



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi d'incorporació i alliberament de fàrmacs amb noves formes de dosificació basades en sistemes micro-nanoestructurats

Rosa María Aparicio Pelegrin



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

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

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**ESTUDI D'INCORPORACIÓ I ALLIBERAMENT DE FÀRMACS AMB
NOVES FORMES DE DOSIFICACIÓ BASADES EN SISTEMES
MICRO-NANOESTRUCTURATS**

ROSA MARIA APARICIO PELEGRÍN, 2020

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT
RECERCA, DESENVOLUPAMENT I CONTROL DE MEDICAMENTS

**ESTUDI D'INCORPORACIÓ I ALLIBERAMENT DE FÀRMACS AMB
NOVES FORMES DE DOSIFICACIÓ BASADES EN SISTEMES
MICRO-NANOESTRUCTURATS**

Memòria presentada per Rosa Maria Aparicio Pelegrín per optar al títol de Doctor per
la Universitat de Barcelona

María José García Celma
Directora i Tutora de la Tesi doctoral

Jordi Esquena Moret
Director de la Tesi doctoral

Rosa María Aparicio Pelegrín
Doctoranda

ROSA MARIA APARICIO PELEGRÍN, 2020

ÍNDEX

RESUM	1
INTRODUCCIÓ	7
1. POLÍMERS BIOCAMPATIBLES PER A LA PREPARACIÓ DE MATERIALS POROSOS	13
1.1. Polièstirè-Divinilbenzè (PS-DVB).....	14
1.2. Poliacrilamida (PAM)	16
1.3. Quitosan (QS).....	17
1.4. Àcid hialurònic (HA).....	20
2. MATERIALS POROSOS OBTINGUTS A PARTIR D'EMULSIONS ALTAMENT CONCENTRADES	23
3. L'ASSAIG DE DISSOLUCIÓ COM A EINA DE CONTROL DE QUALITAT DE NOVES FORMES FARMACÈUTIQUES.....	30
3.1. TIPUS D'APARELLS DE DISSOLUCIÓ	33
3.2. AUTOMATITZACIÓ DE L'EQUIP DE DISSOLUCIÓ.....	41
3.3. L'ASSAIG DE DISSOLUCIÓ COM A EINA DE CONTROL DE NOVES FORMES FARMACÈUTIQUES	44
OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	47
PART EXPERIMENTAL	51
1. MATERIALS	53
1.1. Principis actius.....	53
1.2. Excipients.....	58
1.2.1. Tensioactius	58
1.2.2. Monòmers, polímers, iniciadors de polimerització i agents de reticulació	63
1.2.3. Components oliosos	69
1.2.4. Components aquosos	72
1.3. Reactius analítics	72
1.4. Altres materials	75
2. INSTRUMENTS I APARELLS.....	75
3. MÈTODES	82
3.1. Mètodes per a la preparació de materials porosos	82
3.1.1. Preparació d'emulsions altament concentrades.....	82
3.1.2. Polimerització	84
3.1.3. Incorporació de polímer i reticulació a l'emulsió altament concentrada	85
3.1.4. Purificació i assecat dels monòlits	86
3.1.5. Modificació superficial dels materials mitjançant tecnologia de plasma	87
3.2. Caracterització dels materials porosos	88
3.2.1. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM).....	89
3.2.2. Determinació de la superfície específica i de la porositat.....	89
3.2.3. Determinació de l'angle de contacte.....	93
3.3. Mètodes per a la incorporació de principis actius	93
3.3.1. Mètode de degoteig	93

