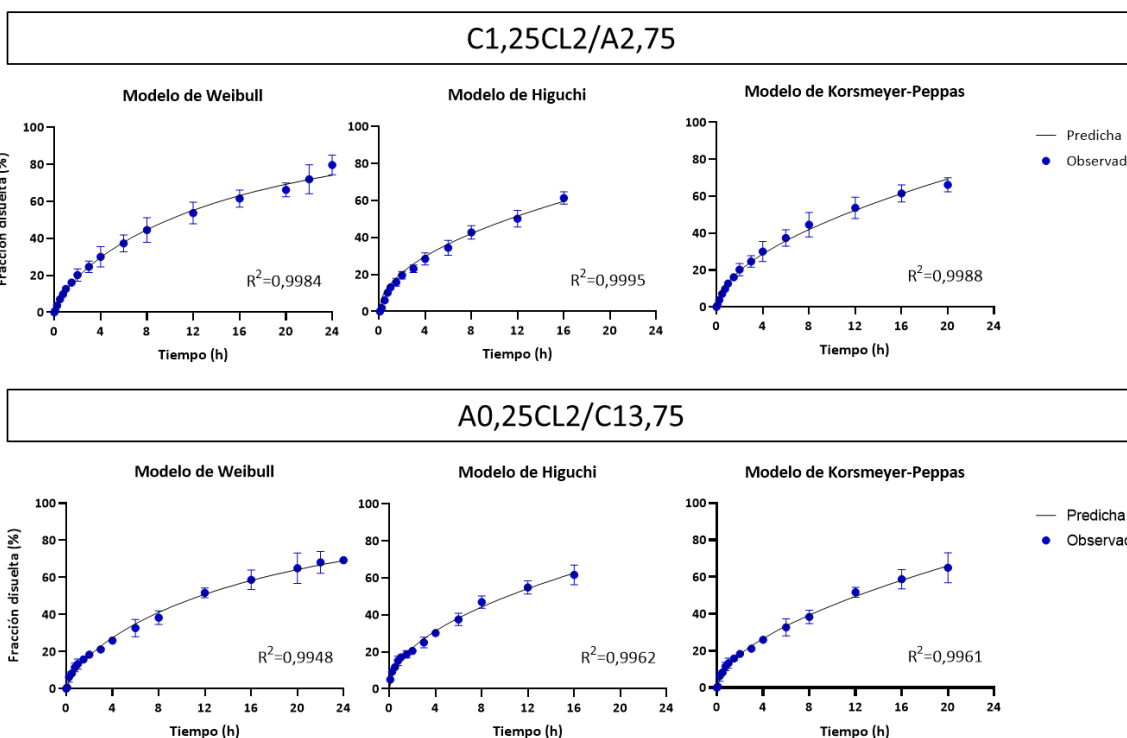


Figura 80. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.

Por otro lado, y de acuerdo con los valores de cesión obtenidos a partir de las soluciones acuosas y poliméricas de CL (**Tabla 16**) la cesión del principio activo a partir de C1,25CL2 y A0,25CL2 es similar al de la solución de CL en PBS, no habiéndose hallado diferencias estadísticamente significativas ni en alfa ni en el parámetro de forma, beta. Este hecho es coherente con la muy baja viscosidad que presentaron estas soluciones poliméricas (**Figura 60** y **Tabla 10**). Por otro lado, comparando las soluciones poliméricas de alginato de distinta concentración (A0,25CL2 y A2,75CL2) y que presentaron muy distinta viscosidad (A2,75CL2 > A0,25CL2), éstas dieron lugar a velocidades de liberación de CL distintas. En efecto, se obtuvo mayor velocidad de liberación a partir de A0,25CL2, con un valor de alfa estadísticamente inferior ($p < 0,05$) al de A2,75CL2 ($\alpha = 2,44 \pm 0,50$ vs. $4,34 \pm 0,11$, respectivamente). Este hecho podría explicarse por un menor empaquetamiento de las cadenas poliméricas en A0,25CL2 respecto a A2,75CL2 lo que proporcionaría una mayor área de contacto con medio de disolución facilitando la disolución/degradación del polímero y la cesión de la CL al medio PBS. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Mao y cols.,

2012 [Mao y cols., 2012] que pusieron de manifiesto una solubilidad del alginato concentración dependiente.

Emulsiones Pickering con mucina

Se ha estudiado la cesión de CL a partir del sistema alginato/caseinato incorporando mucina como agente estabilizante. Si bien, este componente se encuentra en una pequeña concentración, podría afectar a la cesión de un principio activo; además el aumento de viscosidad que produce la incorporación de mucina puede jugar un papel relevante en el proceso de cesión. Para este estudio, se prepararon emulsiones con CL (C2,5CL2/A2,5) y CL con mucina al 0,16% p/p (C2,5CL2M0,16/A2,5) y se estudió la cesión comparativa durante 24 horas en solución receptora PBS. Los resultados se compararon con soluciones de CL (CL2).

Los resultados muestran que no existen una gran diferencia en la cesión de CL entre los grupos estudiados (**Figura 81**). Se observa una cesión más lenta a partir de las 4 horas cuando se incorpora la mucina en el sistema.

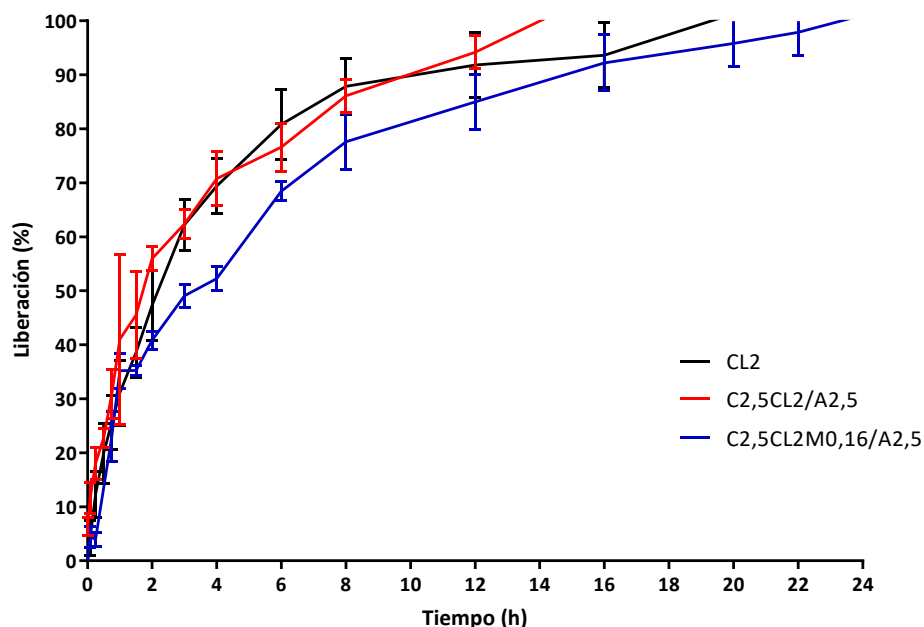


Figura 81. Porcentaje de hidrocóloro de CL cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37 °C con y sin la incorporación de mucina. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

En relación a la modelización matemática, se ha obtenido que el modelo que mejor ha ajustado en los dos casos, ha sido el modelo de Weibull y para la emulsión C2,5CL2/A2,5 el modelo de Korsmeyer-Peppas (**Tabla 17 y Figura 82**). DE acuerdo con los resultados obtenidos no existen diferencias significativas entre los valores de constante de Korsmeyer-Peppas (k_{KP}) y el exponente difusional (n). Los valores de n nos indican un transporte de tipo anómalo, para la formulación con y sin mucina ($0,61 \pm 0,02$ y $0,52 \pm 0,09$, respectivamente) [Costa & Lobo, 2001]. Estos datos nos indican que la fase externa de alginato debido a su viscosidad, que no se modifica en gran medida con el añadir mucina a las 24 horas de preparación, tiene el control de la cesión del principio activo.

Tabla 17. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de soluciones poliméricas de alginato (A) y caseinato (C), con la incorporación de mucina (M) como agente estabilizante. Parámetros del modelo y criterios de selección del mismo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar ($n=3-4$).

Modelos cinéticos de cesión		Solución			Emulsiones		
		CL2	C2,5CL2/A2,5	C2,5CL2M0,16/A2,5			
Orden 1	K1	0,32 \pm 0,07	-	-			
	R*	0,9915 \pm 0,0098	-	-			
	AIC	96,64 \pm 21,48	-	-			
Weibull	α	2,77 \pm 0,55	2,96 \pm 0,69	3,20 \pm 0,13			
	β	0,84 \pm 0,07	0,75 \pm 0,09	0,74 \pm 0,07			
	R*	0,9940 \pm 0,0084	0,9893 \pm 0,0079	0,9936 \pm 0,0017			
	AIC	82,01 \pm 29,06	95,49 \pm 14,83	86,57 \pm 7,55			
Higuchi	k_{H1}	-	24,94 \pm 1,33	27,34 \pm 0,64			
	R*	-	0,9665 \pm 0,0204	0,9642 \pm 0,0091			
	AIC	-	111,59 \pm 3,55	63,62 \pm 7,98			
Kors-PP**	k_{KP}	-	29,79 \pm 5,01	24,81 \pm 0,74			
	n	-	0,52 \pm 0,09	0,61 \pm 0,02			
	R*	-	0,9773 \pm 0,0207	0,9504 \pm 0,0088			
	AIC	-	62,63 \pm 10,49	63,10 \pm 1,29			

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas.

a: diferencias entre grupos ($p < 0,05$) para un mismo sistema. (test Kruskal-

Wallis one-way ANOVA)

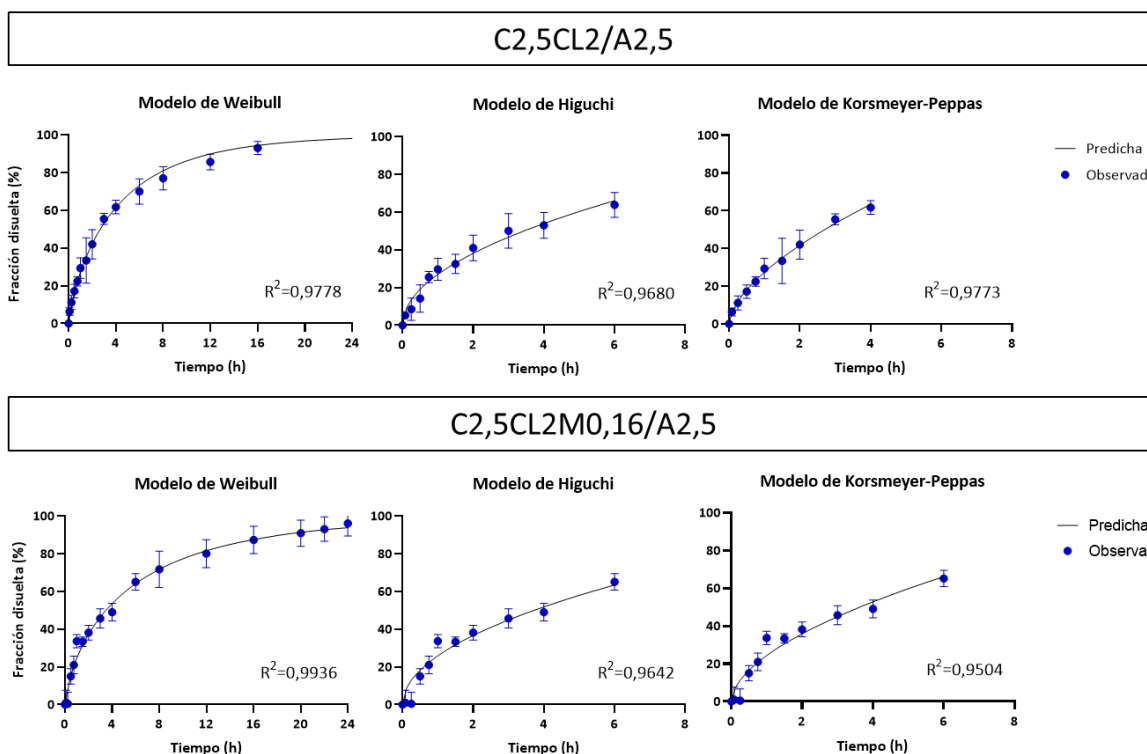


Figura 82. Porcentajes promedio de liberación observado en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.2.4.3 Hidrocloruro de Metformina

A fin de obtener mayor información sobre el sistema alginato-caseinato, se incorporó otro fármaco hidrosoluble, la MF al 2% p/p. La principal diferencia radica en el pKa que tiene este principio activo (pKa 12,4) en comparación con CL (pKa 7,45). Para este estudio se realizó la cesión de MF a partir de dos tipos de emulsiones, caseinato en alginato (C2MF2/A1,67 y C1MF2/A1,83) y alginato en caseinato (A0,17MF2/C11 y A0,33MF2/C10) a una solución de PBS manteniendo condiciones sink. La selección de estas formulaciones fue debida a la menor viscosidad que presentan en comparación con las utilizadas con CL.

Las emulsiones de fase interna caseinato (C2MF2/A1,67 y C1MF2/A1,83) no presentaron una diferencia cuando a las soluciones poliméricas con MF incorporada (C2MF2 y C1MF2), y en comparación con el control de solución de MF2 también (**Figura 83**). Para el caso de emulsiones de fase interna alginato (A0,17MF2/C11 y A0,33MF2/C10), donde las

soluciones poliméricas con MF y la solución de MF en PBS, no presentaron cambios, desde el inicio del ensayo hasta las 20 horas aproximadamente (**Figura 84**).

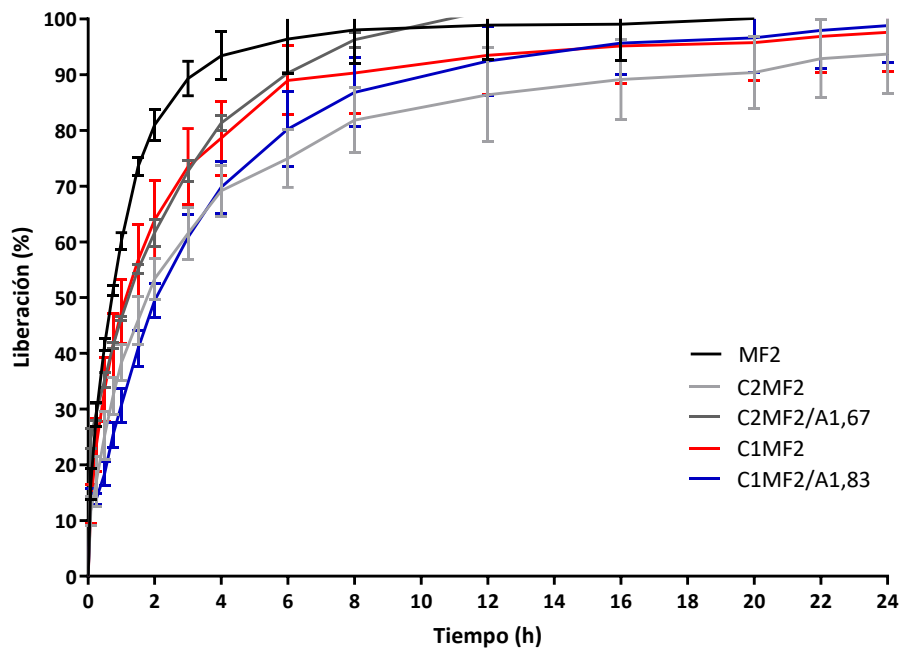


Figura 83. Porcentaje de hidrocóloro de MF cedido a través de la membrana de diálisis de las emulsiones caseinato en alginato en solución de PBS 7,4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

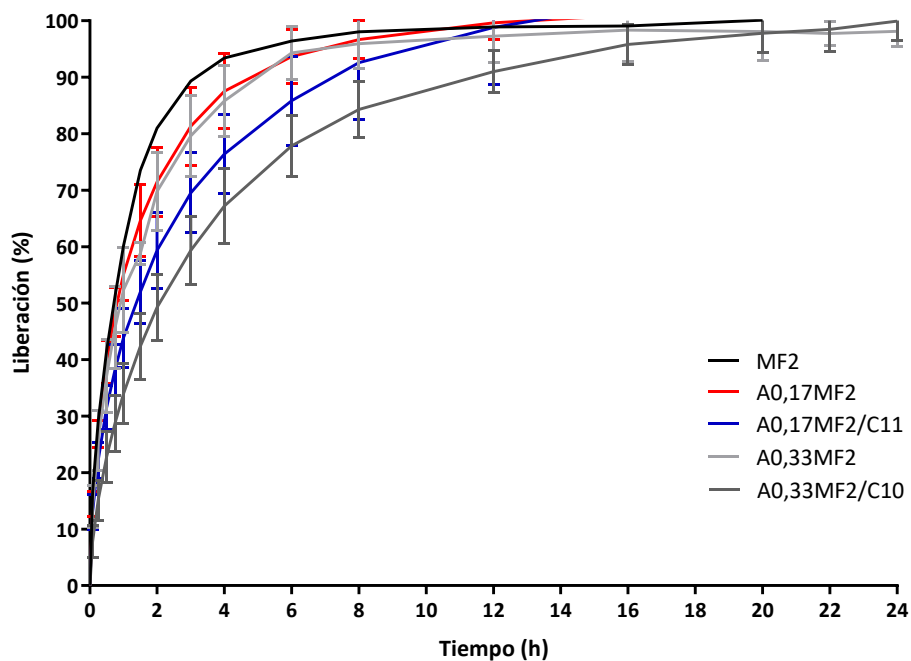


Figura 84. Porcentaje de hidrocóloro de MF cedido a través de la membrana de diálisis de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

Para entender mejor el comportamiento de la cesión de MF, se modelizaron matemáticamente los perfiles obtenidos (**Tabla 18** y **Figura 85**). En base al criterio de información de Akaike (AIC), para todas las formulaciones el mejor modelo que se ajusta el de Korsmeyer-Peppas, caso similar a lo obtenido en formulaciones con CL a pesar de estar conformadas por diferentes concentraciones poliméricas. La formulación C1MF2/A1,83, presenta una diferencia significativa en relación a la formulación C2MF2/A1,67, respecto a la constante de Korsmeyer-Peppas ($32,01 \pm 2,43 n^{-0,58}$ y $47,45 \pm 0,20 n^{-0,33}$, respectivamente), también para el exponente difusional (n), se obtiene una diferencia significativa de $0,58 \pm 0,02$ vs $0,33 \pm 0,04$. Esta última diferencia es importante ya que la formulación C1MF2/A1,83 presentaría un transporte anómalo en comparación a C2MF2/A1,67, que sería de tipo difusión ficsiana. Como se ha observado también para la CL, a una mayor concentración de la fase externa alginato, el principio activo se libera mediante un transporte anómalo (**Tabla 16**).

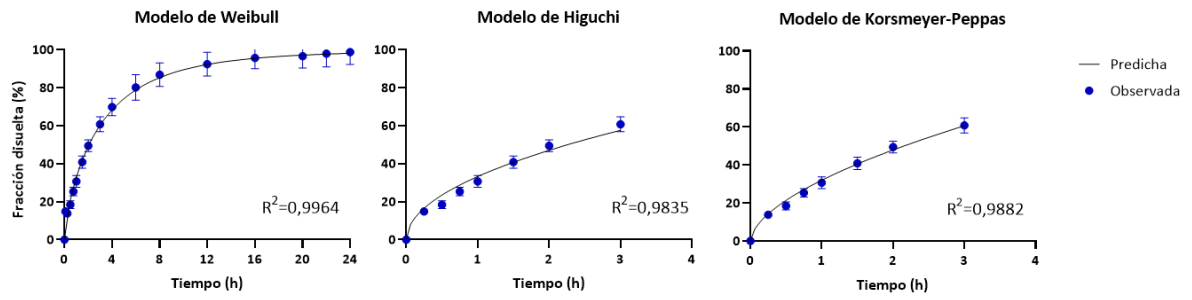
Para las formulaciones de fase externa caseinato A0,17MF2/C11 y A0,33MF2/C10, no se encontraron diferencias significativas entre los parámetros n y k_{KP} de Korsmeyer-Peppas (**Tabla 18**). Además y de modo similar a la incorporación con CL, cuando la fase externa es caseinato, el mecanismo de liberación es por difusión ficsiana ($n \sim 0,5$).

Tabla 18. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de MF observados, obtenidos a partir de una solución de MF en PBS (MF2) y de las emulsiones W/W para los sistemas C2MF2/A1,67 y C1MF2/A1,83; y A0,17MF2/C11 y A0,33MF2/C10. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).

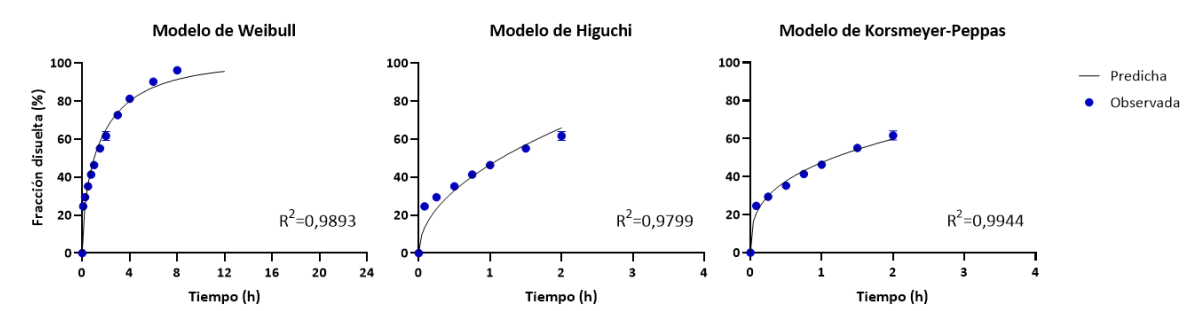
Modelos cinéticos de cesión		Solución		Emulsiones		
		MF2	C1MF2/A1,83	C2MF2/A1,67	A0,17MF2/C11	A0,33MF2/C10
Orden 1	K1	0,94 \pm 0,05	0,32 \pm 0,05	0,56 \pm 0,01	0,485 \pm 0,13	0,33 \pm 0,08
	R*	0,9950 \pm 0,0019	0,9962 \pm 0,0007	0,9796 \pm 0,0056	0,9835 \pm 0,0049	0,9950 \pm 0,0022
	AIC	63,06 \pm 6,76	105,36 \pm 9,45	122,22 \pm 3,90	122,21 \pm 0,9359	107,07 \pm 3,65
Weibull	α	1,05 \pm 0,06	2,52 \pm 0,16	1,45 \pm 0,01	1,174 \pm 0,29	2,45 \pm 0,46
	β	0,75 \pm 0,07	0,77 \pm 0,09	0,61 \pm 0,02	0,69 \pm 0,09	0,72 \pm 0,035
	R*	0,9976 \pm 0,0015	0,9964 \pm 0,0006	0,9893 \pm 0,0036	0,9936 \pm 0,0054	0,9994 \pm 0,0004
	AIC	45,74 \pm 7,67	90,37 \pm 1,63	75,49 \pm 5,08	91,94 \pm 43,27	51,50 \pm 24,38
Higuchi	k _H	-	33,28 \pm 2,35	46,63 \pm 0,28	43,02 \pm 5,05	33,90 \pm 4,15
	R*	-	0,9835 \pm 0,0065	0,9799 \pm 0,0081	0,9990 \pm 0,0054	0,9940 \pm 0,0003
	AIC	-	43,04 \pm 3,31	43,88 \pm 3,57	17,44 \pm 7,79	34,53 \pm 1,04
Kors-PP**	k _{KP}	-	32,01 ^a \pm 2,43	47,45 ^a \pm 0,20	43,21 \pm 5,18	33,38 \pm 5,23
	n	-	0,58 ^b \pm 0,02	0,33 ^b \pm 0,04	0,47 \pm 0,02	0,53 \pm 0,05
	R*	-	0,9882 \pm 0,0041	0,9944 \pm 0,0007	0,9996 \pm 0,0002	0,9989 \pm 0,0003
	AIC	-	42,28 \pm 2,97	31,12 \pm 1,94	9,85 \pm 4,08	26,74 \pm 1,52

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas; a,b: diferencias entre grupos (p<0,05) para un mismo sistema. (test Kruskal-Wallis one-way ANOVA).

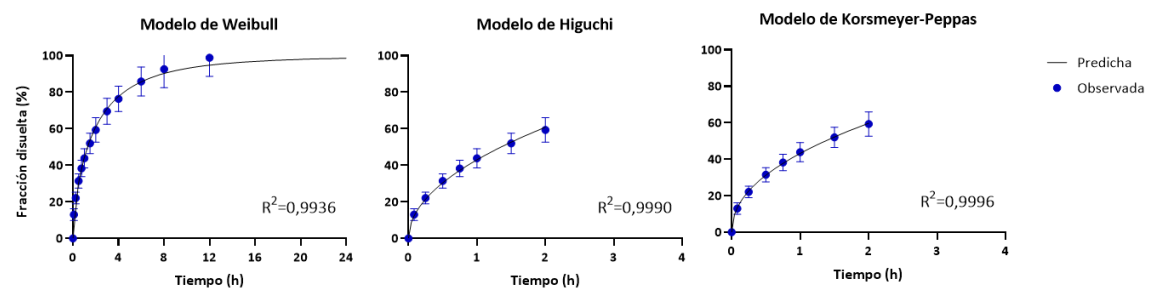
C1MF2/A1,83



C2MF2/A1,67



A0,17MF2/C11



A0,33MF2/C10

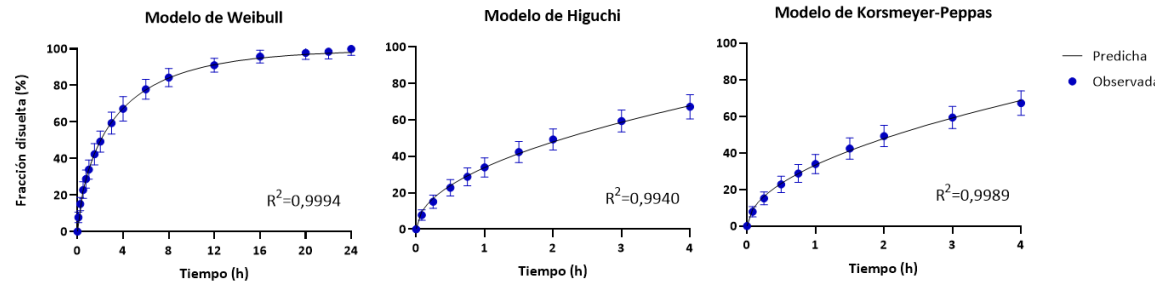


Figura 85. Porcentajes promedio de liberación observado en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los cuatro tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan desviación estándar.

La mayor velocidad de liberación observada para MF vs CL puede ser explicada por el pKa de MF de 12,4, mientras que CL de 7,45. A pH 7,4 la MF se encuentra más protonado que CL lo que lo hace que sea mucho más soluble a este pH.

4.2.5 Estudios de citotoxicidad

Las emulsiones W/W estudiadas han sido formadas con biopolímeros de origen natural y se les han adicionado principios activos, electrolitos y diversos excipientes con funciones específicas. Se ha estudiado la compatibilidad de las emulsiones W/W preparadas con cultivos celulares, evaluando la viabilidad de estas después de estar en contacto con las emulsiones.

Para el estudio de toxicidad se realizó el ensayo MTT en células HeLa Este ensayo colorimétrico determina la viabilidad celular por la actividad mitocondrial. Si la formulación no es tóxica y las células son viables, a partir del reactivo MTT se forman cristales de formazan, que disueltos en DMSO presentan una elevada absorbancia a 570 nm. En cambio, si hay muerte celular los cristales de formazan no se forman y la absorbancia es menor o cercana a cero.

Se prepararon las emulsiones C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75s que contenían CL con respecto a las que no la contenían. Después, las emulsiones fueron diluidas seriadamente para hacer los ensayos de toxicidad.

En la **Figura 86** se muestra en el eje de ordenadas la viabilidad celular en porcentaje y en el eje de abscisas las diferentes concentraciones de las emulsiones diluidas de manera creciente, es decir, de menor a mayor concentración. A título de ejemplo, la dilución $1 \cdot 10^{-4}$, significa que la emulsión fue diluida 0,0001 veces en medio de cultivo DMEM. Tal como se observa en la **Figura 86**, a medida que aumenta la concentración de las emulsiones se observa una disminución en la viabilidad celular cuando las emulsiones contenían CL, en las dos emulsiones estudiadas. En las emulsiones sin principio activo no se observó disminución de la viabilidad celular en ninguna de las emulsiones estudiadas.

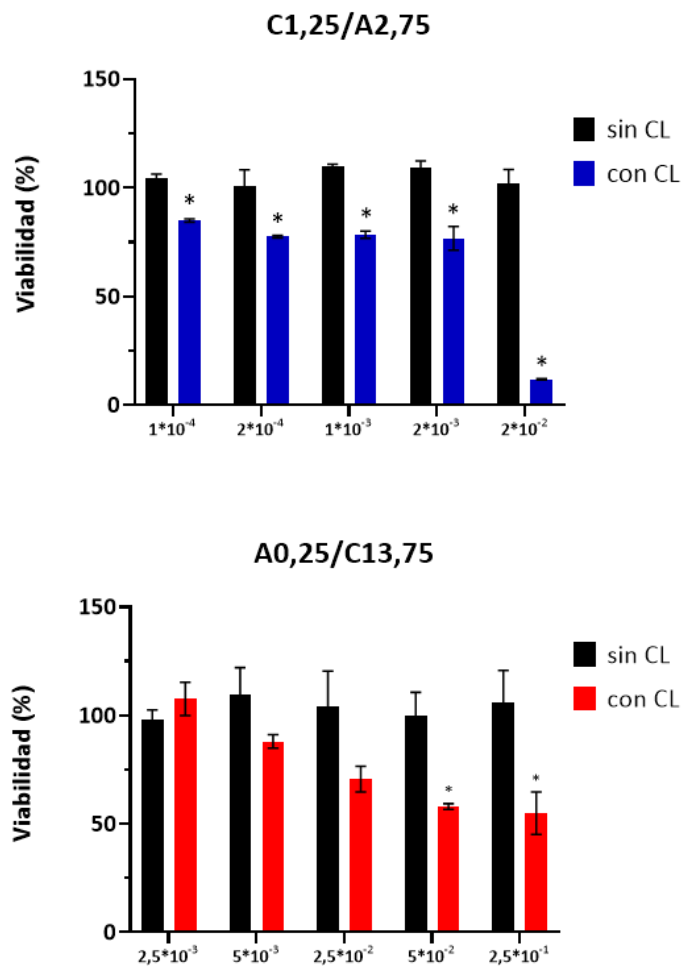


Figura 86. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes diluciones de las emulsiones, expresadas en concentración p/p . Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$.

Paralelamente a los estudios de viabilidad celular con diluciones de las emulsiones, se realizó un control de DMEM y DMEM en PBS, con y sin CL; es decir, en lugar de añadir diluciones de las emulsiones a los cultivos celulares, se añadió medio de cultivo solo y una solución de medio de cultivo en PBS. (**Figura 87**). Los resultados muestran que estos medios no afectan a la viabilidad celular.

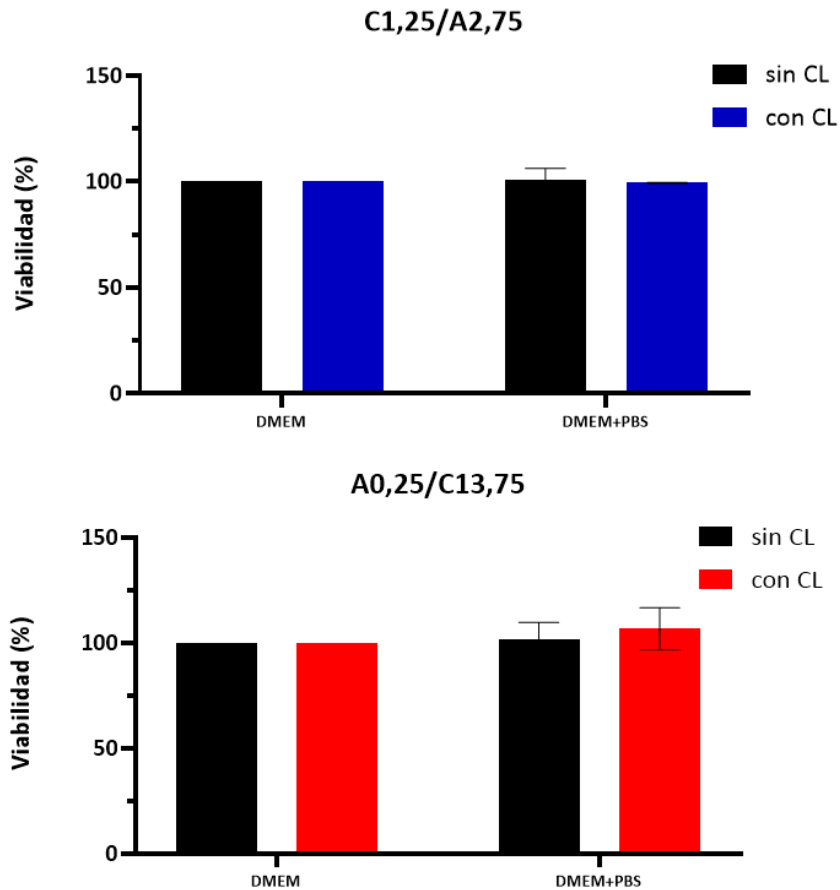


Figura 87 Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+ DMEM, como controles en el test MTT. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0,05$.

Emulsiones Pickering con Mucina

También se realizó un ensayo MTT en emulsiones que contenían mucina, con y sin CL. Los resultados indican que al aumentar la concentración de CL disminuye la viabilidad celular (**Figura 88**). Los controles de PBS no presentaron cambios.

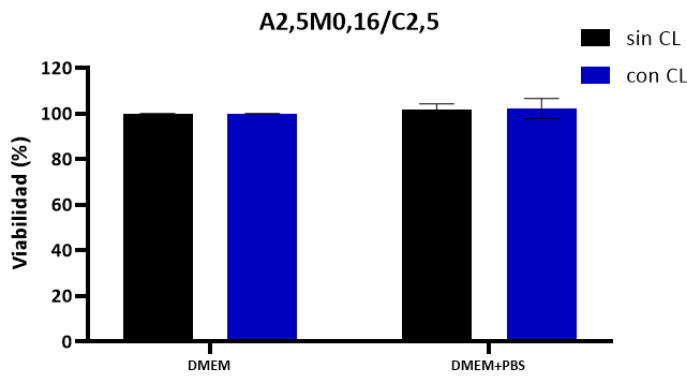
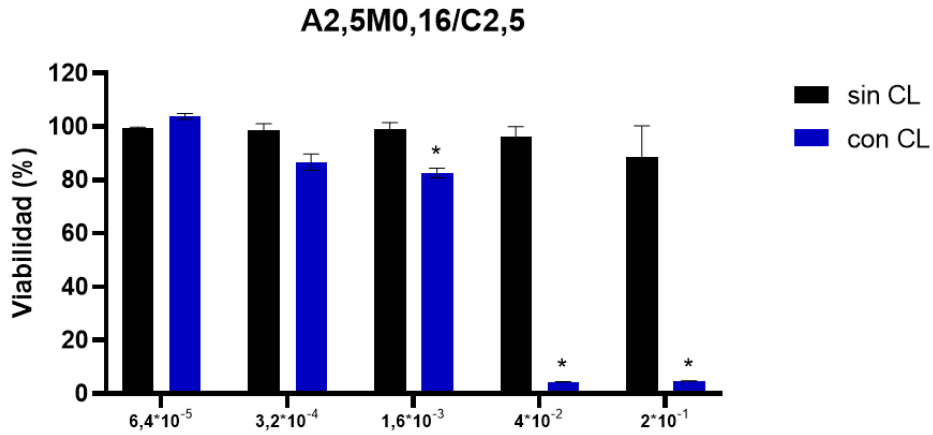


Figura 88. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p y controles con DMEM PBS+ DMEM. Los valores son medias de $n = 4 \pm$ DE. * $p \leq 0.05$.

Estos resultados nos indican que mucina no influye en la viabilidad de las células Hela a las concentraciones estudiadas; en cambio se produce un incremento en la toxicidad celular debido a concentraciones elevadas de CL, tal como se observó en los resultados mostrados en la **Figura 86**.

4.3 Sistema Alginato de sodio-Caseinato de sodio/etanol

Con la finalidad de incorporar un principio activo poco soluble en agua en las emulsiones W/W formadas en el sistema alginato de sodio/caseinato de sodio, se consideró la posibilidad de incorporar un pequeño porcentaje de etanol a dichas emulsiones. En estudios preliminares se comprobó la formación de emulsiones incorporando etanol en este

Se ha estudiado el diagrama de fases del sistema PBS:etOH 70:30/alginato de sodio/caseinato de sodio, se ha incorporado ML a emulsiones seleccionadas y se ha estudiado la cesión del mismo a una solución receptora.

4.3.1 Diagrama pseudobinario

Para comprender el efecto de etanol en el sistema alginato-caseinato, se prepararon mezclas binarias de soluciones concentrada de alginato en PBS pH 7,4 y solución concentrada de caseinato en una relación 70:30 PBS:etanol respectivamente, a 25 °C y se elaboró un diagrama de fases en no equilibrio. Posteriormente se observó la formación de gotas por microscopía óptica. Para estos estudios se prepararon soluciones concentradas de alginato 1,2 y 3% y de caseinato 5, 10 y 15%. Estas composiciones se seleccionaron de acuerdo al diagrama del sistema alginato-caseinato y de estudios anteriores sin la presencia de etanol [Capron y cols., 2001] [Maestro y cols., 2020]. El estudio se realizó durante 48 horas a 25 °C, posterior a esto las emulsiones se dejaron durante 1 mes para otros estudios.

Los resultados muestran que, igual que en el diagrama alginato-caseinato en PBS, a baja concentración polimérica existe una región monofásica líquida y a concentraciones superiores aparece una zona multifásica (**Figura 89**). Dentro de la región multifásica, se observan 3 tipos de estructuras: emulsiones de tipo caseinato en alginato (**Figura 89A**), alginato en caseinato (**Figura 89C**), y estructuras bicontinuas (**Figura 89B**).

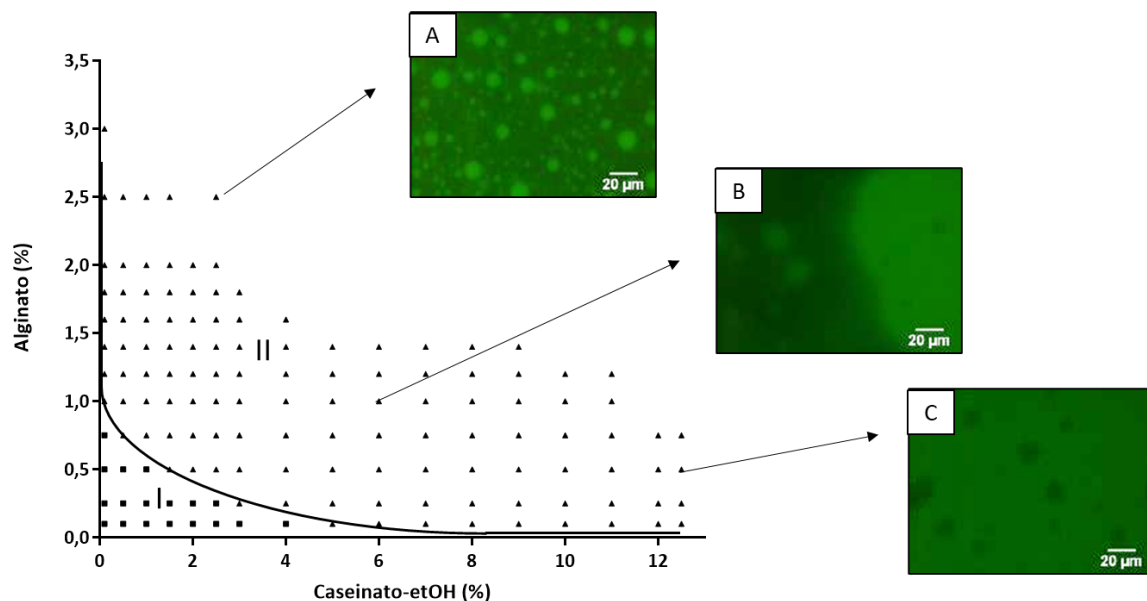


Figura 89. Diagrama de fases del alginato / caseinato en PBS: etanol 70:30, observado a 25 ° C después de 7 días. El diagrama de fase se puede dividir en dos regiones: (I) monofásica, (II) multifásica. Dependiendo de las concentraciones de los diferentes biopolímeros: (A) Ce2,5/A2,5; (B) A1/Ce6; (C) A0,5/Ce12,5. Estas micrografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseína marcada con FITC).

Al comparar el diagrama del sistema alginato-caseinato(etOH) (**Figura 89**) con el de alginato-caseinato (**Figura 54**), observamos que la incorporación de etanol no afecta significativamente al comportamiento fásico. Es decir, la línea binodal no se ve desplazada al agregar etanol a las mezclas poliméricas, y se siguen observando los mismos tipos de estructuras, A en C y C en A, con emulsiones bicontinuas.

Se seleccionaron emulsiones caseinato en alginato, a las que se les incorporó el principio activo lipófilo ML, se estudió su estabilidad durante un mes y la cesión del fármaco a una solución receptora.

4.3.2 Incorporación de melatonina

La ML es una hormona lipofílica de un pKa de 16,51 [SCCS, 2010] [Osol, 1975], la cual se ha incorporado en este tipo de emulsiones para estudiar su cesión a soluciones receptoras. Es necesario indicar que ML es sensible a la luz, por lo que todos los ensayos se realizaron en recipientes protegidos de la luz.

Para la preparación de emulsiones se prepararon las formulaciones que se muestran en la **Tabla 19**. Se han seleccionado emulsiones de caseinato en alginato y se ha incorporado ML a las soluciones concentradas de caseinato en PBS:etanol, por su mayor solubilidad, ya que las soluciones concentradas de alginato se prepararon en PBS, sin etanol

Tabla 19. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato con etanol (Ce) y alginato (A).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de caseinato en PBS:etOH (Ce) añadido	Peso de solución de alginato (A) añadido	Orden de adición de los componentes	Concentración final de etOH	Pruebas que se han utilizado
Ce2,25/A1,7	A	1*	5**	A sobre Ce	4,3%	Incorporación de ML/estabilidad NP
Ce1,5/A2,25	A	1'	5''	A sobre Ce	4,6%	Estabilidad

* Solución concentrada de caseinato en PBS:etOH 13,5%

** Solución concentrada de alginato 2%

' Solución concentrada de caseinato en PBS:etOH 9%

'' Solución concentrada de alginato 2,7%

ML Melatonina

NP Nanopartículas

Posteriormente, se incorporó ML en la solución concentrada de caseinato en PBS:etOH, para luego formar emulsión con la solución concentrada de alginato. La concentración final de ML fue del 1% en las siguientes emulsiones Ce2,25ML1/A1,7 y Ce1,5ML1/C2,25. Una vez preparadas las emulsiones se observaron macro y microscópicamente a las 24 horas de preparación (**Figura 90**). Los resultados muestran que ambas emulsiones presentaban gotas micrométricas y tenían un aspecto blanquecino macroscópicamente.

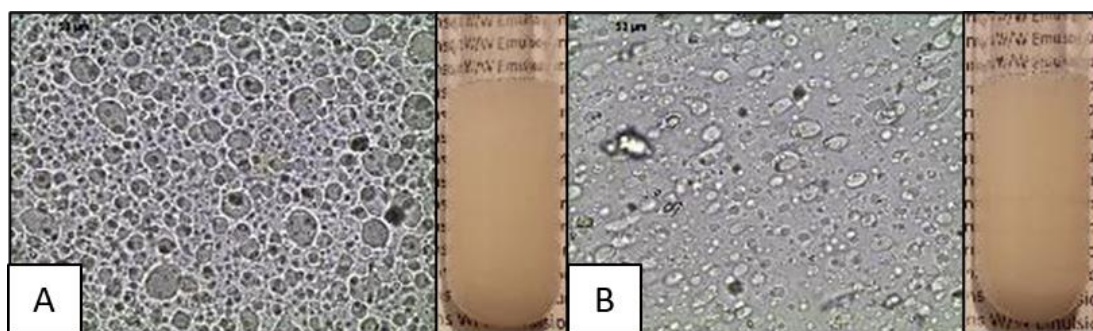


Figura 90. Micro (40x) y macrografía sistema alginato/caseinato en PBS:etOH con ML incorporada, 24 horas de su preparación. (A) Ce2,25ML1/A1,7; (B) Ce1,5ML1/A2,25.

Si bien la incorporación de ML ha sido factible en estas emulsiones, es necesario indicar que las gotas de estas emulsiones no son del todo esféricas en la formulación Ce1,5ML1/C2,25 (**Figura 90B**). Es por ello que se seleccionó la formulación Ce2,25ML1/A1,7 para los otros ensayos (**Figura 90A**). Este cambio en la morfología puede deberse a la insolubilización de ML por la baja proporción de etanol o a la formación de coacervatos.

Para estudiar la estabilidad de la formulación Ce2,25/A1,7, se han preparado dos emulsiones con y sin ML. Para ello se prepararon viales con emulsiones para un estudio de 4 meses, donde cada cuatro semanas se analizaron micro y macroscópicamente las emulsiones. Los resultados mostraron la estabilidad cinética de ambas emulsiones con y sin principio activo durante el período estudiado (**Figura 91**). En relación a la distribución de tamaño de gotas, la emulsión Ce2,25/A1,7 con y sin ML presentó un rango de diámetro medio de alrededor de 5 a 10 μm .

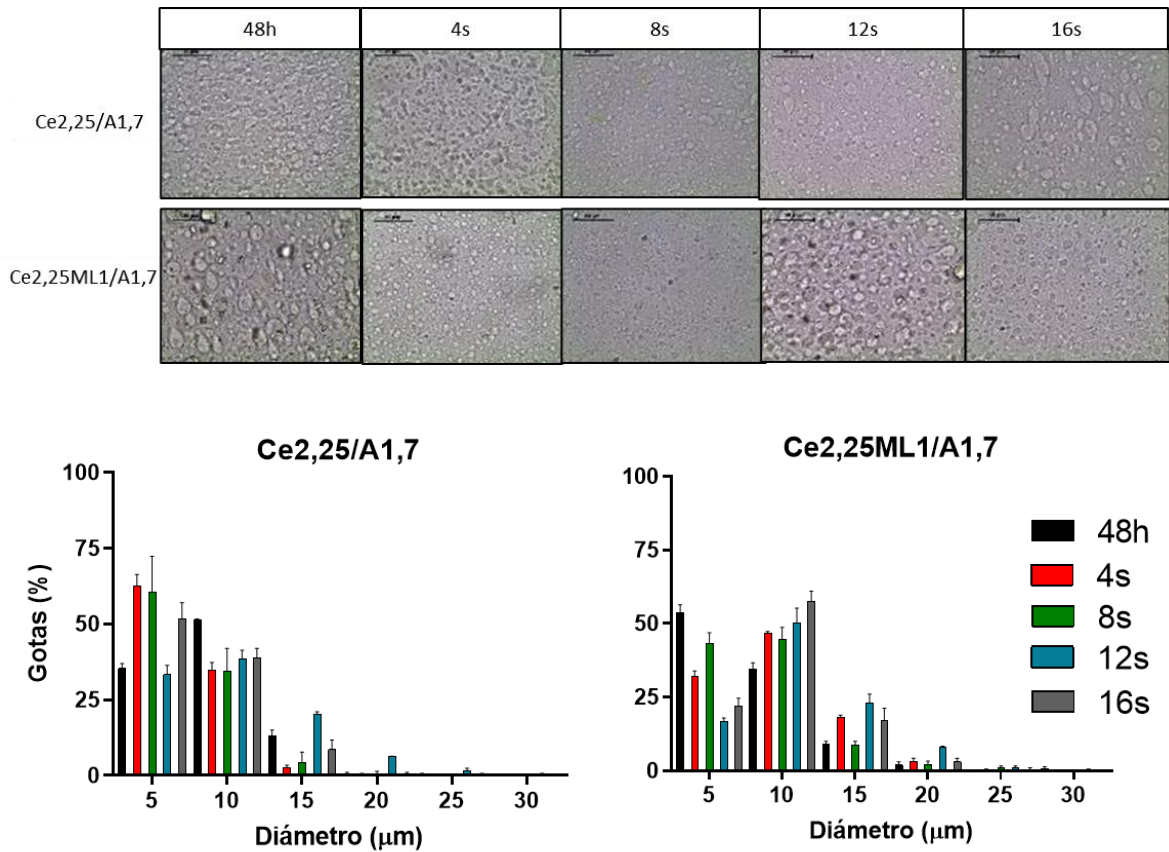


Figura 91. Recuento de gotas y microfotografías (40x) de formulaciones con y sin ML a 25 °C durante 16 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

Con respecto al estudio macroscópico, los viales no presentaron separación de fases durante las 16 semanas. Sin embargo, en el estudio microscópico (en más detalle se aprecia en la **Figura 92**), se aprecia deformación una pérdida de morfología de las gotas en emulsiones con ML y sin ella a las 16 semanas, lo que probablemente esté relacionado de cuenta de la desestabilización del sistema.

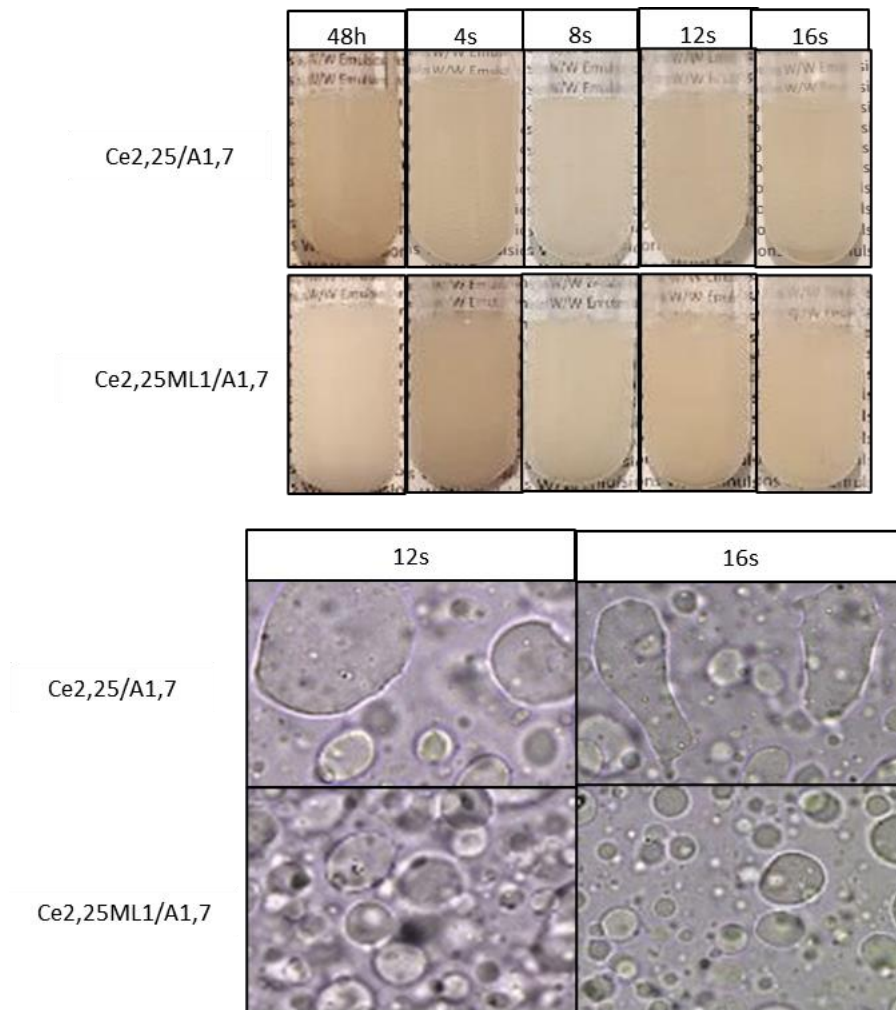


Figura 92. Macro y microfotografías (40x) de formulaciones con y sin ML a 25 °C durante 16 semanas.

Se han realizado estudios reológicos de viscosidad y medidas dinámicas de emulsiones con y sin ML durante 16 semanas (**Figura 93** y **Tabla 20**). Es decir, estas emulsiones mantenían su viscosidad durante el tiempo de estudio obteniendo una pérdida de entre el 10 a 27% para las emulsiones sin ML, y la Ce2,25ML1/A1,7 una pérdida de entre 10 a 21 % a las diferentes tasas de deformación (**Tabla 20**). Se ha descrito que el alginato en concentraciones de etanol alrededor del 15% tiende a aumentar su viscosidad [Hermansson y cols., 2016], lo que podría explicar estos resultados.

Tabla 20. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato/etOH (Ce2,25/A1,7) con la incorporación de melatonina (ML) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	Ce2,25/A1,7 48h	Ce2,25/A1,7 16s	$\Delta\eta$ (%)	Ce2,25ML1/A1,7 48h	Ce2,25ML1/A1,7 16s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=25$ 1/s	2,426	2,159	-11,005	2,149	1,926	-10,376
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}=50$ 1/s	2,049	1,493	-27,135	1,618	1,275	-21,199

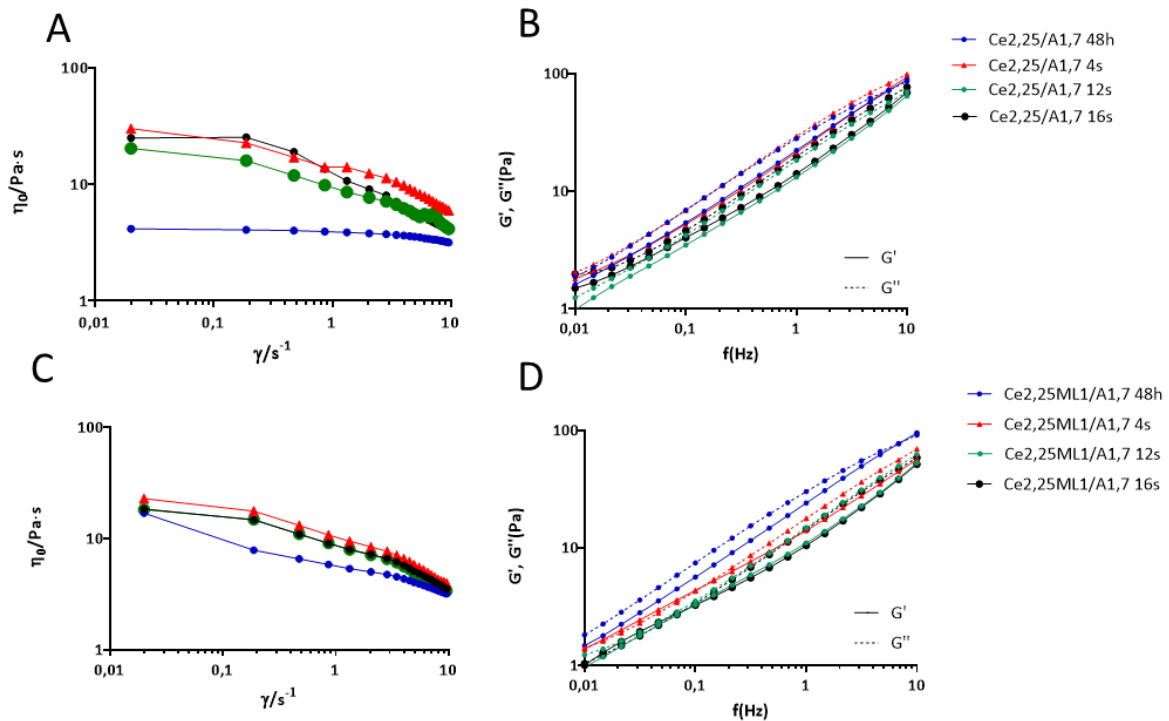


Figura 93. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) Ce2,25/A1,7 y (C) Ce2,25ML1/A1,7. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) Ce2,25/A1,7 y (D) Ce2,25ML1/A1,7.

En relación a los módulos G' y G'' , tanto en las emulsiones con ML o sin principio activo, el módulo viscoso (G'') es sólo ligeramente superior al módulo elástico (G'), de lo que se deduce que el comportamiento líquido predomina mínimamente sobre el sólido, pero ambos son similares. Estas diferencias entre los módulos G' y G'' se han mantenido a lo largo del tiempo (**Figura 93**).

La estabilidad es por la poca disminución de la viscosidad en el tiempo. En ese sentido se ha descrito que el alginato en concentraciones de etanol alrededor del 15% tiende a aumentar su viscosidad [Hermansson y cols., 2016], lo que podría explicar estos resultados, ya que el componente mayoritario en estas emulsiones es la fase de alginato.

4.3.3 Estabilización física con nanopartículas

Con la finalidad de estabilizar este tipo de emulsiones, se ha formado nanopartículas a partir de nano-emulsiones del ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA). El PLGA es un compuesto biodegradable y biocompatible, es uno de los polímeros más utilizados en el diseño y la formulación de sistemas de administración de fármacos para aplicaciones biomédicas, debido a su versatilidad y funcionalización en la formulación. Los nanotransportadores basados en PLGA han permitido encapsular una gran cantidad de fármacos aumentando su biodisponibilidad al protegerlo de la degradación prematura en el entorno biológico lo que proporciona una liberación sostenida [Pandita y cols., 2015].

Las nanopartículas se han preparado como se indica en publicaciones anteriores del grupo de investigación [Fornaguera y cols., 2015], donde se ha utilizado una proporción de láctico y glicólico de 75:25. En el estudio mencionado, se prepararon NPs de PLGA con la finalidad de encapsular loperamida como fármaco modelo, y funcionalizar la NP para atravesar la barrera hematoencefálica.



En emulsiones convencionales, se han utilizado nanopartículas de PLGA para la formación de emulsiones tipo Pickering debido a sus propiedades biocompatibles y bioseguras, y que se pueden adsorber en la interfase aceite/agua [Albert y cols., 2018]. En emulsiones de migliol y agua, donde se incorporaron dispersiones de NP de PLGA, estas no mostraron afinidad por la fase acuosa ni oleosa [Albert y cols., 2018].

En emulsiones W/W, el fundamento de utilizar nanopartículas de PLGA para formar emulsiones W/W tipo Pickering se deben a la posibilidad que tienen estas para ser adsorbidas en la interfase. Esto se debe a que el PLGA no es soluble en medios acuosos ni tampoco en

soluciones con etanol [Garner y cols., 2021]. Otra característica es que las nanopartículas de PLGA tienen un potencial Z negativo debido a sus grupos carboxílicos [Albert y cols., 2018].

A partir de los estudios previos [Fornaguera y cols., 2015], se preparó una dispersión de nanopartículas de PLGA a partir de una nano-emulsión. Se estudió tanto el tamaño como el potencial Z. Como se observa en la **Tabla 21**, se obtuvo una NE de un tamaño de 67 nm con una baja dispersión y un potencial Z de -27 mV. Las NP formadas utilizando la NE como plantilla un tamaño de 51 nm debido a la evaporación del acetato de etilo durante la formación de las NP de PLGA. El potencial Z se mantuvo negativo debido a los grupos carboxílicos de este polímero.

Tabla 21. Propiedades de la nano-emulsión (NE) y la dispersión de nanopartículas (NPd).

Muestra	Apariencia visual	Tamaño (d. nm)	PDI	Potencial Z (mV)
NE		$67,59 \pm 8,11$	$0,17 \pm 0,01$	$- 27,33 \pm 6,55$
NPd		$51,43 \pm 1,74$	$0,18 \pm 0,01$	$- 27,72 \pm 1,81$

Una vez formada la dispersión de NP, se procedió a concentrar en tres ciclos. Para ello mediante el uso del Centriprep®, se concentró hasta obtener una concentración de nanodispersión (NPd) del 6%. Esta concentración se utilizó en base a estudios de emulsiones W/W donde en el sistema PEG/sulfato de magnesio se formaron emulsiones Pickering con NP de sílice [Griffith, 2018]. En este estudio las NP tenían un tamaño de 50 nm y un potencial Z de -42 mV. Estos investigadores determinaron para su sistema que la concentración óptima de NPd fue de un 6% en peso/volumen [Griffith, 2018] Si bien este es otro sistema y otro tipo de NP, se ha utilizado como referencia esa concentración, ya que tanto el tamaño como el pZ son similares.

Antes de la incorporación de la NPd, se incorporó rodamina (color rojo) en las NP de PLGA. Una vez concentrada la NPd se añadió a la solución concentrada de caseinato en PBS: etOH, que previamente se encontraba marcada con fluoresceína (color verde). Una vez preparada la solución con NPd y caseinato se mezcló con la solución concentrada de alginato sin marcar. Una vez prepara la emulsión Ce2,25NP6/A1,7, se dejó 24 horas a 25 °C para posteriormente ser observada en un microscopio confocal fluorescente.

Las imágenes obtenidas fueron de gotas verdes en un fondo negro, lo que quiere decir que las gotas fueron de caseinato en alginato. Después al cambiar el filtro al color rojo, se observa que las gotas también tienen un color rojo, con algunos puntos de intensidad mayor. Luego al hacer la fusión de las dos imágenes anteriores se observa puntos de mayor intensidad en la interfase respecto al interior de las gotas (**Figura 94**). Lo anterior también se observa en la reconstrucción 3D, donde existen aglomeraciones de NP.

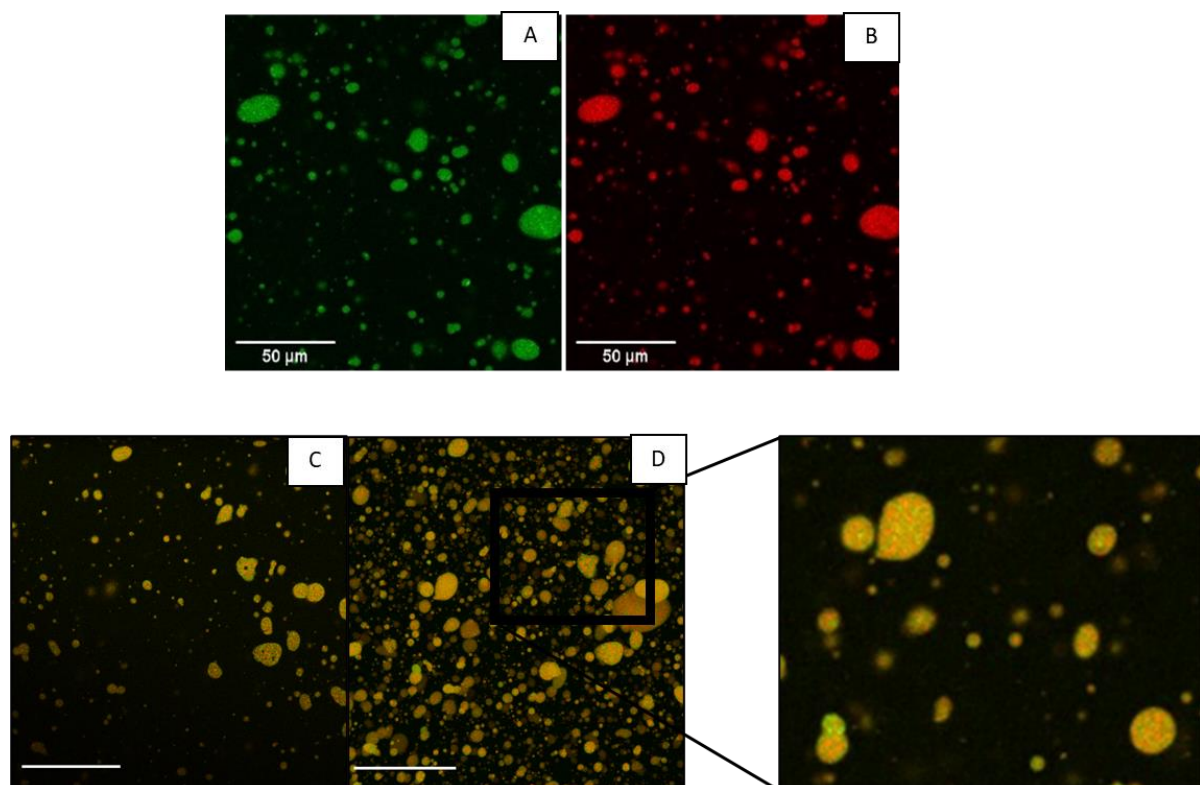


Figura 94. Imágenes de microscopio de fluorescencia confocal de emulsiones de caseinato en alginato 24 h después de la preparación. (A) El caseinato se marcó con FITC, (B) NP de PLGA cargadas con rodamina localizadas fase interna, (C) La imagen corresponde a la fusión de a) y b), (D) reconstrucción 3D de fusión de imágenes.

Estos resultados nos indican, tres posibilidades. La primera que efectivamente la NPd dispersión se encontraba tanto en la interfase como en las gotas de caseinato. Esto se podría explicar debido al modo de preparación en el cual se incorporó en la solución rica en caseinato, y que presenta cierta afinidad por esa fase. Una segunda posibilidad, es que la concentración de rodamina fue muy alta y que rápidamente comenzó a liberarse desde la NP, esto debido a la afinidad que tiene este marcador por el etanol [Chapman & Euler, 2018]. Una tercera posibilidad es que para este sistema una concentración del 6% de NPs sea muy alta, esto se ha observado en con NP de látex que un aumento de concentración hace que se encuentren las NP fuera de la interfase en el sistema dextrano/PEO [Balakrishnan y cols., 2012].

Si bien son necesarios más estudios acerca de la formación de emulsiones Pickering con NP de PLGA, se han continuado los estudios de estabilidad, debido al interés de tener una forma farmacéutica que incorpore nanopartículas de PLGA cargadas con ML para el tratamiento del accidente cerebral vascular [Figueroa y cols., 2021].

4.3.4 Incorporación de NP y melatonina

Se ha estudiado la estabilidad de las emulsiones con y sin melatonina, a la cuales se les incorporó NP para estudiar su estabilidad. Para ello se preparó la emulsión Ce_{2,25}NP₆/A_{1,7} y en la solución concentrada de caseinato se añadieron NP y la ML. Para esto se prepararon las formulaciones y se estudió su estabilidad durante 16 semanas, observándolas cada 4 semanas macro y microscópicamente.

En relación a las microfotografías, en ambas formulaciones estudiadas se observaron gotas durante las 16 semanas de estudio. La distribución del tamaño de gotas se mantuvo durante todo el tiempo de estudio, obteniéndose un promedio de diámetro entre las 5 y 10 μm (**Figura 95**). Estos resultados son similares a las formulaciones Ce_{2,25}/A_{1,7} y Ce_{2,25}ML₁/A_{1,7} en la **Figura 91**.

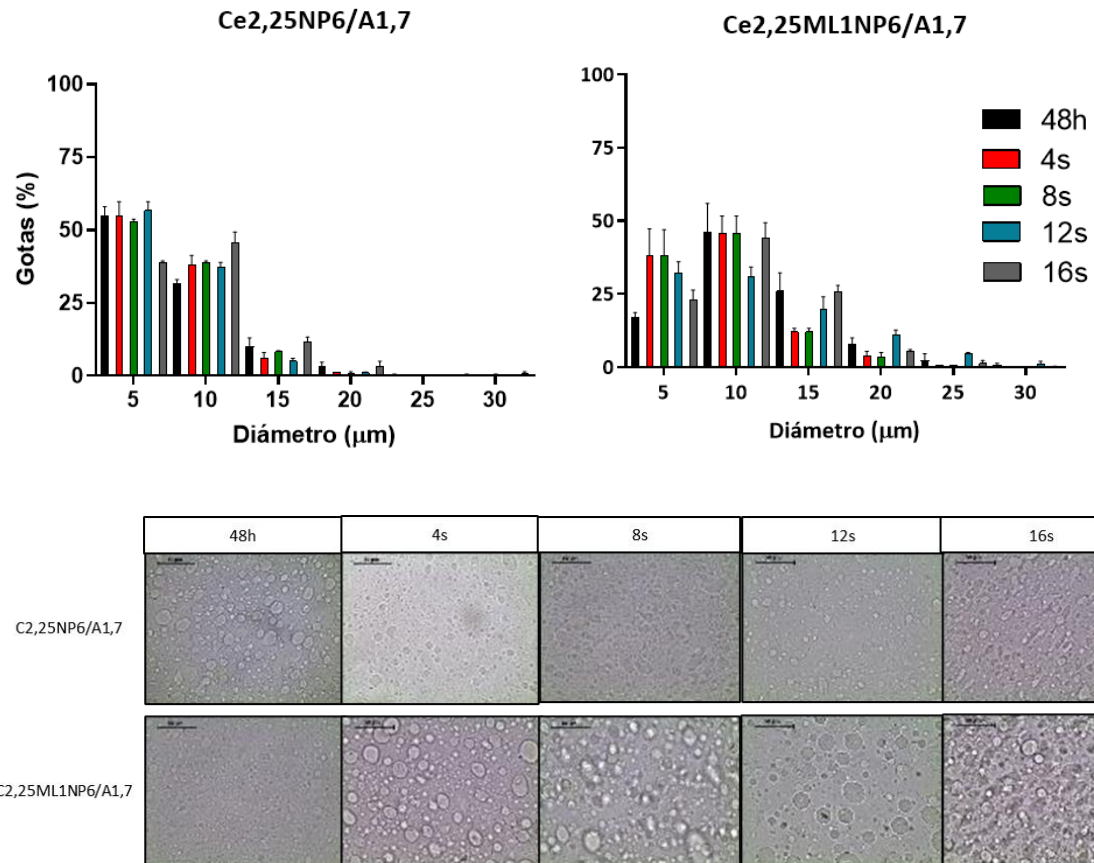


Figura 95. Recuento de gotas y microfotografías (40x) de formulaciones con ML y, con y sin nanopartículas a 25 °C durante 16 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

Con respecto al estudio macroscópico, no se observó macrofotografías, los viales no presentaron separación de fases durante las 16 semanas. Sin embargo, en el estudio microscópico en más detalle se aprecia en la **Figura 96**, se aprecia deformación de las gotas en emulsiones con ML y sin ella a las 16 semanas, lo que probablemente esté relacionado de la desestabilización del sistema.

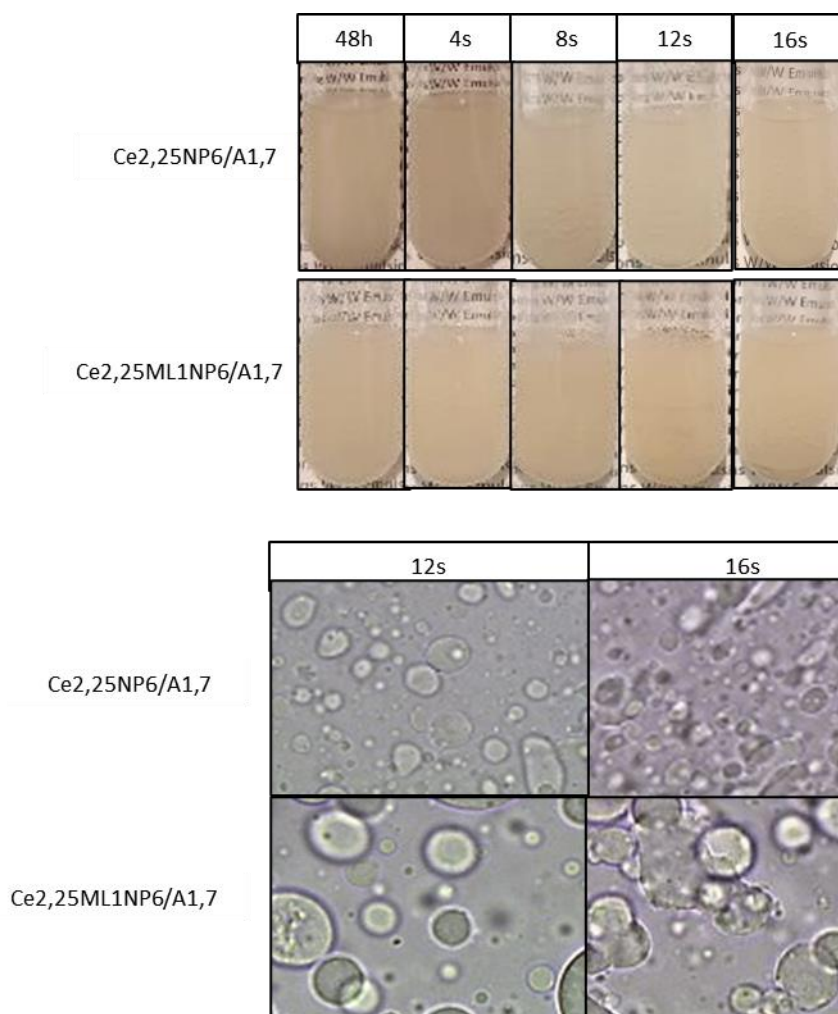


Figura 96. Macro y microfotografías (40x) de formulaciones con ML y, con y sin nanopartículas a 25 °C durante 16 semanas.

Para estudiar en más detalle se estudió la viscosidad y las medidas oscilatorias dinámicas de estas emulsiones. La emulsión C2,25NP6ML1/A1,7 presento una disminución de la viscosidad del aproximadamente 63%, mientras que la emulsión sin ML no se obtuvieron mayores cambios a las 16 semanas (**Tabla 22** y **Figura 97**). Esto demuestra el aporte del principio activo en el comportamiento viscoso de las emulsiones, es decir, que podría estar aumentando el proceso de desestabilización respecto a cuando no se incorpora, en conjunto con las NP. Ya que al comparar con la **Figura 92**, ML sin NP parece mantener la morfología de las gotas a las 16 semanas.

Tabla 22. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato/etOH (Ce2,25/A1,7) con la incorporación de melatonina (ML) y nanopartículas (NP) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	Ce2,25NP6/A1,7 48h	Ce2,25NP6/A1,7 16s	$\Delta\eta$ (%)	Ce2,25NP6ML1/A1,7 48h	Ce2,25NP6ML1/A1,7 16s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	3,636	3,335	-8,278	2,077	0,748	-63,976
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	1,826	2,290	25,410	1,628	0,626	-61,541

En relación a las medidas dinámicas, existe una mayor separación entre los módulos, siempre predominando G'' sobre G' (**Figura 97**). Sin embargo, en el tiempo para ambas emulsiones se van distanciando los módulos. Al comparar con la **Figura 93**, los módulos sin la incorporación de NP, estaban más estrechamente cercanos, por lo que pareciera que fuesen más estables que cuando se incorpora las NPs. Tal como se ha mencionado antes, esto se puede deber a la concentración de NP añadidas. Además, estos cambios de viscosidad y comportamiento dinámico no se observaron en las formulaciones Ce2,25/A1,7 y Ce2,25ML1/A1,7 (**Figura 93**).

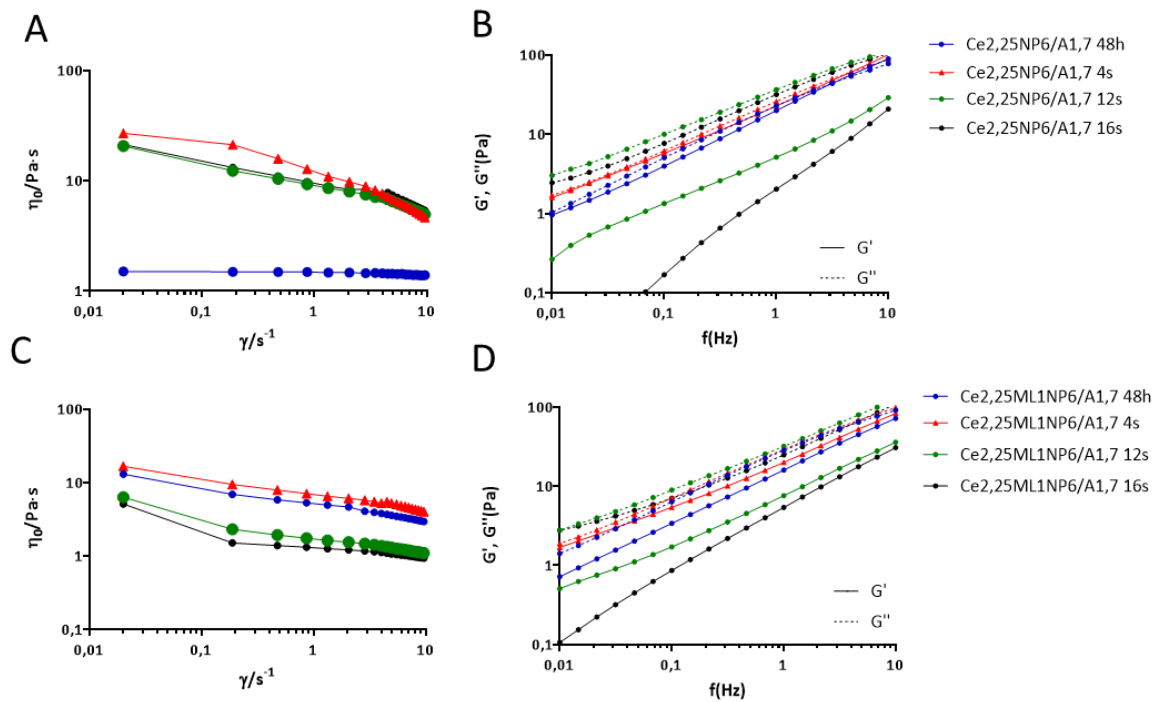


Figura 97. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) Ce2,25NP6/A1,7 y (C) Ce2,25ML1NP6/A1,7. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) Ce2,25NP6/A1,7 y (D) Ce2,25ML1NP6/A1,7.

4.3.5 Estudios de liberación

Se ha estudiado la liberación de un principio activo liposoluble al 1% (p/p) como lo es ML a partir del sistema alginato/caseinato (con etanol) en PBS pH 7,4 y 37°C durante 24 horas. Para ello se prepararon las emulsiones con melatonina, la cual se incorporó en la solución concentrada de caseinato, y con (Ce2,25ML1NP6/A1,7) o sin (Ce2,25ML1/A1,7) la incorporación de NP. También se preparó una solución de ML al 1% como control.

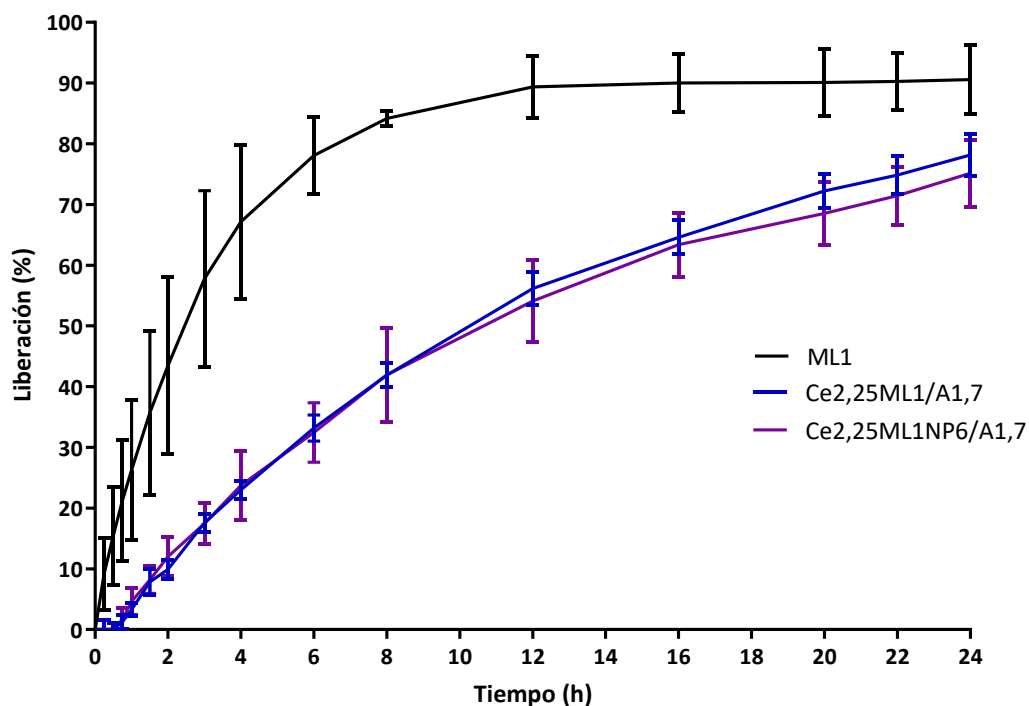


Figura 98. Porcentaje de ML cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C, durante 24 horas. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

Los resultados de la cesión de ML muestran que la solución de ML1 presenta una liberación superior al 90% a las 24 horas (**Figura 98**). Por otra parte, la emulsión Ce2,25ML1/A1,7 junto a Ce2,25ML1NP6/A1,7 tiene una cesión menor a la solución llegando a un 75% a las 24 horas. La pendiente de ambas emulsiones es más sostenida en el tiempo al compararla con la solución de ML1 (**Figura 98**). Estos resultados demuestran que las NP no afectan a la cesión de ML en las condiciones estudiadas.

4.4 Sistema pectina-caseinato

Se estudió la formación de emulsiones W/W en un sistema similar al de alginato de sodio y caseinato de sodio en PBS 7,4 sustituyendo el alginato de sodio por otro polisacárido, que es la pectina. Existen estudios previos sobre el comportamiento físico de mezclas de soluciones de pectina y caseinato de sodio [Rediguieri, 2007] y sobre la reología de emulsiones W/W en este sistema [Maestro y cols., 2020]. La novedad de esta investigación fue el estudio de la incorporación de fármacos y la cesión a soluciones receptoras

4.4.1 Diagrama pseudobinario

Se ha formado un diagrama de fases realizado con la solución de PBS a pH 7,4 para estudiar el comportamiento físico del sistema pectina/caseinato. En el cual se prepararon mezclas de soluciones poliméricas en PBS a pH 7,4 y a diferentes concentraciones de polímero y se observaron las fases que se formaban a 25 °C. Se observó la formación de gotas de emulsión mediante microscopía óptica. Se prepararon soluciones de pectina entre el 0,1 y el 3% en peso y soluciones de caseinato de sodio entre el 0,1% y el 15% en peso, en base a otros estudios descritos en la bibliografía [Maestro y cols., 2020].

En el diagrama de la **Figura 99** se observan en cada eje, concentraciones crecientes de ambas soluciones poliméricas. Además, se pueden observar dos regiones: la primera es una región I, caracterizada por una baja concentración polimérica; y la segunda una zona II, donde hay una concentración mayor de polímeros.

Se marcó el caseinato de sodio con isotiocianato de fluoresceína, para identificar las estructuras formadas al mezclar las dos fases líquidas. En la **Figura 99** se muestran a título de ejemplo tres micrografías de emulsiones formadas al mezclar las soluciones poliméricas: la emulsión C1,66/P2,5, caseinato en pectina (**Figura 99A**); la emulsión P1,5/C11,25, pectina en caseinato (**Figura 99C**); y la emulsión A1/ C7,5/P3 con estructura bicontinua (**Figura 99B**), donde coexisten gotas de pectina y gotas de caseinato.

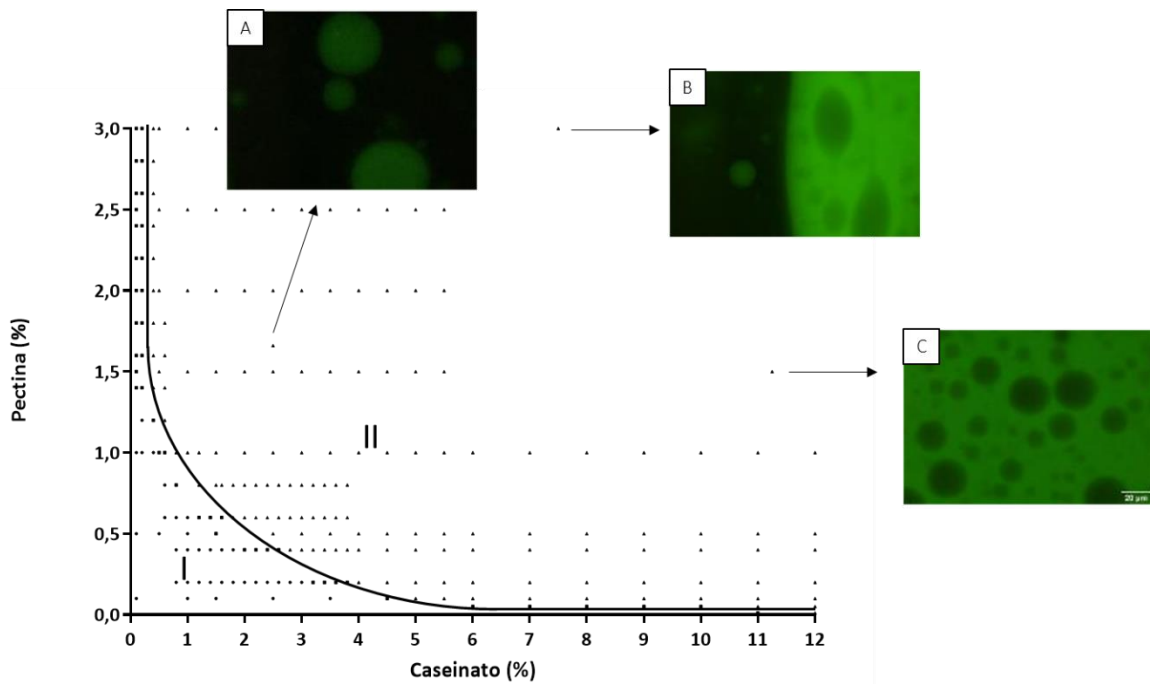


Figura 99. Diagrama de fases del sistema de pectina/caseinato en PBS, observado a 25 ° C después de 7 días. El diagrama de fases se puede dividir en dos regiones: (I) monofásica, (II) multifásica. (A), C1,66/P2,5, caseinato en pectina; (B) C7,5/P3, bicontinuo; y (C) P1,5/C11,25, pectina en caseinato. Estas micrografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseína marcada con FITC).

El sistema pectina-caseinato ha sido descrito utilizando como medio para la preparación de soluciones concentradas una solución amortiguadora de fosfatos a 0,01M y un pH 7 [Rediguieri y cols., 2007], en este diagrama se han obtenido el mismo comportamiento de fases una región monofásica y otra multifásica, y dentro de la zona de multifásica, emulsiones de pectina en caseinato y viceversa, además de estructuras bicontinuas (**Figura 99B**). Otros investigadores han reportado la formación de emulsión de este sistema a pH 8 con una zona de emulsión muy similar, donde algunos puntos son P0,5/C2,5 y C1/P2,5 [Maestro y cols., 2020] (**Figura 99A**). A diferencia este diagrama se formó a pH 7,4 con el uso de solución amortiguadora de fosfatos, lo que al parecer permite que la zona de emulsión se forma a concentraciones más bajas.

En relación al diagrama de la **Figura 99**, se han seleccionado 4 formulaciones. Dos emulsiones de pectina en caseinato (C2,5/P2,5 y C5/P2) y dos de caseinato en pectina (P0,25/C13,75 y P0,5/C12,5)(**Tabla 23**), ambas ubicadas en los extremos del diagrama. Estas

se prepararon a partir de soluciones concentradas de pectina al 3% y de caseinato al 15%, basados en estudios previos [Maestro y cols., 2020] [Rediguieri y cols., 2007]. Además, la selección de estas formulaciones, si bien no hay estudios previos de ellas, se quiso mantener la relación de peso de las soluciones de concentradas de pectina y caseinato, de 5 y 1 g según corresponda.

Tabla 23. Nomenclatura y composición de formulaciones de pectina (P) y caseinato (C).

Código de la emulsión	Fase externa	Peso de solución de pectina (P) añadido**	Peso de solución de caseinato (C) añadido*	Orden de adición de los componentes	Pruebas que se han utilizado
C2,5/P2,5	P	5,5	0,5	P sobre C	Incorporación de CL y MF
C5/P2	P	5	1	P sobre C	Estabilidad
P0,25/C13,75	C	0,5	5,5	C sobre P	Incorporación de CL y MF
P0,5/C12,5	C	1	5	C sobre P	Estabilidad

* Solución concentrada de caseinato 15%

** Solución concentrada de pectina 3%

CL Hidrocloruro de clindamicina

MF Hidrocloruro de metformina

4.4.2 Incorporación de principios activos

Se ha estudiado la incorporación de hidrocloruro de CL e hidrocloruro de MF en el sistema pectina-caseinato, con la finalidad de comparar dos principios activos hidrofílicos.

Hidrocloruro de Clindamicina

Para el estudio de la incorporación de CL, ésta se añadió en la solución concentrada de caseinato para C5CL2/P2 y C2,5CL2/P2,5, y de pectina para P0,25CL2/C13,75 y P0,5CL2/C12,5. A partir de esto, se analizó a 24 horas de preparación la formación de gotas y aspecto macroscópico.

Los resultados muestran que las formulaciones con CL forman emulsiones, esto debido a la presencia de gotas a nivel microscópico, y la ausencia de separación de fases a escala macroscópica a 24 horas de preparación (**Figura 100**).

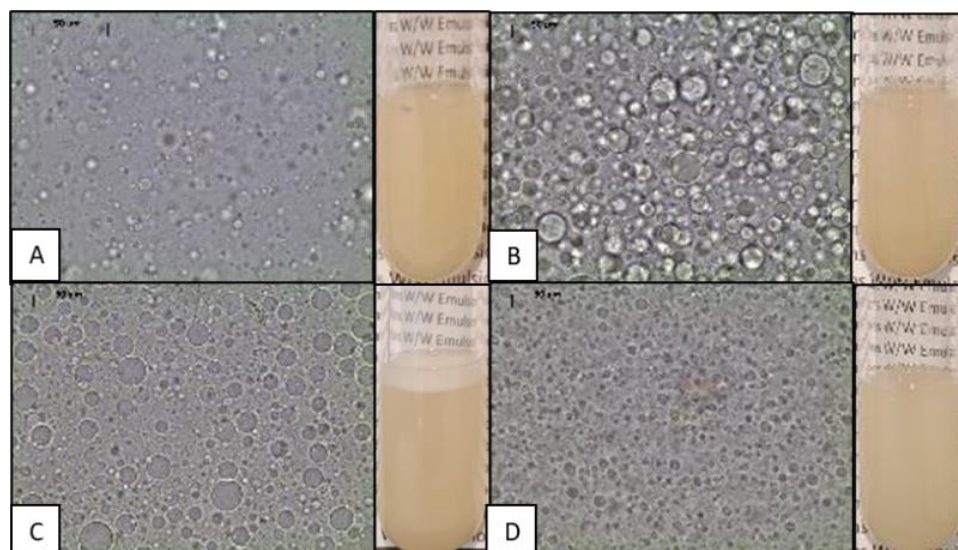


Figura 100. Micro (40x) y macrografía sistema pectina/caseinato con CL incorporada, 24 horas de su preparación. (A) P0,25CL2/C13,75; (B) P0,5CL2/C12,5; (C) C5CL2/P2; (D) C2,5CL2/P2,5.

Como se observó este tipo de formulaciones permiten la incorporación de CL, es por ello que se realizó un estudio de 4 semanas para observar la estabilidad de la emulsión tanto micro y macroscópicamente. Para ello a modo de resumen, se prepararon 4 formulaciones, dos sin principio activo (C2,5/P2,5 y P0,25/C13,75) y dos con CL (C2,5CL2/P2,5 y P0,25CL2/C13,75) a una concentración final del 2%. Todas las formulaciones se mantuvieron a 25 °C.

Los resultados indican que para los tipos de emulsiones caseinato en pectina (C2,5/P2,5) y pectina en alginato (P0,25/C13,75) (**Figura 101** y **Figura 102**), su estabilidad se mantuvo durante una semana, sin embargo, al incorporar CL la estabilidad aumentó hasta las 4 semanas. Las emulsiones caseinato en pectina, presentaron una distribución de gotas sobre el 80% de un tamaño entre 1-5 μm y se mantuvo en el tiempo para el caso de la emulsión con CL, donde ya en la última semana de estudio la cantidad de gotas eran menor (**Figura 101**).

En cambio, las emulsiones tipo pectina en caseinato, la distribución de gotas sobre el 50% pertenecían a un rango de 5-10 μm .

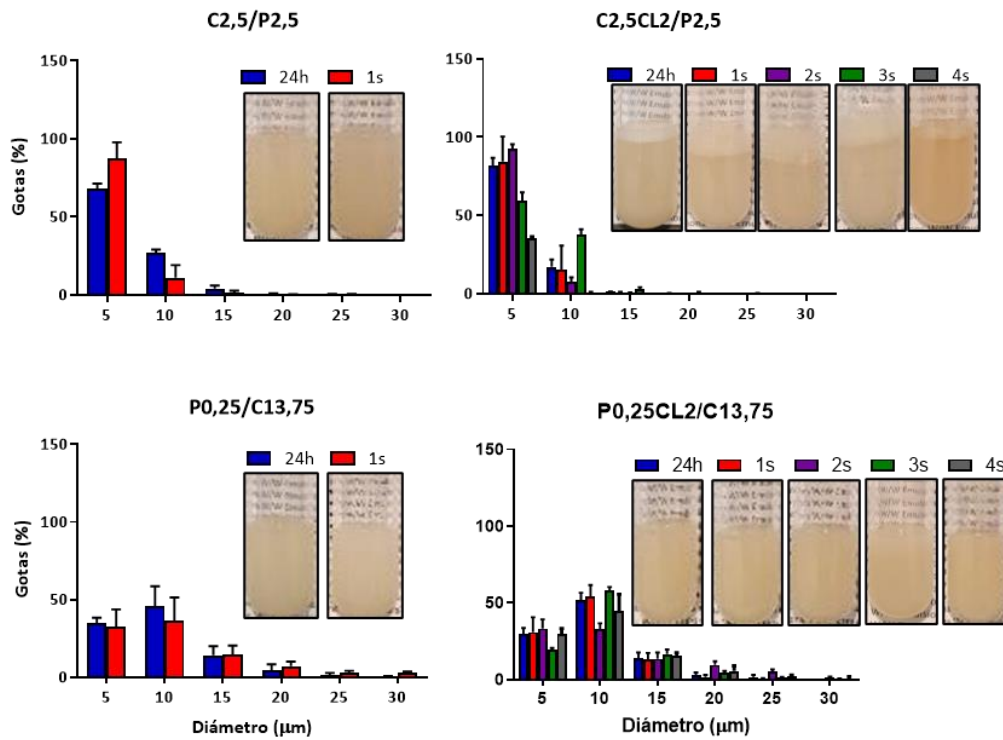


Figura 101. Recuento de gotas de formulaciones con y sin CL a 25 ° C durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm \text{DE}$.

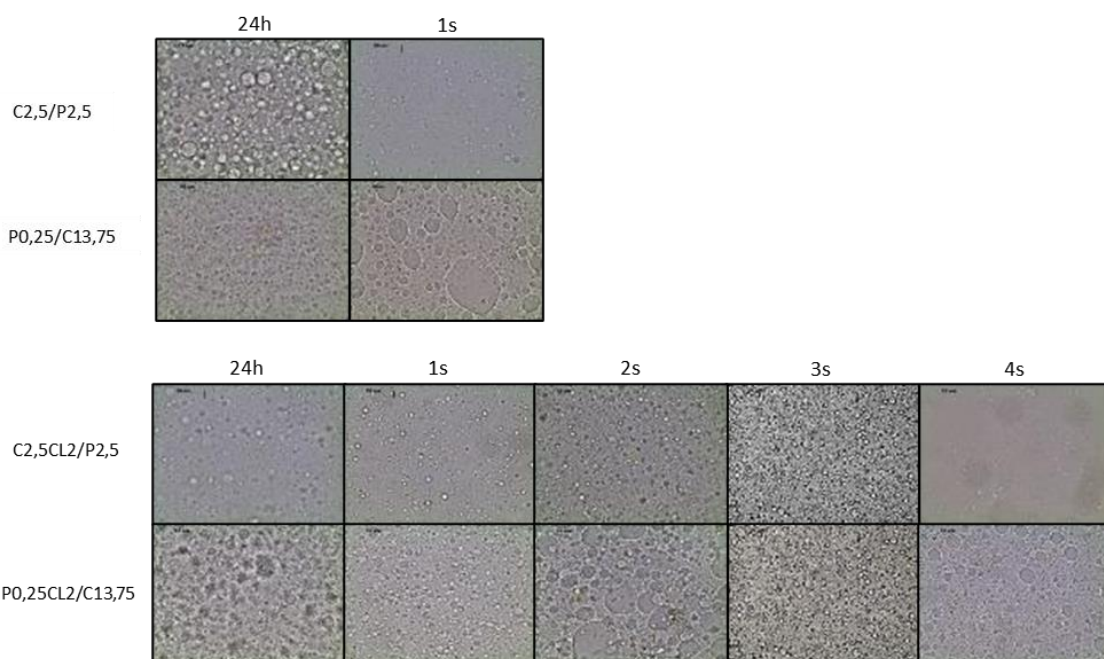


Figura 102. Microfotografías (40x) de formulaciones con y sin CL a 25 ° C durante 4 semanas.

En relación a los estudios de viscosidad, para emulsiones pectina en caseinato sin incorporar CL, presentaban una disminución de viscosidad alrededor del 30 % (**Tabla 24** y **Figura 103A**) al igual que el módulo elástico y el viscoso (**Figura 103B**), donde existían una mayor diferencia entre ambos en el tiempo predominando el comportamiento líquido por sobre el sólido. Al incorporar CL en estas emulsiones, la viscosidad se mantuvo en el tiempo, al igual que los módulos G' y G'' (**Figura 103B**), además, la diferencia entre ambos era mucho menor a la de emulsiones sin el principio activo.

Para las emulsiones caseinato en pectina, cuando no se incorporó CL, presentaban una disminución del 90% en la viscosidad (**Tabla 24** y **Figura 103C**). Sin embargo, cuando CL estaba presente, la viscosidad fue disminuyendo en el tiempo, hasta la cuarta semana donde había separación de fases ($-30\% \Delta\eta$). Interesantemente, para ambas emulsiones, con y sin principio activo, los módulos elástico y viscoso se mantuvieron en el tiempo donde el comportamiento líquido predominaba sobre el sólido (**Figura 103D**).

Tabla 24. Viscosidad de emulsiones del sistema pectina-caseinato (P0,25/C13,75 y C2,5/P2,5) con la incorporación de clindamicina (CL) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	P0,25/C13,75 48h	P0,25/C13,75 1s	$\Delta\eta$ (%)	P0,25CL2/C13,75 48h	P0,25CL2/C13,75 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	0,169	0,121	-28,402	0,161	0,007	-95,553
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	0,167	0,114	-31,512	0,157	0,007	-95,511
	C2,5/P2,5 48h	C2,5/P2,5 1s	$\Delta\eta$ (%)	C2,5CL2/P2,5 48h	C2,5CL2/P2,5 4s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	0,455	0,039	-91,3357	5,935	3,881	-34,608
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	0,368	0,036	-90,1304	5,939	3,995	-32,732

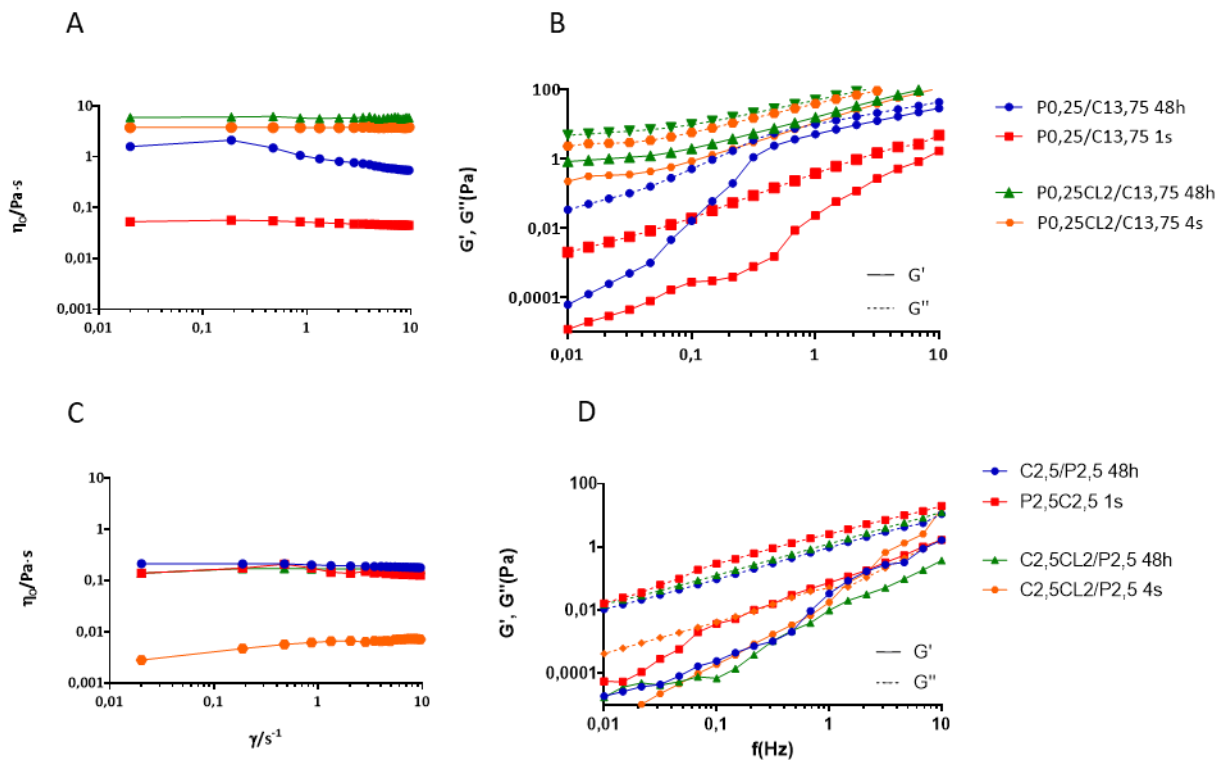


Figura 103. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C2,5/P2,5 (C) P0,25/C13,75. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) P0,25/C13,75 y (D) C2,5/P2,5.

Si bien estas emulsiones fueron estables durante un mes, los parámetros reológicos indican una pérdida de viscosidad y que las emulsiones se vuelven más líquidas con el tiempo. Al comparar emulsiones del sistema pectina-caseinato y alginato-caseinato, considerando que la relación de pesos de soluciones concentradas era similar, estas últimas a las 4 semanas mantenían aún mejor la viscosidad y la relación entre los módulos era más estrechas, por lo que estas emulsiones eran aún más estables y podrían mantenerse por más tiempo. Estos cambios se pueden deber a que el alginato, como se ha mencionado antes, aumenta su viscosidad al disminuir el agua libre [King, 2019] [Theagarajan y cols., 2019] lo que no hace pectina en solución.

El comportamiento dinámico de las emulsiones está en concordancia con los estudios de sistemas previos [Maestro y cols., 2020], sin embargo, no se han encontrado estudios en reológicos en el tiempo para este sistema y condiciones a la fecha de escritura de esta tesis.

Hidrocloruro de Metformina

Se ha incorporado MF en la solución concentrada que sería parte de la fase de menor peso, y se formaron emulsiones pectina en caseinato (P0,25MF2/C13,75 y P0,5MF2/C12,5) y dos de caseinato en pectina (C5MF/P2 y C2,5MF/P2,5). De las formulaciones anteriores se estudió la formación de emulsión con la incorporación de MF al 2%, mediante formación de gotas y apariencia visual

Los resultados muestran que la emulsión fue capaz de incorporar este principio activo, debido a la presencia de gotas a escala microscópica y la no separación de fases a nivel macroscópico (**Figura 104**).

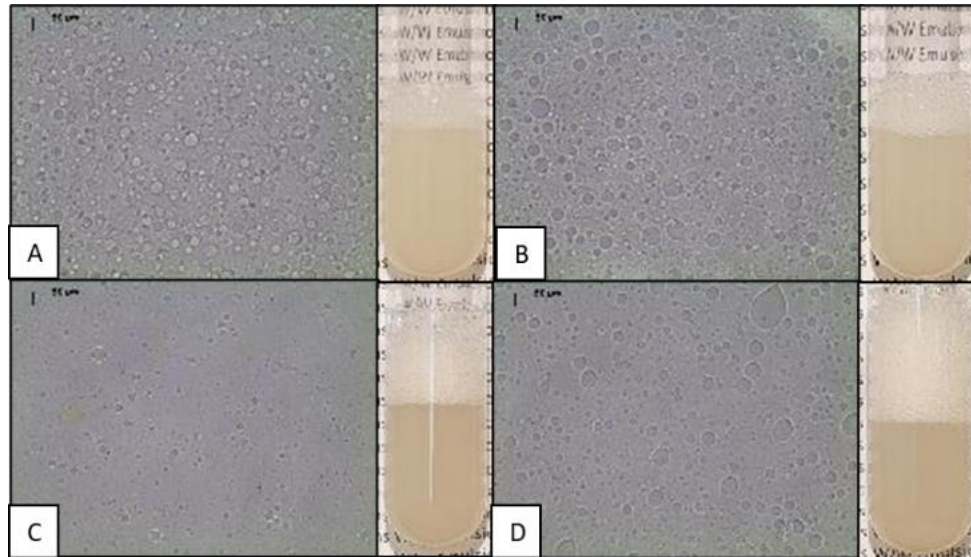


Figura 104. Micro (40x) y macrografía sistema pectina/caseinato con MF incorporada, 24 horas de su preparación. (A) P0,25MF2/C13,75; (B) P0,5MF2/C12,5; (C) C5MF2/P2; (D) C2,5MF2/P2,5.

Para ampliar más el estudio anterior, se ha estudiado la estabilidad durante 4 semanas inicialmente a 25 °C. Para esto se seleccionaron las emulsiones que se encontraban más en los extremos con la finalidad de obtener emulsiones más estables y menos diluidas, como veremos a continuación.

Los resultados muestran que este principio activo no afecta en la estabilidad de ningún tipo de emulsión estudiado. Es decir, para emulsiones con y sin principio activo; y de caseinato en pectina y pectina en caseinato, no aumenta la estabilidad por encima de una semana (**Figura 105** y **Figura 106**). En relación al tamaño de gotas es similar al caso de CL, emulsiones caseinato en pectina la distribución sobre el 80% está en un rango de 0-5 μm y para emulsiones pectina en alginato, la distribución fue 5-10 μm del 50% de la población (**Figura 105**). Es necesario indicar que al tiempo una semana, hubo menos cantidad de gotas para todos los tipos de emulsiones (**Figura 105**).

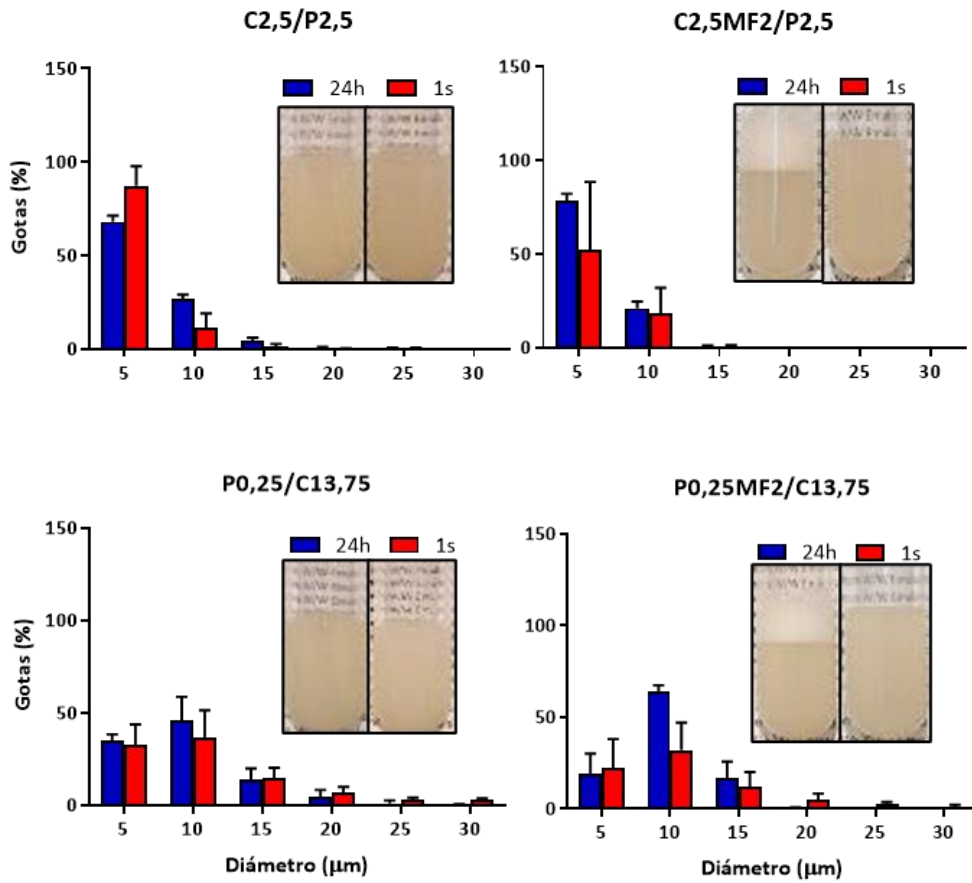


Figura 105. Recuento de gotas de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$.

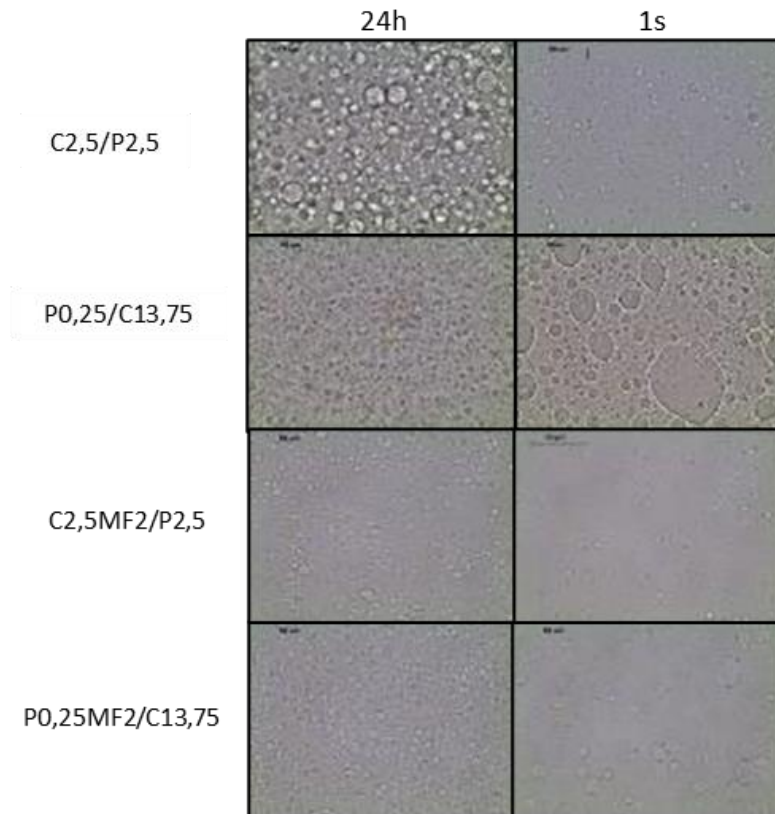


Figura 106. Microfotografías (40x) de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 4 semanas.

Se estudió también el comportamiento reológico de las emulsiones con MF incorporada. La viscosidad para todas las emulsiones presentó una disminución del 6 al 90% aproximadamente (**Tabla 25**), considerando que su estabilidad fue de una semana.

Tabla 25. Viscosidad de emulsiones del sistema pectina-caseinato (P0,25/C13,75 y C2,5/P2,5) con la incorporación de metformina (MF) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.

	P0,25/C13,75 48h	P0,25/C13,75 1s	$\Delta\eta$ (%)	P0,25MF2/C13,75 48h	P0,25MF2/C13,75 1s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	0,455	0,039	-91,335	0,471	0,466	-1,229
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	0,368	0,036	-90,130	0,445	0,4185	-6,060
	C2,5/P2,5 48h	C2,5/P2,5 1s	$\Delta\eta$ (%)	C2,5MF2/P2,5 48h	C2,5MF2/P2,5 1s	$\Delta\eta$ (%)
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =25 1/s	0,169	0,121	-28,402	0,155	0,128	-17,715
Viscosidad (Pas) $\dot{\gamma}$ =50 1/s	0,166	0,114	-31,512	0,151	0,125	-17,084

Para los estudios de reología oscilatoria, las emulsiones se mantuvieron constantes tanto para el módulo de almacenamiento como el viscoso. Las muestras sin MF en ambos tipos de emulsión, tanto a 48 horas como una semana la medición de las muestras fue complicado, ya que a 48 horas la muestra presentan burbujas y a una semana la separación de fases ya comenzaba a observarse (**Figura 107**).

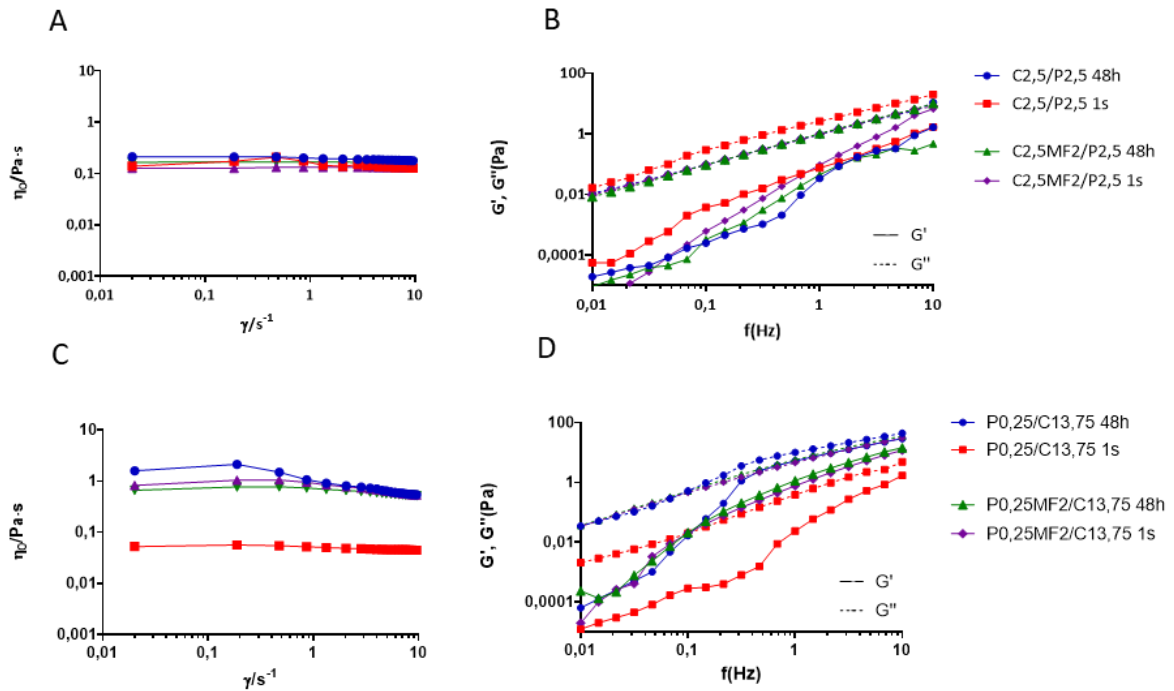


Figura 107. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C2,5/P2,5 (C) P0,25/C13,75. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) P0,25/C13,75 (D) C2,5/P2,5.

Si comparamos CL y MF en este sistema y con el de alginato-caseinato, se observa un comportamiento similar en relación a la estabilidad. Tanto el estudio microscópico como el de reología son muy similares para ambos sistemas, siendo la incorporación de CL más estable que MF. La explicación ya se ha mencionado en apartados anteriores, a modo de resumen, la MF no aumenta mucho la conductividad como si la CL en solución, esto podría ser una medida indirecta de la fuerza iónica generada por estos principios activos, lo que finalmente se vería reflejado en la disminución de la estabilidad.

4.4.3 Estudios de liberación

4.4.3.1 Hidrocloruro de clindamicina

Se ha incorporado CL a una concentración de 2% p/p final en las emulsiones, caseinato en pectina (C2,5CL2/P2,5) y pectina en caseinato (P0,25CL2/C13.75). Para ello se prepararon las emulsiones, donde la CL fue incorporada en la solución concentrada polimérica que constituirá la fase en menor concentración.

Los resultados muestran que al comparar la emulsión C2,5CL2/P2,5 presenta una liberación más sostenida respecto a una solución de CL (CL2) y a una solución de caseinato (C2,5CL2) (**Figura 108**). Caso similar para la emulsión P0,25CL2/C13.75, donde presentó un retardo, respecto a las soluciones CL2 y P0,25CL2 (**Figura 108**). La formulación P0,25CL2/C13,75 es lo que presentó un perfil de liberación de CL más prolongado y sostenido. Por otra parte, la diferencia a tiempo sobre las 16 horas entre C2,5CL2/P,25 y P0,25CL2/C13,75, se puede deber a que la primera formulación fue más viscosa (**Tabla 24**).

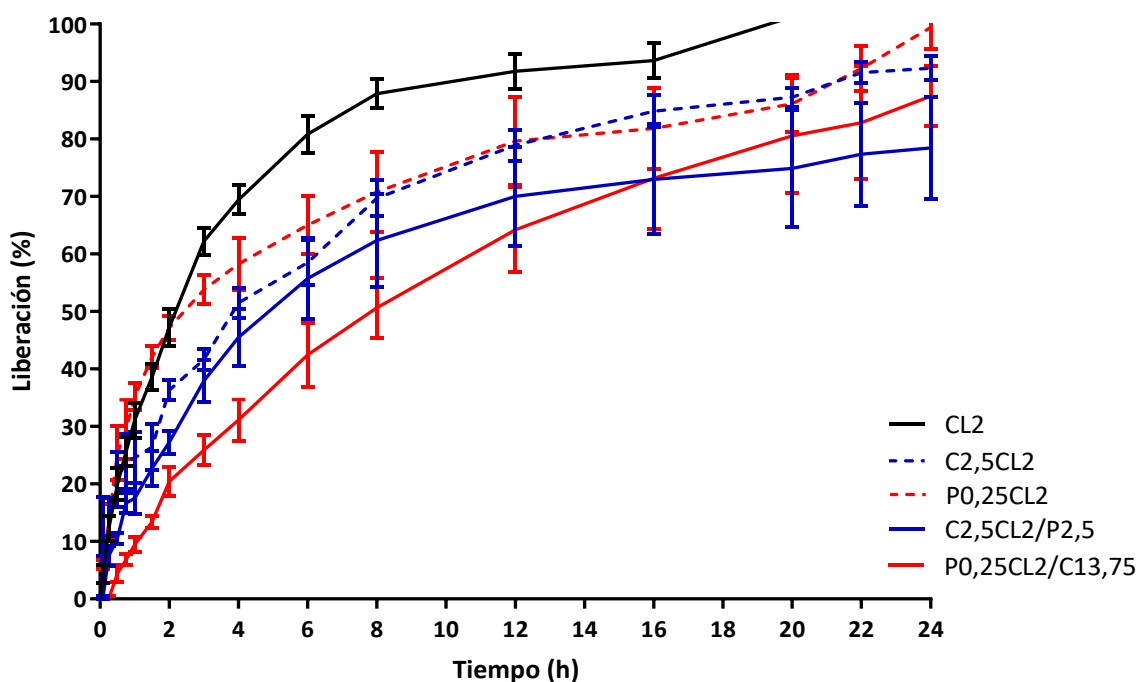


Figura 108. Porcentaje de CL cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

En relación a la modelización de la cesión, se ha utilizado los modelos mencionados en los apartados de cesión anteriores. Los resultados muestran que según el AIC el mejor ajuste es el modelo de Korsmeyer-Peppas (**Tabla 26 y Figura 109**). En este modelo se encontraron diferencias significativas tanto para la constante k_{KP} (P2,5CL2/A2,5 $17,82 \pm 1,81 n^{-0,63}$; P0,25CL2/C13,75 $10,41 \pm 1,45 n^{-0,75}$) como el valor de n (P2,5CL2/A2,5 $0,63 \pm 0,02$; P0,25CL2/C13,75 $0,75 \pm 0,05$), siendo el mecanismo de liberación para ambas formulaciones un transporte de tipo anómalo. De acuerdo con el valor k_{KP} , la liberación de CL a partir del sistema P2,5CL2/C13,75 es más rápido que a partir del sistema P0,25CL2/C13,75.

Tabla 26. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W para los sistemas P2,5CL2/A2,5 y P0,25CL2/C13,75. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).

Modelos cinéticos de cesión		Emulsiones	
		C2,5CL2/P2,5	P0,25CL2/C13,75
Orden 1	K1	-	-
	R*	-	-
	AIC	-	-
Weibull	α	4,65 \pm 0,41	10,32 \pm 1,41
	β	0,66 \pm 0,07	0,95 \pm 0,09
	R*	0,9926 \pm 0,0039	0,9975 \pm 0,0014
	AIC	92,56 \pm 6,17	76,65 \pm 10,87
Higuchi	k_H	20,91 \pm 2,52	16,19 \pm 1,76
	R*	0,9894 \pm 0,0039	0,9827 \pm 0,0108
	AIC	71,16 \pm 1,90	81,44 \pm 6,47
Kors-PP**	k_{KP}	17,82 ^a \pm 1,81	10,41 ^a \pm 1,45
	n	0,63 ^b \pm 0,02	0,75 ^b \pm 0,05
	R*	0,9900 \pm 0,0067	0,9914 \pm 0,0059
	AIC	54,26 \pm 7,43	62,20 \pm 8,67

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas; a,b: diferencias entre grupos

($p < 0,05$) para un mismo sistema. (test Kruskal-Wallis one-way ANOVA).

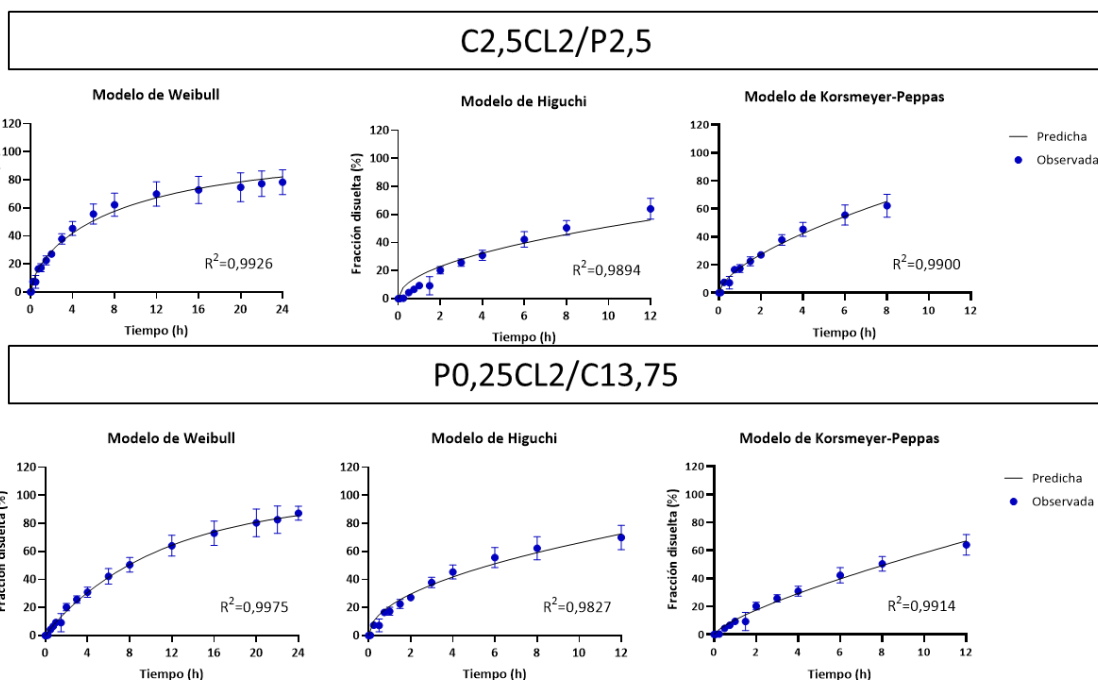


Figura 109. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan desviación estándar.

4.4.3.2 Hidrocloruro de metformina

Se ha incorporado en el sistema pectina-caseinato un 2% (p/p) final de MF. Para ello se incorporó el principio activo en la solución concentrada polimérica que constituirá la fase interna de la emulsión. Los resultados presentados en la **Figura 110** muestran que las emulsiones tanto de caseinato en pectina (C2,5MF2/P2,5) como pectina en caseinato (P0,25MF2/C13,75), presentaban una liberación rápida similar a soluciones de CL (CL2), de caseinato (C2,5MF2). Sin embargo, la solución P0,25MF2, presento una cesión algo más retardada en comparación a las otras muestras estudiadas.

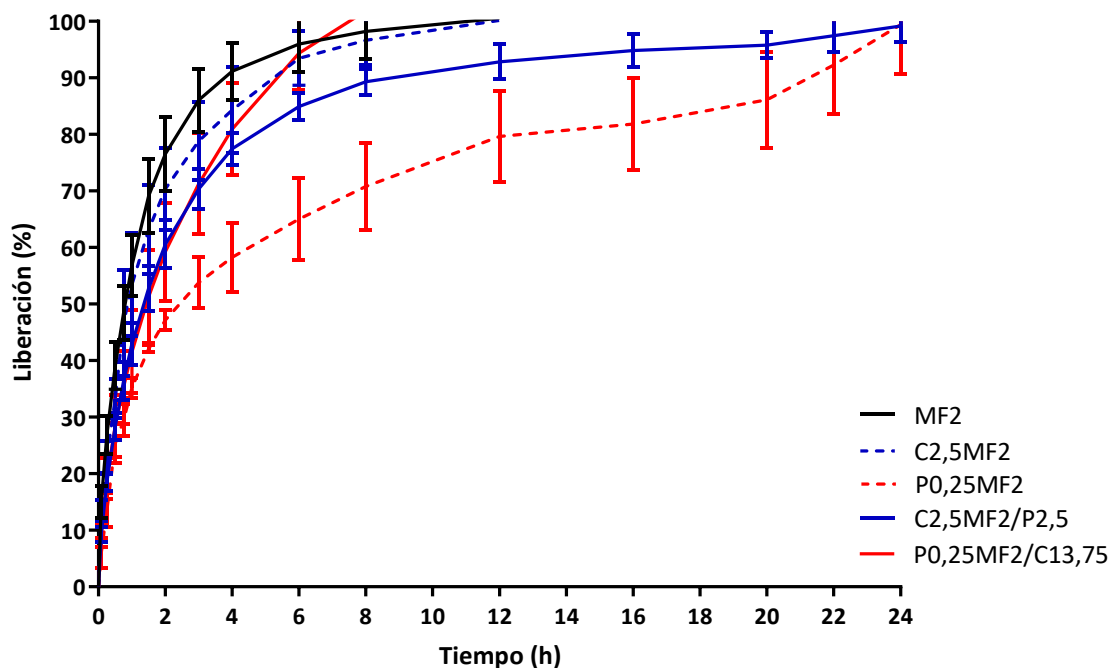


Figura 110. Porcentaje de MF liberada a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$.

Al comparar con la cesión de CL (**Figura 108**) con la de MF, considerando que la formulación es la misma, esta última fue más rápida; esto se puede deber a la diferencia de pKa de los principios activos como se ha mencionado anteriormente. En el ajustado de los modelos cinéticos de disolución a los datos, el modelo de Korsmeyer fue el que mejor ajustó a los parámetros de k_{KP} y n entre todas las formulaciones (**Tabla 27** y **Figura 111**), siendo el exponente difusional (n) algo superior a 0,5 [Costa & Lobo, 2001], por lo que el tipo de transporte de MF a partir de las emulsiones es anómalo.

En este sentido, se han comparado dos principios activos hidrófilos con diferentes propiedades como pKa, solubilidad. De acuerdo con los resultados obtenidos el pH del medio, pKa, solubilidad, fuerza iónica y unión a proteína de cada principio activo incorporado a la emulsión parecen ser factores relevantes que afectarán a la estabilidad de las formulaciones y la cesión de los principios activos.

Tabla 27. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de MF observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W para los sistemas C2,5MF2/P2,5 y P0,25MF2/C13,75. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).

Modelos cinéticos de cesión		Emulsiones	
		C2,5MF2/P2,5	P0,25MF2/C13,75
Orden 1	K1	-	-
	R*	-	-
	AIC	-	-
Weibull	α	1,83 \pm 0,21	1,87 \pm 0,32
	β	0,67 \pm 0,05	0,82 \pm 0,01
	R*	0,9985 \pm 0,0010	0,9954 \pm 0,0018
	AIC	70,03 \pm 17,34	60,63 \pm 7,61
Higuchi	k_H	41,12 \pm 3,23	41,09 \pm 4,85
	R*	0,9977 \pm 0,0012	0,9984 \pm 0,0006
	AIC	30,73 \pm 3,82	22,24 \pm 4,07
Kors-PP**	k_{KP}	40,79 \pm 3,69	40,85 \pm 4,99
	n	0,52 \pm 0,02	0,54 \pm 0,03
	R*	0,9978 \pm 0,0011	0,9990 \pm 0,0007
	AIC	30,30 \pm 5,31	16,82 \pm 7,37

R* = R obs-pred; **Korsmeyer-Peppas; a: diferencias entre grupos (p<0,05)
para un mismo sistema. (test Kruskal-Wallis one-way ANOVA).

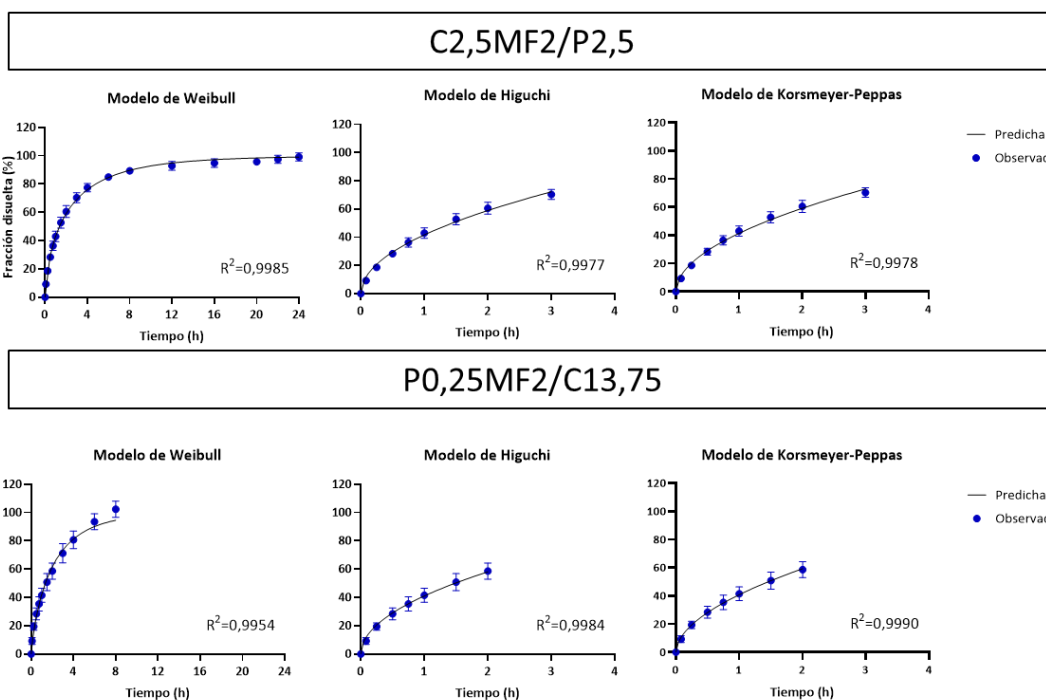


Figura 111. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.

4.4.4 Estudios de citotoxicidad

En este apartado, se ha estudiado la biocompatibilidad del sistema pectina-caseinato al incorporar los principios activos, mediante el ensayo de MTT en cultivo celular de HeLa.

Hidrocloruro de clindamicina

Se ha estudiado la viabilidad celular en emulsiones caseinato en pectina (C2,5/P2,5) y pectina en caseinato (P0,25/C13,75) (**Figura 112**). Para ello se prepararon las emulsiones con y sin CL, y se hicieron diluciones seriadas. Los resultados indican, que las formulaciones sin CL para ambos casos no presentaron muerte celular a las concentraciones estudiadas. Sin embargo, al incorporar CL, se necesitó una dilución más concentrada en la emulsión

P0,25/C13,75 para disminuir la viabilidad en comparación a la emulsión C2,5/P2,5. Esto se puede deber a que la fase externa de caseinato es más viscosa que la de pectina.

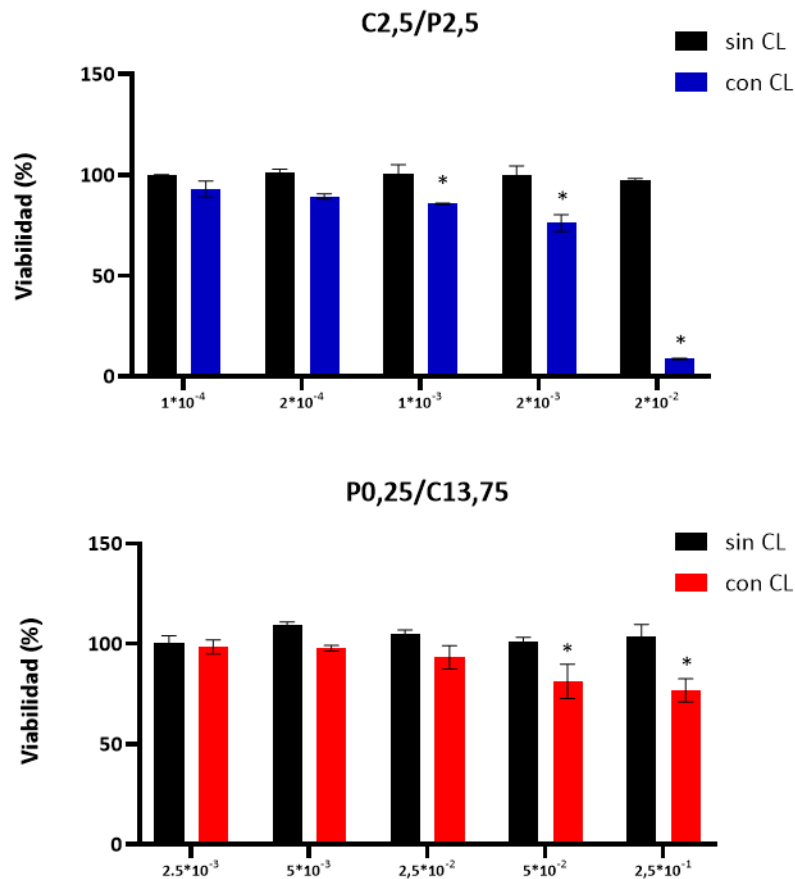


Figura 112. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$.

En relación a los controles del ensayo de toxicidad, para ambas emulsiones tanto las muestras con DMEN y con PBS, no presentaron cambios (**Figura 113**).

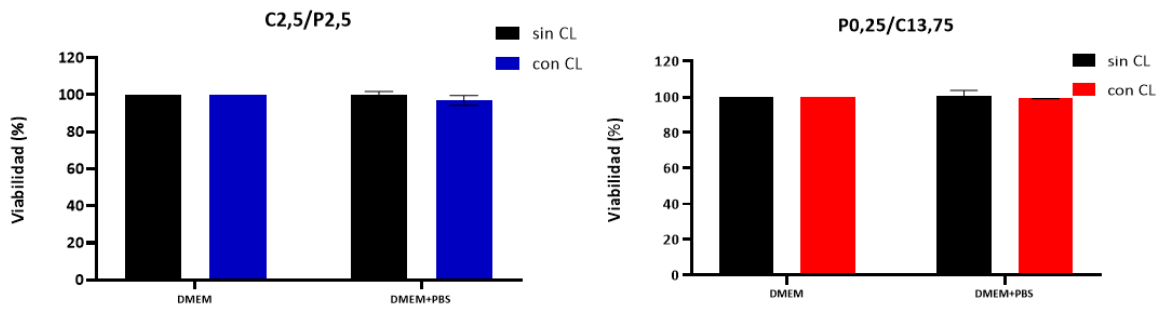


Figura 113. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+ DMEM, controles de las emulsiones. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$.

Metformina hidrocloreuro

Se ha estudiado la viabilidad celular al incorporar MF, en las emulsiones P0,25/C13,75 y C2,5/P2,5 (**Figura 114**). Se ha observado que la emulsión sin MF no afecta la muerte celular a las diluciones estudiadas, y al incorporar MF se obtuvo una disminución de la viabilidad celular a concentraciones crecientes de la emulsión. De estos resultados se obtiene que la emulsión no produce muerte celular y el efecto es por el principio activo a altas concentraciones.

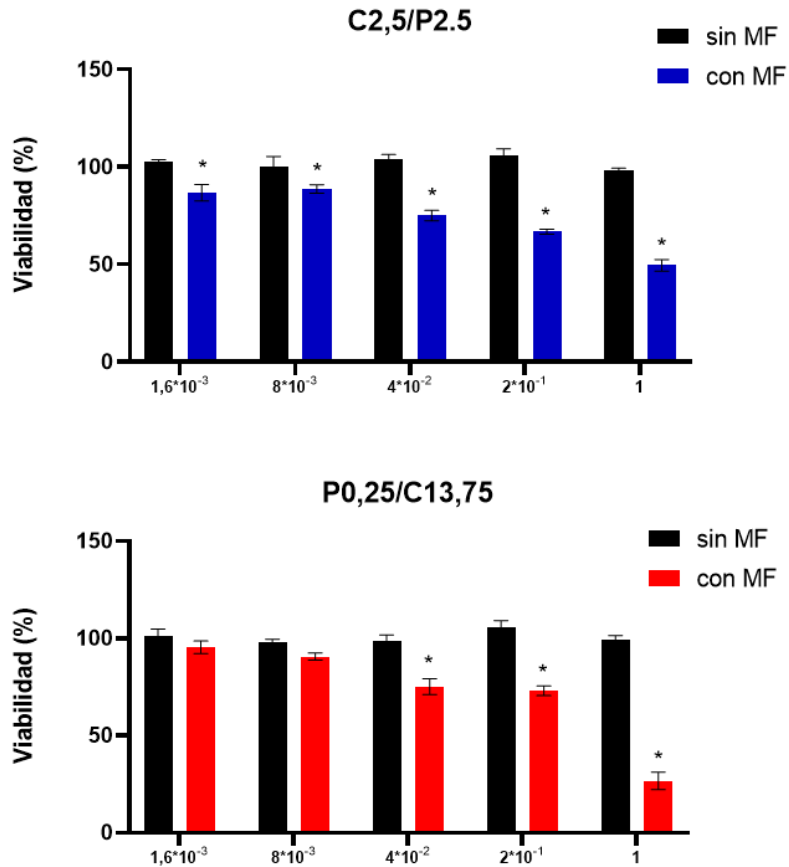


Figura 114. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$.

Los controles tanto de DMEM y PBS+DMEM no cambian para ambas emulsiones con y sin principio activo (**Figura 115**).

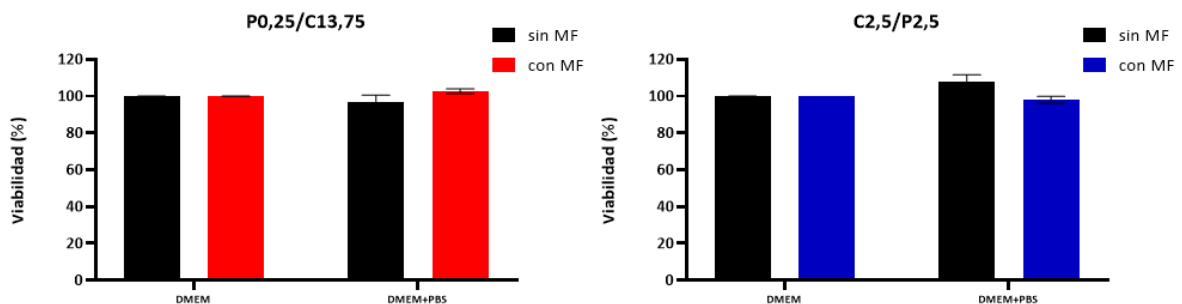


Figura 115. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+DMEM, controles de las emulsiones. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

1. En este trabajo de investigación se han obtenido emulsiones agua en agua (W/W) a temperatura ambiente, mediante la selección de mezclas de soluciones de polisacáridos y proteínas de origen natural, que presentaban un predominio de las repulsiones electrostáticas entre ellos al pH estudiado. Los sistemas estudiados han sido alginato de sodio/albúmina sérica bovina, alginato de sodio/caseinato de sodio y pectina/caseinato de sodio. En todos ellos, mediante la elaboración de diagramas de fases en no-equilibrio, se ha comprobado la formación de emulsiones con estructura polisacárido en proteína, proteína en polisacárido y estructuras bicontínuas, en función de la concentración de los polímeros y el volumen relativo de las fases. Se han seleccionado para estudios posteriores los sistemas alginato de sodio/caseinato de sodio y pectina/caseinato de sodio en PBS, porque permitían la formación de emulsiones W/W a pH 7,4 que es un pH fisiológico. El predominio de cargas negativas tanto del polisacárido como de la proteína a este pH daba lugar a la incompatibilidad termodinámica en solución y a la formación de emulsiones. Se ha descartado el sistema alginato de sodio/albúmina sérica bovina en PBS porque precisaba un elevado valor de pH y elevadas concentraciones de NaCl para la formación de las emulsiones.
2. Las emulsiones W/W son sistemas innovadores en Tecnología Farmacéutica y, por primera vez, se ha estudiado la incorporación de principios activos modelo con distintas propiedades físico-químicas, para evaluar su potencial como nuevas formas farmacéuticas. Se han seleccionado dos fármacos hidrosolubles con distintos valores de pKa: hidrocloreuro de clindamicina (pKa=7,45) e hidrocloreuro de metformina (pKa=12,4) y una molécula liposoluble no ionizable: melatonina. Se han podido incorporar los dos fármacos hidrosolubles al 2% en peso en las emulsiones W/W de los sistemas alginato de sodio/caseinato de sodio y pectina/caseinato de sodio. Para la incorporación de melatonina se ha estudiado la formación de emulsiones W/W en el sistema alginato de sodio/caseinato de sodio utilizando una mezcla PBS:etanol en una relación 70:30 p/p. Las emulsiones W/W han mostrado estabilidad con la proporción de etanol incorporada y han permitido disolver melatonina al 2% en peso en estas emulsiones.

3. La incorporación de hidrocloreto de clindamicina W/W ha mostrado un efecto estabilizador de las emulsiones, comprobado por microscopía óptica, microscopía de fluorescencia y reología. Esta estabilización se ha atribuido a la contribución iónica del principio activo al pH estudiado. En cambio, el hidrocloreto de metformina no ha presentado este efecto estabilizador, debido a que su pKa es diferente y por ello, también su grado de ionización.

4. Se ha estudiado la estabilización de las emulsiones W/W del sistema alginato de sodio/caseinato de sodio por dos procedimientos: gelificación mediante la adición del excipiente glucono-delta-lactona e incorporación de nanopartículas de mucina y de nanopartículas de PLGA, formando emulsiones tipo Pickering. La incorporación de glucono-delta-lactona en concentraciones inferiores al 2% p/p en las soluciones concentradas de alginato de sodio y de caseinato de sodio aumentó la viscosidad de las emulsiones, pero no se tradujo en un aumento de la estabilidad. Sin embargo, la incorporación de mucina al 0,1% y al 1% en la solución concentrada de caseinato de sodio, permitió aumentar la estabilidad de las emulsiones durante 6 meses, que fue el periodo de tiempo estudiado. Las nanopartículas de PLGA se utilizaron para estabilizar emulsiones del sistema alginato de sodio/caseinato de sodio en PBS:etanol. La elevada concentración de nanopartículas de PLGA utilizada no permitió localizar con precisión la ubicación de éstas en las emulsiones W/W por fluorescencia, pero las emulsiones fueron estables durante 4 meses. Por tanto, la formación de emulsiones de tipo Pickering ha demostrado ser un método adecuado para la estabilización de emulsiones W/W en los sistemas estudiados.

5. Se ha propuesto un dispositivo basado en celdas de inmersión para estudiar la liberación de los principios activos desde las emulsiones W/W a una solución receptora, con objeto de evaluar su comportamiento como nuevos sistemas terapéuticos. Se ha comparado el perfil de liberación obtenido desde las emulsiones a una solución receptora de PBS 7,4 y se ha comparado con los perfiles obtenidos desde las soluciones poliméricas concentradas. Se ha obtenido un perfil de liberación más lento y sostenido en el tiempo de hidrocloreto de clindamicina a partir de emulsiones en comparación con las soluciones poliméricas

concentradas. Este retardo no es tan evidente en el caso de la incorporación de hidrocloreuro de metformina. El ajustado de los distintos modelos de disolución a los datos procedentes de la liberación de los principios activos a partir de las emulsiones estudiadas, ha puesto de manifiesto que la función de Korsmeyer-Peppas es la que mejor ha descrito los datos observados. El mecanismo implicado en la liberación de los principios activos ha sido la difusión, a excepción de las formulaciones de alta viscosidad atribuida a la elevada concentración de alginato (A2.75 y A2.5), donde el mecanismo de liberación ha sido el transporte anómalo.

6. Los estudios de citotoxicidad en células Hela (ensayo MTT) han mostrado ausencia de toxicidad de las emulsiones desarrolladas, con una viabilidad celular superior al 80% en todas las emulsiones W/W que no contenían principio activo.
7. Los resultados obtenidos en esta Tesis doctoral permiten proponer las emulsiones W/W constituidas por alginato de sodio y caseinato de sodio y por pectina y caseinato de sodio en PBS 7,4 como potenciales sistemas terapéuticos biocompatibles que, por su composición, métodos de preparación e innovación cumplen los objetivos de desarrollo sostenible.

Bibliografía

- Adikwu, M. U. (2006). Mucins and their potentials. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5, 581-582.
- AEMPS. (22 de abril de 2022). *CIMA.AEMPS.ES*. <https://cima.aemps.es/>
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 9(6), 716-723.
- Albert, C., Huang, N., Tsapis, N., Geiger, S., Rosilio, V., Mekhloufi, G., & Agnely, F. (2018). Bare and sterically stabilized PLGA nanoparticles for the stabilization of pickering emulsions. *Langmuir*, 34(46), 13935-13945.
- Al-Hamidi, H., Obeidat, W. M., & Nokhodchi, A. (2015). The dissolution enhancement of piroxicam in its physical mixtures and solid dispersion formulations using gluconolactone and glucosamine hydrochloride as potential carriers. *Pharmaceutical Development and Technology*, 20(1), 74-83.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1976). Incompatibility of proteins and polysaccharides in aqueous media. *Vysokomolek. Soed*, 18B, 566-569.
- Antonov, Y. A., Grinberg, V. Y., & Tolstoguzow, V. B. (1975). Phase Equilibria in Water/Protein/Polysaccharide Systems. *Starke*, 27, 424-431.
- Antonov, Y. A., V. P., & Moldenaers, P. (2004). Interfacial tension of aqueous biopolymer mixtures close to the critical point. *International Journal of Biological Macromolecules*, 34(1-2), 29-35.
- Antonov, Y., & Moldenaers, P. (2011). Structure formation and phase-separation behaviour of aqueous casein–alginate emulsions in the presence of strong polyelectrolyte. *Food Hydrocolloids*, 25(3), 350-360.
- Atmeh, R. F., Arafa, I. M., & Al-Khateeb, M. (2007). Albumin aggregates: hydrodynamic shape and physico-chemical properties. *Jordan Journal of Chemistry*, 2(2), 169-182.

- Augustin, M. A., Oliver, C. M., & Hemar, Y. (2011). Casein, caseinates, and milk protein concentrates. *Dairy Ingredients for Food Processing*, 1, 161-178.
- Balakrishnan, G., Nicolai, T., Benyahia, L., & Durand, D. (2012). Particles trapped at the droplet interface in water-in-water emulsions. *Langmuir*, 28(14), 5921-5926.
- Bansil, R., Stanley, E., & LaMont, J. T. (1995). Mucin biophysics. *Annual Review of Physiology*, 57(1), 635-657.
- Basha, F. H., & Hemalatha, S. (2022). Screening the Efficacy of Melatonin on Neurodegeneration Mediated by Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Damage. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(3), 1105-1119.
- Beijerinck, M. W. (1896). Ueber eine Eigentümlichkeit der löslichen Stärke. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infekt*, 2(22):697-9.
- Beldengrün, Y., Aragon, J., Prazeres, S. F., Montalvo, G., Miras, J., & Esquena, J. (2018). Gelatin/maltodextrin water-in-water (w/w) emulsions for the preparation of cross-linked enzyme-loaded microgels. *Langmuir*, 34(33), 9731-9743.
- Beldengrün, Y., Dallarís, V., Jaén, C., Protat, R., Miras, J., Calvo, M., García-Celma, M. J., & Esquena, J. (2020). Formation and stabilization of multiple water-in-water-in-water (W/W/W) emulsions. *Food Hydrocolloids*, 102, 105588.
- Ben Ayed, E., Cochereau, R., Dechancé, C., Capron, I., N. T., & Benyahia, L. (2018). Water-in-water emulsion gels stabilized by cellulose nanocrystals. *Langmuir*, 34(23), 6887-6893.
- Bikjdaouene, L., Escames, G., Leon, J., Ferrer, J. M., Khaldy, H., Vives, F., & Acuña-Castroviejo, D. (2003). Changes in brain amino acids and nitric oxide after melatonin administration in rats with pentylenetetrazole-induced seizures. *Journal of pineal research*, 35(1), 54-60.
- Binks, B. P., & Lumsdon, S. O. (2000). Influence of particle wettability on the type and stability of surfactant-free emulsions. *Langmuir*, 6(23), 8622-8631.
- Boateng, J. S., Auffret, A. D., Matthews, K. H., Humphrey, M. J., Stevens, H. N., & Eccleston, G. M. (2010). Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as

- potential drug delivery systems to mucosal surfaces. *International Journal of Pharmaceutics*, 389(1-2), 24-31.
- Bonse, G., Hamm, M., Muller, H. P., Naik, A. H., Scheer, M., Stegemann, M., & Vetter, O. (1999). *U.S. Patent No. 5,998,418*. Washington: U.S. Patent and Trademark Office.
- Braccini, I., & Pérez, S. (2001). Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: the egg-box model revisited. *Biomacromolecules*, 2(4), 1089-1096.
- Braga, A. L., Menossi, M., & Cunha, R. L. (2006). The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation. *International Dairy Journal*, 16(5), 389-398.
- Buckingham, R. (2020). *Martindale: The Complete Drug Reference*. London, England, UK: Pharmaceutical Press.
- Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., & Heckelman, P. E. (2001). *An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, NJ: The merck index.
- Builders, P. F., Kunle, O. O., & Adikwu, M. U. (2008). Preparation and characterization of mucinated agarose: a mucin–agarose physical crosslink. *International journal of pharmaceutics*, 356(1-2), 174-180.
- Calderó, G., García-Celma, M. J., & Solans, C. (2011). Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 353(2), 406-411.
- Capron, I., Costeux, S., & Djabourov, M. (2001). Water in water emulsions: phase separation and rheology of biopolymer solutions. *Rheologica Acta*, 40(5), 441-456.
- Cardia, M. C., Carta, A. R., Caboni, P., Maccioni, A. M., Erbi, S., Boi, L., & Sinico, C. (2019). Trimethyl chitosan hydrogel nanoparticles for progesterone delivery in neurodegenerative disorders. *Pharmaceutics*, 11(12), 657.
- Chaibva, F. A., & Walker, R. B. (2007). The comparison of in vitro release methods for the evaluation of oxytocin release from pluronic® F127 parenteral formulations. *Dissolution Technologies*, 14(4), 15-25.

- Chapman, M., & Euler, W. B. (2018). Rhodamine 6G structural changes in water/ethanol mixed solvent. *Fluorescence*, 28(6), 1431-1437.
- Chapter, U. G. (2018). 1724> Semisolid Drug Products—Performance Tests. In United States Pharmacopeia and National Formulary. En U. 4.-N. 36. USA: he United States Pharmacopeial Convention: Rockville.
- Chen, J. F., Guo, J., Liu, S. H., Luo, W. Q., Wang, J. M., & Yang, X. Q. (2019). Zein particle-stabilized water-in-water emulsion as a vehicle for hydrophilic bioactive compound loading of riboflavin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(35), 9926-9933.
- Cheng, C. L., Lawrence, X. Y., Lee, H. L., Yang, C. Y., Lue, C. S., & Chou, C. H. (2004). Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 297-304.
- Chhetri, H. P., Thapa, P., & Van Schepdael, A. (2014). Simple HPLC-UV method for the quantification of metformin in human plasma with one step protein precipitation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 22(5), 483-487.
- Chourasia, M. K., & Jain, S. K. (2003). Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6(1), 33-66.
- CIMA. (10 de mayo de 2022). *Agencia española de medicamentos y productos sanitarios*. <https://cima.aemps.es>
- Coates, D., & Richardson, G. (1974). A note on the production of sterile solutions of sodium alginate. *Canadian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9: 60-61.
- Costa, P., & Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133.
- Davidson, M. B., & Peters, A. L. (1997). An overview of metformin in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*, 102(1), 99-110.
- De Kruif, C. G., & Holt, C. (2003). *Casein micelle structure, functions and interactions*. Boston: Springer.

- Devina, N., Eriwati, Y. K., & Santosa, A. S. (2018). The purity and viscosity of sodium alginate extracted from Sargassum brown seaweed species as a basic ingredient in dental alginate impression material. *Journal of Physics: Conference Series*, 1073 (5). 052012.
- Dhawan, V. K., & Thadepalli, H. (1982). Clindamycin: a review of fifteen years of experience. *Reviews of Infectious Diseases*, 4(6), 1133-1153.
- Dickinson, E. (2016). Exploring the frontiers of colloidal behaviour where polymers and particles meet. *Food Hydrocolloids*, 52, 497-509.
- Dickinson, E. (2019). Particle-based stabilization of water-in-water emulsions containing mixed biopolymers. *Trends in food science & technology*, 83, 31-40.
- Ding, P., Wolf, B., Frith, W. J., Clark, A. H., Norton, I. T., & Pacek, A. W. (2002). Interfacial tension in phase-separated gelatin/dextran aqueous mixtures. *Journal of Colloid and Interface Science*, 253(2), 367-376.
- Doolen, S., Krause, D. N., Dubocovich, M. L., & Duckles, S. P. (1998). Melatonin mediates two distinct responses in vascular smooth muscle. *European Journal of Pharmacology*, 345(1), 67-69.
- Draget, K. I., & Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food hydrocolloids*, 25(2), 251-256.
- Duval, S., Chung, C., & McClements, D. J. (2015). Protein-polysaccharide hydrogel particles formed by biopolymer phase separation. *Food Biophysics*, 10(3), 334-341.
- Elzoghby, A. O., ElFotouh, W. S., & Elgindy, N. A. (2011). Casein-based formulations as promising controlled release drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 153(3), 206-216.
- Erxleben, S. W., Pelan, E., & Wolf, B. (2021). Effect of ethanol on the stability of sodium caseinate stabilised emulsions. *Food Hydrocolloids*, 121, 107058.
- Esquena, J. (2016). Water-in-water (W/W) emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 25, 109-119.

- Farrell, H. M., Jimenez-Flores, R., Bleck, G. T., Brown, E. M., Butler, J. E., Creamer, L. K., & Swaisgood, H. E. (2004). Nomenclature of the proteins of cows' milk—Sixth revision. *Journal of Dairy Science*, 87(6), 1641-1674.
- Feiner, G. (2016). Chapter 4 - Additives. En P. S. Technology, *Practical Science and Processing Technology* (págs. 59-88). San Diego: Academic Press.
- Figueroa, E. G., González-Candia, A., Caballero-Román, A., Fornaguera, C., Escribano-Ferrer, E., García-Celma, M. J., & Herrera, E. A. (2021). Blood-brain barrier dysfunction in hemorrhagic transformation: a therapeutic opportunity for nanoparticles and melatonin. *Journal of Neurophysiology*, 125(6), 2025-2033.
- Flutto, L. (2003). PECTIN | Properties and Determination. En E. o. Edition), *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition)* (págs. 4440-4449). Maryland : Academic Press.
- Fornaguera, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., García-Celma, M. J., Camarasa, J., & Solans, C. (2015). PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. *Journal of Controlled Release*, 211, 134-143.
- Fox, P. F., & Mulvihill, D. M. (1990). *Casein*. Dordrecht: Springer.
- Frenkel, E. S., & Ribbeck, K. (2015). Salivary mucins protect surfaces from colonization by cariogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 332-338.
- Fu, S., Thacker, A., Sperger, D. M., Boni, R. L., Buckner, I. S., Velankar, S., & Block, L. H. (2011). Relevance of rheological properties of sodium alginate in solution to calcium alginate gel properties. *Aaps Pharmscitech*, 12(2), 453-460.
- Furia, T. E. (1973). *CRC handbook of food additives*. California: CRC press.
- García, J. J., López-Pingarrón, L., Almeida-Souza, P., Tres, A., Escudero, P., García-Gil, F. A., & Bernal-Pérez, M. (2014). Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *Journal of Pineal Research*, 56(3), 225-237.

- Garner, J., Skidmore, S., Hadar, J., Park, H., Park, K., Jhon, Y. K., & Wang, Y. (2021). Analysis of semi-solvent effects for PLGA polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 602, 120627.
- Ge, S., Kojio, K., Takahara, A., & Kajiyama, T. (1998). Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 9(2), 131-150.
- Gibbs, J. W. (1961). *Thermodynamics*. New York: Dover Publications.
- Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J., & Williams, K. M. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2), 81-98.
- Griffith, C., & Daigle, H. (2018). On the shear stability of water-in-water Pickering emulsions stabilized with silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 532, 83-91.
- Grinberg, V. Y., & Tolstoguzov, V. B. (1997). Thermodynamic incompatibility of proteins and polysaccharides in solutions. *Food Hydrocolloids*, 11(2), 145-158.
- Gupta, A., Eral, H. B., Hatton, T. A., & Doyle, P. S. (2016). Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft matter*, 12(11), 2826-2841.
- Gurikov, P., & Smirnova, I. (2018). Non-conventional methods for gelation of alginate. *Gels*, 4(1), 14.
- Hafner, A., Lovrić, J., Voinovich, D., & Filipović-Grčić, J. (2009). Melatonin-loaded lecithin/chitosan nanoparticles: Physicochemical characterisation and permeability through Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Pharmaceutics*, 381(2), 205-213.
- Haimov, I., & Lavie, P. (1995). Potential of melatonin replacement therapy in older patients with sleep disorders. *Drugs & Aging*, 7(2), 75-78.

- Hänggi, P., & Ingold, G. L. (2006). Quantum Brownian motion and the third law of thermodynamics. *Acta Physica Polonica B*, 37, 1537-1550.
- Hansch, C., Leo, A., & Hoekman, D. (1995). Exploring QSAR - Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants. *Washington, DC: American Chemical Society*, 160.
- Hazt, B., Bassani, H. P., Elias-Machado, J. P., Buzzo, J. L., Silveira, J. L., & de Freitas, R. A. (2020). Effect of pH and protein particle shape on the stability of amylopectin–xyloglucan water-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 104, 105769.
- He, Z., Zhang, X., Qi, W., Huang, R., & Su, R. (2015). Alginate-casein microspheres as bioactive vehicles for nutrients. *Transactions of Tianjin University*, 21(5), 383-391.
- Hermann, L. S. (1979). Metformin: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabète & Métabolisme*, 5(3), 233-245.
- Hermansson, E., Schuster, E., Lindgren, L., Altskär, A., & Ström, A. (2016). Impact of solvent quality on the network strength and structure of alginate gels. *Carbohydrate Polymers*, 144, 289-296.
- Hoey, A., Ryan, J. T., Fitzsimons, S. M., & Morris, E. R. (2016). Segregative interactions in single-phase mixtures of gelling (potato) maltodextrin with other hydrocolloids. *Hydrocolloid Functionality for Affordable and Sustainable Global Food Solutions*, 18, 305.
- Huong, L. T., Häger, T., & Hofmeister, W. (2010). Confocal micro-Raman spectroscopy: a powerful tool to identify natural and synthetic emeralds. *Gems & Gemology*, 46(1), 36-41.
- Impellitteri, N. A., Toepke, M. W., Levensgood, S. K., & Murphy, W. L. (2012). Specific VEGF sequestering and release using peptide-functionalized hydrogel microspheres. *Biomaterials*, 33(12), 3475-3484.
- Jahanban-Esfahlan, A., & Panahi-Azar, V. (2016). Interaction of glutathione with bovine serum albumin: Spectroscopy and molecular docking. *Food Chemistry*, 202, 426-431.

- Jahaniaval, F., Kakuda, Y., Abraham, V., & Marcone, M. F. (2000). Soluble protein fractions from pH and heat treated sodium caseinate: physicochemical and functional properties. *Food Research International*, 33(8), 637-647.
- Jones, O. A., Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research*, 36(20), 5013-5022.
- Kalaf, E. A., Flores, R., Bledsoe, J. G., & Sell, S. A. (2016). Characterization of slow-gelling alginate hydrogels for intervertebral disc tissue-engineering applications. *Materials Science and Engineering*, 63, 198-210.
- Kasapis, S., Morris, E. R., Norton, I. T., & Gidley, M. J. (1993). Phase equilibria and gelation in gelatin/maltodextrin systems—Part II: Polymer incompatibility in solution. *Carbohydrate Polymers*, 21(4), 249-259.
- Kaya, M., Sousa, A. G., Crépeau, M. J., Sørensen, S. O., & Ralet, M. C. (2014). Characterization of citrus pectin samples extracted under different conditions: influence of acid type and pH of extraction. *Annals of Botany*, 114(6), 1319-1326.
- Kelly, P. M., Kelly, J., Mehra, R., Oldfield, D. J., Raggett, E., & O'Kennedy, B. T. (2000). Implementation of integrated membrane processes for pilot scale development of fractionated milk components. *Le Lait*, 80(1), 139-153.
- King, A. H. (2019). Brown seaweed extracts (alginates). *In Food Hydrocolloids* , 115-188.
- Laurén, P., Paukkonen, H., Lipiäinen, T., Dong, Y., Oksanen, T., Rääkkönen, H., & Laaksonen, T. (2018). Pectin and mucin enhance the bioadhesion of drug loaded nanofibrillated cellulose films. *Pharmaceutical Research*, 35(7), 1-14.
- Lawrence, A., Ashworth, D., & Ashworth, J. (2018). *Trissel's Stability of Compounded Formulations*. Chicago: American Pharmacists Association.
- Leal-Calderon, F., Schmitt, V., & Bibette, J. (2007). *Emulsion science: basic principles*. Cambridge: Springer Science & Business Media.
- Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37(1), 106-126.

- Li, Y., Zhao, X., Zu, Y., Wang, L., W. W., Deng, Y., & Liu, Y. (2017). Melatonin-loaded silica coated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate for enhanced oral bioavailability: Preparation, and in vitro-in vivo evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 112, 58-66.
- Lissant, K. J. (1974). *Emulsions and Emulsion Stability*. New York: Taylor & Francis Group.
- Liu, L., Fishman, M. L., & Hicks, K. B. (2007). Pectin in controlled drug delivery—a review. *Cellulose*, 14(1), 15-24.
- Lund, W. (1994). *The Pharmaceutical Codex: Principles and Practice of Pharmaceutics*. London: Pharmaceutical Press.
- Maeda, H., Ishida, N., Kawauchi, H., & Tuzimura, K. (1969). Reaction of fluorescein-isothiocyanate with proteins and amino acids I. Covalent and non-covalent binding of fluorescein-isothiocyanate and fluorescein to proteins. *The Journal of Biochemistry*, 65(5), 777-783.
- Maestro, A., Gutiérrez, J. M., Santamaría, E., & González, C. (2020). Rheology of water-in-water emulsions: Caseinate-pectin and caseinate-alginate systems. *Carbohydrate Polymers*, 249, 116799.
- Mao, S., Zhang, T., Sun, W., & Ren, X. (2012). The depolymerization of sodium alginate by oxidative degradation. *Pharmaceutical Development and Technology*, 17(6), 763-769.
- Marczynski, M., Kimna, C., & Lieleg, O. (2021). Purified mucins in drug delivery research. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 113845.
- Marti-Mestres, G., & Nielloud, F. (2002). Emulsions in health care applications—an overview. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 23(1-3), 419-439.
- Masana, M. I., Doolen, S., Ersahin, C., Al-Ghoul, W. M., Duckles, S. P., Dubocovich, M. L., & Krause, D. N. (2002). MT2 melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 302(3), 1295-1302.

- Matalanis, A., Jones, O. G., & McClements, D. J. (2011). Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1865-1880.
- Merck. (2017). *Microscopía Fluoresceína 5-isotiocianato (FITC)*. Darmstadt,: Merck KGaA.
- Merck. (2020). *Rhodamine B isothiocyanate*. Saint Louis: Merck.
- Mezdour, S., Boyaval, P., & Korolczuk, J. (2008). Solubility of α S1-, β -and κ -casein in water-ethanol solutions. *Dairy science & technology*, 88(3), 313-325.
- Mezdour, S., Brulé, G., & Korolczuk, J. (2006). Physicochemical analysis of casein solubility in water-ethanol solutions. *Le Lait*, 86(6), 435-452.
- Morris, E. R. (1990). Mixed polymer gels. En E. R. Morris, *Food gel* (págs. 300–312). Dordrecht: P. Harris.
- Murat, A. (2016). *Alginate-Based Highly Concentrated Emulsions and Water-in-Water Emulsions*. Barcelona: Trabajo final de Máster.
- Musabayane, C. T., Munjeri, O., & Matavire, T. P. (2003). Transdermal delivery of chloroquine by amidated pectin hydrogel matrix patch in the rat. *Renal Failure*, 25(4), 525-534.
- Nasir, S. S., Wilken, J. L., & Akhtar, B. (1977). Application of gluconolactone in direct tablet compression. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(3), 370-379.
- NCBI. (2 de 5 de 2022). *PubChem Compound Summary for CID 73995022*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Casein>
- Nicolai, T., & Murray, B. (2017). Particle stabilized water in water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 68, 157-163.
- Norton, J. E., Espinosa, Y. G., Watson, R. L., Spyropoulos, F., & Norton, I. T. (2015). Functional food microstructures for macronutrient release and delivery. *Food & function*, 6(3), 663-678.
- Oesterling, T. (1970). Aqueous stability of clindamycin. *Journal of pharmaceutical sciences*, 59(1), 63-67.

- Opanasopit, P., Apirakaramwong, A., Ngawhirunpat, T., Rojanarata, T., & Ruktanonchai, U. (2008). Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *Aaps Pharmscitech*, 9(1), 67-74.
- Osol, A., Anderson, J. T., & Hoover, J. E. (1975). *Remington's pharmaceutical sciences: a treatise on the theory and practice of pharmaceutical sciences, with essential information about pharmaceutical and medicinal agents*. Mack Publishing Company.
- Ostrozhenkova, E. G. (2020). Extraction of pectins from citrus fruits, their qualitative and quantitative analysis for application in the medical and food industries. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 613 .
- Pandita, D., Kumar, S., & Lather, V. (2015). Hybrid poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles: design and delivery prospectives. *Drug Discovery Today*, 20(1), 95-104.
- Papadopoulou, V., Kosmidis, K., Vlachou, M., & Macheras, P. (2006). On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *International Journal of Pharmaceutics*, 309(1-2), 44-50.
- Papich, M. G., & Martinez, M. N. (2015). Applying biopharmaceutical classification system (BCS) criteria to predict oral absorption of drugs in dogs: challenges and pitfalls. *Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 17(4), 948-964.
- Pashaei, Y., Daraei, B., Forouzesh, M., & Shekarchi, M. (2019). Graphene oxide-based dispersive-solid phase extraction for preconcentration and determination of ampicillin sodium and clindamycin hydrochloride antibiotics in environmental water samples followed by HPLC-UV detection. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 18(2), 642.
- Pávics, L. (1970). Comparative study of the rheological properties of various mucilages. *Acta pharmaceutica Hungarica*, 40(2), 52-59.
- Pawar, S. N., & Edgar, K. J. (2012). Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials*, 33(11), 3279-3305.

- Pickering, S. U. (1907). CXCVI.—emulsions. *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 91, 2001-2021.
- Piculell, L., & Lindman, B. (1992). Association and segregation in aqueous polymer/polymer, polymer/surfactant, and surfactant/surfactant mixtures: similarities and differences. *Advances in Colloid and Interface Science*, 41, 149-178.
- Pocker, Y., & Green, E. (1973). Hydrolysis of D-glucono- δ -lactone. I. General acid-base catalysis, solvent deuterium isotope effects, and transition state characterization. *Journal of the American Chemical Society*, 95(1), 113-119.
- Putnam, D., Gentry, C. A., Pack, D. W., & Langer, R. (2001). Polymer-based gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(3), 1200-1205.
- Rediguieri, C. F., de Freitas, O., Lettinga, M. P., & Tuinier, R. (2007). Thermodynamic incompatibility and complex formation in pectin/caseinate mixtures. *Biomacromolecules*, 8(11), 3345-3354.
- Reiter, J., Tan, D. X., Rosales-Corral, S., & Manchester, L. (2013). The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 13(3), 373-384.
- Rena, G., Hardie, G., & Ewan, R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*, 60(9), 1577-1585.
- Richardson, J. C., Dettmar, P. W., Hampson, F. C., & Melia, C. D. (2004). Oesophageal bioadhesion of sodium alginate suspensions: particle swelling and mucosal retention. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(1), 49-56.
- Rollema, H. S., & Muir, D. D. (2009). Casein and related products. *Dairy Powders and Concentrated Products*, 235-254.
- Roufegarinejad, L., Amarowicz, R., & Jahanban-Esfahlan, A. (2019). Characterizing the interaction between pyrogallol and human serum albumin by spectroscopic and

- molecular docking methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 37(11), 2766-2775.
- Sagis, L. M. (2009). Dynamics of encapsulation and controlled release systems based on water-in-water emulsions: Liposomes and polymersomes. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 388(13), 2579-2587.
- Sarode, A. R., Sawale, P. D., Khedkar, C. D., Kalyankar, S. ., & Pawshe, R. D. (2016). Casein and Caseinates: Methods of manufacture. En P. M. Benjamin Caballero, *The Encyclopedia of Food and Health* (págs. 676-682). London: Academic Press.
- Schipper, R. G., Silletti, E., & Vingerhoeds, M. H. (2007). Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, 52(12), 1114-1135.
- Scholten, E., Sagis, L. M., & van der Linden, E. (2006). Effect of bending rigidity and interfacial permeability on the dynamical behavior of water-in-water emulsions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(7), 3250-3256.
- Schuster, D. (1985). *Encyclopedia of Emulsion Technology: Applications*. New York: Marcel Dekker.
- Schwab, S., Hinthorn, D., Diederich, D., Cuppage, F., & Grantham, J. (1983). pH-dependent accumulation of clindamycin in a polycystic kidney. *American Journal of Kidney Diseases*, 3(1), 63-66.
- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). (2010). *Opinion on Melatonin*. Scientific Committee on Consumer Safety: Directorate-General for Health and Consumers.
- Scientific, T. (2018). *Safety data sheet: Bovine serum albumin*. Revision no. 3.
- Sharma, S., Sarkar, G., Srestha, B., Chattopadhyay, D., & Bhowmik, M. (2019). In-situ fast gelling formulation for oral sustained drug delivery of paracetamol to dysphagic patients. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 864-868.
- Sheskey, P., Hancock, B., Moss, G., & Goldfarb, D. (2020). *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. California: Pharmaceutical Press.

- Shinde, U. A., & Nagarsenker, M. S. (2009). Characterization of gelatin-sodium alginate complex coacervation system. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(3), 313.
- Sierra, A. F., Ramírez, M. L., Campmany, A. C., Martínez, A. R., & Naveros, B. C. (2013). In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *Journal of Dermatological Science*, 69(3), 202-214.
- Singh P., M. B. (2018). On the encapsulation and viability of probiotic bacteria in edible carboxymethyl cellulose-gelatin water-in-water emulsions. *Food Hydrocolloids*, 75, 41-50.
- Singhal, S., & Hulle, N. R. (2022). Citrus pectins: structural properties, extraction methods, modifications and applications in food systems—a review. *Applied Food Research*, 100215.
- Southward, C. (1985). Manufacture and applications of edible casein products. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 20:79 –101 . .
- Stanislav, D., Sjöblom, J., & Øystein, S. (2006). An experimental and theoretical approach to dynamic behaviour of emulsion. En J. Sjöblom, *Emulsions and emulsion stability* (págs. 1-31). New York: Taylor & Francis.
- Stanković, M., Savić, V., & Marinković, V. (2013). Determination of clindamycin phosphate in different vaginal gel formulations by reverse phase high performance liquid chromatography. *Acta Facultatis Medicae Naissensis*, 30(2), 63-71.
- Stephen, A. M., Phillips, G. O., & Williams, P. A. (2006). *Food Polysaccharides and Their Applications*. Boca Raton: CRC Press.
- Sučkov, V. V., Grinberg, V. J., & Tolstoguzov, V. B. (1980). Study of the spinnability of emulsions based on a two-phase water-casein-sodium alginate system. *Food/Nahrung*, 24(9), 893-897.

- Sullivan, D. A., Sullivan, B. D., Evans, J. E., Schirra, F., Yamagami, H., Liu, M., & Dana, M. R. (2002). Androgen deficiency, Meibomian gland dysfunction, and evaporative dry eye. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 966(1), 211-222.
- Swain, S., Behera, A., Beg, S. N., Patra, C. C., Dinda, S., Sruti, J., & Rao, M. (2012). Modified alginate beads for mucoadhesive drug delivery system: an updated review of patents. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, 6(3), 259-277.
- Sweetman, S. C. (2011). *Martindale: The complete drug reference*. Pharmaceutical Press.
- Tadros, T. (2013). *Emulsion formation and stability*. John Wiley & Sons.
- Tadros, T., & Vincent, B. (1983). *Encyclopedia of Emulsion Technology*. New York: Paul Becher.
- Takeuchi, K. P., & Cunha, R. L. (2008). Influence of ageing time on sodium caseinate gelation induced by glucono- δ -lactone at different temperatures. *Dairy Science & Technology*, 88(6), 667-681.
- Tang, H., Huang, L., Zhao, D., Sun, C., & Song, P. (2020). Interaction mechanism of flavonoids on bovine serum albumin: Insights from molecular property-binding affinity relationship. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 239, 118519.
- Theagarajan, R., Dutta, S., Moses, J. A., & Anandharamakrishnan, C. (2019). Alginates for food packaging applications. *Alginates: Applications in the Niomedical and Food Industries*, 207.
- Tønnesen, H. H., & Karlsen, J. (2002). Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6), 621-630.
- Turgeon, S. L., Beaulieu, M., Schmitt, C., & Sanchez, C. (2003). Protein-polysaccharide interactions: phase-ordering kinetics, thermodynamic and structural aspects. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 401-414.
- USP31. (2008). *The United States Pharmacopeia*. Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, Inc.: The National Formulary.

- Wagner, C. E., & McKinley, G. H. (2017). Age-dependent capillary thinning dynamics of physically-associated salivary mucin networks. *Journal of Rheology*, 61(6), 1309-1326.
- Wagner, C. E., Wheeler, K. M., & Ribbeck, K. (2018). Mucins and their role in shaping the functions of mucus barriers. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), 189-215.
- Wang, Y., Qin, B., Xia, G., & Choi, S. H. (2021). FDA's poly (lactic-co-glycolic acid) research program and regulatory outcomes. *The AAPS Journal*, 23(4), 1-7.
- Watts, P., & Smith, A. (2009). PecSys: in situ gelling system for optimised nasal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(5), 543-552.
- Wu, J., & Ma, G. H. (2016). Recent studies of Pickering emulsions: particles make the difference. *Small*, 12(34), 4633-4648.
- Wu, P. E., & Juurlink, D. N. (2017). Clinical review: loperamide toxicity. *Annals of Emergency Medicine*, 70(2), 245-252.
- Xie, Z., Chen, F., Li, W. A., Geng, X., Li, C., Meng, X., & Yu, F. (2017). A review of sleep disorders and melatonin. *Neurological Research*, 39(6), 559-565.
- Yang, X., Li, A., Li, D., Guo, Y., & Sun, L. (2021). Applications of mixed polysaccharide-protein systems in fabricating multi-structures of binary food gels—A review. *Trends in Food Science & Technology*, 109, 197-210.
- Yaqoob, K. A., Talegaonkar, S., Iqbal, Z., Jalees, A. F., & Krishan, K. R. (2006). Multiple emulsions: an overview. *Current Drug Delivery*, 3(4), 429-443.
- Yotsuyanagi, T., Ohkubo, T., Ohhashi, T., & Ikeda, K. E. (1987). Calcium-induced gelation of alginic acid and pH-sensitive reswelling of dried gels. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 35(4), 1555-1563.
- Zhang, J., Hwang, J., Antonietti, M., & Schmidt, B. V. (2018). Water-in-water pickering emulsion stabilized by polydopamine particles and cross-linking. *Biomacromolecules*, 20(1), 204-211.

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: an add-in program for modeling and comparison of drug dissolution profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263-271.

Zhao, M., Huang, X., Zhang, H., Zhang, Y., Gänzle, M., Yang, N., & Fang, Y. (2020). Probiotic encapsulation in water-in-water emulsion via heteroprotein complex coacervation of type-A gelatin/sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 105, 105790.

Índice de tablas

Tabla 1. Condiciones experimentales para la cuantificación de los principios activos.	91
Tabla 2. Polisacáridos y proteínas utilizados para la formación de emulsión, con su pKa y punto isoelectrico (pI), respectivamente.	96
Tabla 3. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y suero albúmina de bovino (BSA).	99
Tabla 4. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseína (C) y alginato (A).	103
Tabla 5. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y caseinato (C). ...	104
Tabla 6. Nomenclatura y composición de formulaciones de alginato (A) y caseinato con etanol (Ce).	106
Tabla 7. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato (C) y pectina (P).	107
Tabla 8. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato (C) y alginato (A). ...	113
Tabla 9. pH y conductividad de agua, PBS, y soluciones poliméricas preparadas en agua y PBS. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	116
Tabla 10. Viscosidad de soluciones poliméricas (C1,25, A2,75) y emulsiones del sistema alginato-caseinato (C1,25/A2,75) con la incorporación de clindamicina (CL2). Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s.	120
Tabla 11. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato- caseinato (C1,25/A2,75) con la incorporación de clindamicina (CL2) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	121
Tabla 12. Nomenclatura y composición de formulaciones del sistema alginato-caseinato con la incorporación de glucono-delta-lactona.	130
Tabla 13. Nomenclatura y composición de formulaciones del sistema alginato-caseinato con la incorporación de mucina.	133
Tabla 14. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato (C2,5/A2,5) con la incorporación de clindamicina (CL) y la adición de mucina (M) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	138
Tabla 15. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W según la localización del	

principio activo (fase interna o externa) para los sistemas C1.25/A2.75 y A0.25/C13.75: parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).....	146
Tabla 16. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de soluciones poliméricas de alginato (A) y caseinato (C) a dos concentraciones. Parámetros del modelo y criterios de selección del mismo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=3-4).....	148
Tabla 17. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de soluciones poliméricas de alginato (A) y caseinato (C), con la incorporación de mucina (M) como agente estabilizante. Parámetros del modelo y criterios de selección del mismo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (n=3-4).....	151
Tabla 18. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de MF observados, obtenidos a partir de una solución de MF en PBS (MF2) y de las emulsiones W/W para los sistemas C2MF2/A1,67 y C1MF2/A1,83; y A0,17MF2/C11 y A0,33MF2/C10. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).	155
Tabla 19. Nomenclatura y composición de formulaciones de caseinato con etanol (Ce) y alginato (A).	163
Tabla 20. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato/etOH (Ce2,25/A1,7) con la incorporación de melatonina (ML) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	167
Tabla 21. Propiedades de la nano-emulsión (NE) y la dispersión de nanopartículas (NPd)..	169
Tabla 22. Viscosidad de emulsiones del sistema alginato-caseinato/etOH (Ce2,25/A1,7) con la incorporación de melatonina (ML) y nanopartículas (NP) a diferentes semanas. Viscosidad	

(Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	174
Tabla 23. Nomenclatura y composición de formulaciones de pectina (P) y caseinato (C). ..	179
Tabla 24. Viscosidad de emulsiones del sistema pectina-caseinato (P0,25/C13,75 y C2,5/P2,5) con la incorporación de clindamicina (CL) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	183
Tabla 25. Viscosidad de emulsiones del sistema pectina-caseinato (P0,25/C13,75 y C2,5/P2,5) con la incorporación de metformina (MF) a diferentes semanas. Viscosidad (Pas) estudiado a tasa de deformación ($\dot{\gamma}$) de 25 y 50 1/s, $\Delta\eta$ diferencia porcentual entre el primer y último tiempo.	188
Tabla 26. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de CL observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W para los sistemas P2,5CL2/A2,5 y P0,25CL2/C13,75. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).....	191
Tabla 27. Parámetros obtenidos tras el ajuste de modelos cinéticos a los datos de liberación de MF observados, obtenidos a partir de las emulsiones W/W para los sistemas C2,5MF2/P2,5 y P0,25MF2/C13,75. Parámetros y criterios de selección del modelo (coeficiente de correlación entre los valores observados y los predichos R, y el criterio de información de Akaike, AIC). Los resultados se expresan como media \pm DE (n=3-4).....	194

Índice de figuras

Figura 1. Representación esquemática de formación y ruptura de emulsiones. En el estado I se representa una gota de gran tamaño (W) inmersa en un líquido (O), de área de A_1 , el borde de la esfera de W indica la tensión interfacial entre O y W, dado por γ_{ow} . En el estado II se representa múltiples gotas de W de área A_2 . Modificado de Tadros, 2013.	20
Figura 2. Representación esquemática de los mecanismos de desestabilización de emulsiones.	21
Figura 3. Ángulo de contacto a la izquierda y partículas adsorbidas en la interfase, entre dos fases. Adaptado de Wu y cols., 2016.	24
Figura 4. Diferentes situaciones generadas por la atracción o repulsión entre macromoléculas adaptada de Matalanis, Jones, & McClements, 2011.	26
Figura 5. Diagrama binario de una mezcla de caseína y alginato. Adaptado de Yang y cols., 2021.	27
Figura 6. Diagrama de fases del sistema gelatina/maltodextrina (pH \approx 5), observado a 50°C después de 5 días de equilibrio. L, fase líquida; S, fase sólida; Gel, gelatina; MD, maltodextrina [Beldengrün y cols, 2018].	28
Figura 7. Representación esquemática de separación de fases de mezclas de soluciones acuosas de polisacáridos y proteínas. En el tiempo se pueden obtener dos tipos de desestabilización: nucleación y crecimiento (NG, por el inglés "nucleation and growth") y deformación o descomposición espinodal (SD, por el inglés "spinodal descomposition") Adaptado de Turgeon, y cols., 2003.	29
Figura 8. Diagramas binarios del sistema alginato/caseína y caseinato. Figuras extraídas de (A) Diagrama del sistema alginato/caseína, pH 7,2 a 25°C, Sučkov, y cols., 1980; (B) Diagrama del sistema alginato/caseinato. pH 7 a temperatura ambiente, Capron, y cols., 2001; (C) Diagrama del sistema alginato/caseinato, pH 7 a 23°C, Antonov y Moldenaers, 2011; (D) Diagrama del sistema alginato/caseinato, pH 8 a 25°C, Maestro, y cols., 2020.	34
Figura 9. Diagramas binarios del sistema pectina/caseína y caseinato. Figuras extraídas de (A) Diagrama del sistema pectina/caseinato, pH 8 a 25°C, Maestro y cols., 2020; (B) Diagrama del sistema pectina/caseína, pH 7 a 45 °C, Rediguieri y cols., 2007.	35

Figura 10. Emulsiones W/W de carboximetil celulosa/gelatina a distintas concentraciones. Las bacterias se encuentran marcadas fluorescentemente con Syto9. Extraído de Singh y cols., 2018.....	36
Figura 11. Emulsiones del sistema proteína de soja/goma guar cargadas con riboflavina estabilizadas con partículas de zeína. La riboflavina se marcó fluorescentemente (color verde) al igual que la proteína de soja (color rojo, SPI-RITC). Extraído de Chen y cols, 2019.	37
Figura 12. Estructura química del hidroclicloruro de clindamicina.....	45
Figura 13. Estructura química del hidroclicloruro de metformina.....	46
Figura 14. Estructura química de la melatonina.....	47
Figura 15. Estructura química del alginato: (A) monómeros de alginato, (B) conformación de cadenas y (C) distribución en bloque. Extraído de Draget y Taylor, 2011.....	49
Figura 16. Ilustración del modelo de “caja de huevos” para gel de alginato de calcio y la interacción entre los cationes de calcio y los átomos de oxígeno (círculos negros) en los monómeros de ácido gulurónico. Extraído de Fu y cols., 2011.	50
Figura 17. Estructura química de la pectina [Sweetman, 2011].....	52
Figura 18. Estructura química de la caseína [NCBI, 2022].	54
Figura 19. Estructura tridimensional de la albúmina de suero de bovino [Tang y cols., 2020].	57
Figura 20. Representación esquemática de la mucina. (A) mucina secretada, (B) mucina anclada a membrana y (C) Red de gel de mucina [Wagner, 2018].....	58
Figura 21. Estructura química de glucono-delta-lactona y la formación de ácido glucónico en solución acuosa [Feiner, 2016].	60
Figura 22. Estructura química del isotiocianato de fluoresceína [Merck, 2017].....	65
Figura 23. Estructura química del Isotiocianato de rodamina [Merck, 2020].	66
Figura 24. Estructura química del PLGA.....	67
Figura 25. Unidades de filtrado centrífugo Centriprep® YM-3, 3 kDa.....	69
Figura 26. Homogenizador ULTRA-TURRAX® T-18 digital (IKA®).....	69
Figura 27. Rotavapor R-215 (Büchi®), acoplado a una bomba de vacío V-700 (Büchi®).....	70
Figura 28. Bomba peristáltica 323 DU (Watson-Marlow).	70
Figura 29. Homogeneizador ultrasónico portátil modelo UP200Ht (HIELSCHER).....	71

Figura 30. (A) pHmetro y conductímetro, Seven compact Duo, (B) electrodo de pH InLab® Expert Pro-ISM, (C) sonda de conductividad InLab®710, (Mettler Toledo).....	72
Figura 31. Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd.).	72
Figura 32. Micro-Raman confocal (Jobin-Yvon LabRam HR800), acoplado a un microscopio óptico (Olympus BXFM).	73
Figura 33. Reómetro HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific).	74
Figura 34. (A) microscopio óptico Leica DM1000 Led, (B) el microscopio óptico de fluorescencia Olympus BX54TRF-6, acoplada a una cámara digital Olympus DP73.....	75
Figura 36. El microscopio LSM 880 Airyscan (Zeiss).	75
Figura 36. Equipo de disolución Vision G2 Elite 8 con muestreo automático (Hanson).	76
Figura 37. Equipo de HPLC, Nexera series (Shimadzu).	77
Figura 38. Espectrofotómetro para Microplacas (Epoch™).....	78
Figura 39. Cabina de seguridad biológica de Clase II (Telstar).	79
Figura 40. Incubador de CO2 Heracell 150i (ThermoFisher Scientific).....	79
Figura 41. Centrífuga refrigerada Megafure 16R (Thermo Fisher Scientific).	80
Figura 42. Esquema de formación de una emulsión de caseinato en alginato, a partir de dos soluciones concentradas de los biopolímeros, mediante homogeneización por ultraturrax.	81
Figura 43. Ejemplo de nomenclatura de emulsiones.	84
Figura 44. Sistema de formación de nano-emulsión semi-automatizado. Consta de una bomba dosificadora que mueve la fase acuosa a un flujo fijo hacia el tubo en agitación en un vórtex, donde cae gota a gota, manteniendo una alta reproducibilidad.	88
Figura 45. Dispositivo del equipo de disolución Vision Elite con celda de inmersión (Hanson, Inc). Está formada por un anillo de retención que permite contener la muestra dentro del cuerpo de la celda, sobre la membrana de diálisis; todo es ajustado con la herramienta de alineación.	90
Figura 46. Reducción mitocondrial de MTT a formazan.....	92
Figura 47. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/BSA a 25 °C, preparadas con una solución de NaOH 0,1M a pH 13, y a diferentes concentraciones molares de NaCl.	100

Figura 48. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/BSA a 25 °C, preparadas con una solución de NaOH 0,1M NaCl 1M a pH 13. (A) A0,3/B8,3; (B) A1/B5; (C) B1,7/A1,7. FITC-BSA.	101
Figura 49. Emulsiones después de 24h de su preparación a 25 °C en PBS a pH 7,4.	103
Figura 50. Microfotografías (40x) del sistema alginato/caseína a 25 °C, preparadas en PBS. (A) C3/A1,4; (B) C2/A1,6; (C) C1/A1,8.....	104
Figura 51. Microfotografías (40x) del sistema alginato/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS. (A) A0,5/C12,5; (B), A1/C6; (C), C2,5/A2,5. FITC-caseinato.	105
Figura 52. Microfotografías (40x) del sistema Alginato/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS:etanol 70:30. (A) A0,5/Ce12,5; (B) A1/Ce6; (C) Ce2,5/A2,5.	106
Figura 53. Microfotografías (40x) del sistema pectina/caseinato a 25 °C, preparadas en PBS. (A) C1,25/P2,75; (B), C7,5/P3; (C), P0,25/C13,75. FITC-caseinato.....	107
Figura 54. Diagrama de fase en no equilibrio de alginato/caseinato (pH 7), observado a 25 °C después de 48 horas de preparación. El diagrama de fases se puede dividir en dos regiones: (I) una fase líquida y (II) dos fases líquidas. Se pueden obtener diferentes microestructuras: (A), C2,5/A2,5, emulsión de caseinato en alginato; (B) A1/C6, emulsión bicontinua; y (C) A0,5/C12,5, emulsión de alginato en caseinato. Los puntos indican las mezclas ensayadas. Estas microfotografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseinato marcado con FITC).....	110
Figura 55. Espectros confocales micro-Raman de caseinato de sodio, alginato de sodio y de muestras sólidas que aparecen en emulsiones después de 7 días de preparación a 25 °C. En * representa 3 picos propios del caseinato que se repiten con menor intensidad en las emulsiones y no en el alginato de sodio.	112
Figura 56. Micro (40x) y macrografía sistema alginato/caseinato con CL incorporada, 24 horas de su preparación. (A) C2,5CL2/A2,5; (B) C1,25CL2/A2,75; (C) A0,5CL2/C12,5; (D) A0,25CL2/C13,75.....	115
Figura 57. Efecto de hidrocloreuro de CL en el pH y conductividad a 25 °C, En agua (línea discontinua) y en PBS (línea continua). (A) CL en solución; (B) CL en solución de alginato al 0,5% en peso; (C) CL con caseinato al 2,5% en peso.	117

Figura 58. Micrografías de emulsión de caseinato en alginato (C1,25/A2,75) y emulsión de alginato en caseinato (A0,25/C13,75), con y sin CL, después de 24h y 1- 4 semanas después de su preparación.....	118
Figura 59. Recuento de gotas de las formulaciones C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75 con y sin CL conservadas a 25 ° C durante 4 semanas. Las formulaciones C1,25/A2,75 y A0,25/C13,75 después de una la semana hay menos de 300 gotas. El 100% indica una cantidad de 300 gotas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	119
Figura 60. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C.	120
Figura 61. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C1,25/A2,75 y C1,25CL2/A2,75; y (B) A0,25/C13,75 y A0,25CL2/C13,75.....	122
Figura 62. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G''), (A) C1,25/A2,75 y C1,25CL2/A2,75; y (B) A0,25/C13,75 y A0,25CL2/C13,75.	123
Figura 63. Efecto de hidrocioruro de MF en el pH y conductividad, en agua miliQ y solución de PBS a 25 °C. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	124
Figura 64. Aspecto microscópico (40x) y macroscópico de emulsiones del sistema alginato/caseinato con un 2% p/p de MF incorporada, después de 24 horas de su preparación. (A) C2,5MF2/A2,5; (B) A0,5MF2/C12,5; (C) C1,25MF2/A2,75; (D) A0,25MF2/C13,75.	125
Figura 65. Estabilidad de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 1 semana.	126
Figura 66. Recuento de gotas de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 1 semana. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	127
Figura 67. Solución concentrada de caseinato 12% con δ a diferentes concentraciones. (A) C12 δ 0, (B) C12 δ 1, (C) C12 δ 1.5.	128
Figura 68. Stock de alginato 2% con δ a diferentes concentraciones. (A) A2 δ 0,5, (B) A2 δ 1, (C) A2 δ 1,5, (D) A2 δ 2.	128
Figura 69. Microfotografías a 40x de emulsiones con la incorporación de gelificante 24 horas desde su preparación.....	130
Figura 70. Macro y microfotografías a 40x de emulsiones gelificadas.....	131
Figura 71. Microfotografía a 40X en microscopio confocal fluorescente de la incorporación de mucina marcada con rodamina (color rojo) y el caseinato marcado con fluoresceína (color	

verde). La emulsión C2,5/A2,5 se incorporó mucina a dos concentraciones (0,1 y 1% inicial) en la solución concentrada de caseinato, mientras que la emulsión A0,5/C12,5 se incorporó mucina en la solución concentrada de alginato.	134
Figura 72. Micrográficas a 40x de microscopio confocal fluorescente de la emulsión C2,5M0,16/A2,5. (A) Caseinato FITC, (B) mucina RhBITC, (C) merge y (D) Reconstrucción 3D.	135
Figura 73. Aspecto macroscópico de las emulsiones C2,3/A2,5 con la incorporación de CL (C2,5CL2/A2,5), mucina (C2,5M0,16/A2,5) y mucina + CL (C2,5CL2M0,16/A2,5) y recuento de gotas en función del tiempo a partir de microfotografías durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	136
Figura 74. Microfotografías de emulsiones C2,3/A2,5 con la incorporación de CL (C2,5CL2/A2,5), mucina (C2,5M0,16/A2,5) y mucina + CL (C2,5CL2M0,16/A2,5) durante 4 meses, los tubos de emulsión son de las 16 y 24 semanas de las emulsiones con mucina.	137
Figura 75. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) C2,5/A2,5, (B) C2,5M0,16/A2,5, (C) C2,5CL2/A2,5 y (D) C2,5CL2CL2M0,16/A2,5. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (E) C2,5/A2,5, (F) C2,5M0,16/A2,5, (G) C2,5CL2/A2,5 y (H) C2,5CL2CL2M0,16/A2,5.....	139
Figura 76. Porcentaje de hidrocloreto de CL cedido a 25 °C en PBS, a partir de la bolsa de diálisis (CL2 bolsa) en comparación la célula de inmersión (CL2 inmersión). Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	141
Figura 77. Porcentajes de hidrocloreto de CL cedidos a 25 °C en PBS en células de inmersión de las soluciones C2,5CL2 y C1,25CL2. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	142
Figura 78. Porcentajes de hidrocloreto de CL cedidos a través de la membrana de diálisis (célula de inmersión) de las emulsiones caseinato en alginato en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * Indica cambio en el orden de incorporación.	143
Figura 79. Porcentajes de hidrocloreto de CL cedidos a través de la membrana de diálisis (célula de inmersión) de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37	

°C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * Indica cambio en el orden de incorporación.	144
Figura 80. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.....	149
Figura 81. Porcentaje de hidrocloreuro de CL cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37 °C con y sin la incorporación de mucina. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	150
Figura 82. Porcentajes promedio de liberación observado en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.....	152
Figura 83. Porcentaje de hidrocloreuro de MF cedido a través de la membrana de diálisis de las emulsiones caseinato en alginato en solución de PBS 7,4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	153
Figura 84. Porcentaje de hidrocloreuro de MF cedido a través de la membrana de diálisis de las emulsiones alginato en caseinato en solución de PBS 7,4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	153
Figura 85. Porcentajes promedio de liberación observado en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los cuatro tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan desviación estándar.	156
Figura 86. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes diluciones de las emulsiones, expresadas en concentración p/p . Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$	158
Figura 87 Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+ DMEM, como controles en el test MTT. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0,05$	159
Figura 88. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p y controles con DMEM PBS+ DMEM. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$	160
Figura 89. Diagrama de fases del alginato / caseinato en PBS: etanol 70:30, observado a 25 ° C después de 7 días. El diagrama de fase se puede dividir en dos regiones: (I) monofásica,	

(II) multifásica. Dependiendo de las concentraciones de los diferentes biopolímeros: (A) Ce _{2,5} /A _{2,5} ; (B) A ₁ /Ce ₆ ; (C) A _{0,5} /Ce _{12,5} . Estas micrografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseína marcada con FITC).....	162
Figura 90. Micro (40x) y macrografía sistema alginato/caseinato en PBS:etOH con ML incorporada, 24 horas de su preparación. (A) Ce _{2,25} ML ₁ /A _{1,7} ; (B) Ce _{1,5} ML ₁ /A _{2,25} . ..	164
Figura 91. Recuento de gotas y microfotografías (40x) de formulaciones con y sin ML a 25 °C durante 16 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	165
Figura 92. Macro y microfotografías (40x) de formulaciones con y sin ML a 25 °C durante 16 semanas.....	166
Figura 93. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) Ce _{2,25} /A _{1,7} y (C) Ce _{2,25} ML ₁ /A _{1,7} . Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) Ce _{2,25} /A _{1,7} y (D) Ce _{2,25} ML ₁ /A _{1,7}	167
Figura 94. Imágenes de microscopio de fluorescencia confocal de emulsiones de caseinato en alginato 24 h después de la preparación. (A) El caseinato se marcó con FITC, (B) NP de PLGA cargadas con rodamina localizadas fase interna, (C) La imagen corresponde a la fusión de a) y b), (D) reconstrucción 3D de fusión de imágenes.	170
Figura 95. Recuento de gotas y microfotografías (40x) de formulaciones con ML y, con y sin nanopartículas a 25 °C durante 16 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	172
Figura 96. Macro y microfotografías (40x) de formulaciones con ML y, con y sin nanopartículas a 25 °C durante 16 semanas.....	173
Figura 97. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 °C, (A) Ce _{2,25} NP ₆ /A _{1,7} y (C) Ce _{2,25} ML ₁ NP ₆ /A _{1,7} . Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) Ce _{2,25} NP ₆ /A _{1,7} y (D) Ce _{2,25} ML ₁ NP ₆ /A _{1,7}	175
Figura 98. Porcentaje de ML cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C, durante 24 horas. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	176
Figura 99. Diagrama de fases del sistema de pectina/caseinato en PBS, observado a 25 °C después de 7 días. El diagrama de fases se puede dividir en dos regiones: (I) monofásica, (II) multifásica. (A), C _{1,66} /P _{2,5} , caseinato en pectina; (B) C _{7,5} /P ₃ , bicontinuo; y (C)	

P1,5/C11,25, pectina en caseinato. Estas micrografías se observaron mediante microscopía óptica de fluorescencia (caseína marcada con FITC).	178
Figura 100. Micro (40x) y macrografía sistema pectina/caseinato con CL incorporada, 24 horas de su preparación. (A) P0,25CL2/C13,75; (B) P0,5CL2/C12,5; (C) C5CL2/P2; (D) C2,5CL2/P2,5.	180
Figura 101. Recuento de gotas de formulaciones con y sin CL a 25 ° C durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	181
Figura 102. Microfotografías (40x) de formulaciones con y sin CL a 25 ° C durante 4 semanas.	182
Figura 103. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 ° C, (A) C2,5/P2,5 (C) P0,25/C13,75. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) P0,25/C13,75 y (D) C2,5/P2,5.	183
Figura 104. Micro (40x) y macrografía sistema pectina/caseinato con MF incorporada, 24 horas de su preparación. (A) P0,25MF2/C13,75; (B) P0,5MF2/C12,5; (C) C5MF2/P2; (D) C2,5MF2/P2,5.	185
Figura 105. Recuento de gotas de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 4 semanas. Los valores son medias de $n = 3 \pm DE$	186
Figura 106. Microfotografías (40x) de formulaciones con y sin MF a 25 ° C durante 4 semanas.	187
Figura 107. Viscosidad en función de la velocidad de cizallamiento a 25 ° C, (A) C2,5/P2,5 (C) P0,25/C13,75. Medidas oscilatorias dinámicas en función de la frecuencia, módulos de almacenamiento (G') y módulos de pérdida (G'') (B) P0,25/C13,75 (D) C2,5/P2,5.	189
Figura 108. Porcentaje de CL cedida a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	190
Figura 109. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan desviación estándar.	192
Figura 110. Porcentaje de MF liberada a través de la membrana de diálisis de las emulsiones en solución de PBS 7.4 a 37 °C. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$	193

Figura 111. Porcentajes promedio de liberación observada en los tiempos de muestreo y curva predicha para cada modelo ajustado, y para los dos tipos de emulsiones estudiadas. Las barras de error representan la desviación estándar.195

Figura 112. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$196

Figura 113. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+ DMEM, controles de las emulsiones. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$197

Figura 114. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con diferentes disoluciones de emulsión p/p. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$198

Figura 115. Viabilidad (en %) de las células HeLa, después de 24 h de incubación con DMEM PBS+ DMEM, controles de las emulsiones. Los valores son medias de $n = 4 \pm DE$. * $p \leq 0.05$198