3.3.2. Mètode d'immersió	94
3.4. Determinació de la concentració dels principis actius.....	95
3.4.1. Determinació quantitativa del ketoprofèn.....	95
3.4.2. Determinació quantitativa del clorhidrat de clindamicina.....	96
3.4.3. Determinació quantitativa del sulfat de salbutamol.....	97
3.5. Mètodes per determinar l'alliberament de principis actius	97
3.5.1. Aparell 1 o mètode del cistell perforat.....	98
3.5.2. Aparell 2 o mètode de paletes amb bossa de diàlisi	100
3.5.3. Aparell 2 o mètode de paletes amb cel·la d'immersió.....	101
RESULTATS I DISCUSSIÓ	103
1. SELECCIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS I MÈTODES ANALÍTICS PER A LA SEVA QUANTIFICACIÓ	105
1.1. Solubilitat dels principis actius	105
1.2. Estabilitat de ketoprofèn.....	107
1.3. Validació del mètode analític per a la quantificació de ketoprofèn	108
2. SELECCIÓ, PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'EMULSIONS ALTAMENT CONCENTRADES	112
3. PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MATERIALS POROSOS.....	114
3.1. Preparació i caracterització de materials de Poliestirè-Divinilbenzè (PS-DVB).....	115
3.2. Preparació i caracterització de materials de Poliàcrilamida (PAM)	127
3.3. Preparació i caracterització de materials de Quitosan (QS).....	132
3.4. Preparació i caracterització de materials d'Àcid Hialurònic (HA)	136
4. INCORPORACIÓ DE FÀRMACS ALS MATERIALS POROSOS.....	142
5. ESTUDIS D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS DES DELS MATERIALS POROSOS	147
5.1. Estudis preliminars	148
5.2. Posada a punt de l'aparell de dissolució automatitzat pels assaigs de cessió	150
5.3. Alliberament de ketoprofèn, clorhidrat de clindamicina i sulfat de salbutamol ..	159
5.4. Selecció del dispositiu per introduir les mostres	162
5.5. Comparació de l'alliberament de KP des de materials porosos amb formes de dosificació comercials.....	165
5.6. Alliberament de ketoprofèn des de diferents materials polimèrics porosos	166
5.6.1. Alliberament de KP des de materials de PS-DVB	167
5.6.2. Alliberament de KP des de materials de PAM.....	169
5.6.3. Alliberament de KP des de materials de QS.....	170
5.6.4. Alliberament de KP des de materials de HA.....	172
5.7. Influència de la funcionalització dels materials de PS-DVB mitjançant tecnologia de plasma 174	
5.8. Influència de la concentració de principi actiu.....	176
CONCLUSIONS	179
BIBLIOGRAFIA.....	185

RESUM

Els materials porosos polimèrics, també denominats escumes sòlides, són materials sòlids de baixa densitat i elevat volum de porus. Són ben coneguts per la seva varietat d'aplicacions i constitueixen una part integral de diverses formes de dosificació. La xarxa porosa és important per determinar fenòmens relacionats amb l'administració de medicaments, tals com la dissolució, adsorció i difusió de fàrmacs. S'ha descrit l'ús de materials mesoporosos per incorporar i posteriorment alliberar diverses molècules d'interès farmacèutic i s'ha demostrat que molècules de diferents mides poden quedar atrapades als porus mitjançant un procés d'impregnació i alliberades a través d'un mecanisme controlat per difusió. En aquest context, els materials porosos tenen característiques molt interessants com són superfícies elevades, mida de porus ajustable amb una baixa polidispersitat i propietats superficials ben definides, permetent així l'adsorció i alliberament de certs tipus de fàrmacs d'una manera més reproduïble i predictable.

La majoria de mètodes per fabricar materials porosos donen lloc a estructures poroses jeràrquiques, però són processos laboriosos amb diverses etapes i, per aplicacions industrials es requereixen mètodes més simples. Com a alternativa als mètodes convencionals es poden obtenir materials porosos mitjançant sistemes col·loïdals, generant un sistema bifàsic i polimeritzant posteriorment la fase externa. Les entitats col·loïdals serveixen per a formar la porositat en el material final i després són eliminades del sistema. Depenent de la naturalesa del sistema col·loïdal (emulsions, microemulsions, etc.), la grandària dels porus generats pot ser des de nanòmetres fins a centenars de micres.

En aquesta tesi doctoral s'han seleccionat quatre polímers biocompatibles per desenvolupar materials nanoestructurats a partir d'emulsions altament concentrades: poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), poliacrilamida (PAM), quitosan (QS) i àcid hialurònic (HA). Els materials de poliestirè-divinilbenzè i els de poliacrilamida s'han obtingut mitjançant una reacció de polimerització de l'estirè amb divinilbenzè en el primer cas i d'acrilamida i bisacrilamida en el segon cas, fent servir com a plantilla (*template*) l'estructura de les emulsions altament concentrades. Per a l'obtenció de materials de poliestirè-divinilbenzè s'han emprat emulsions altament concentrades W/O i pels

materials de poliacrilamida, emulsions O/W, degut a les diferents solubilitats de l'estirè i l'acrilamida en els components de les emulsions i per afavorir les reaccions de polimerització a la fase externa. Els altres polímers s'han incorporat directament preformats a les emulsions O/W i s'han utilitzat agents reticulants (*cross-linkers*) per mantenir l'estructura. El reticulant emprat pel quitosan ha estat la genipina i per a l'àcid hialurònic, el butandiol diglicidil éter (BDDE).

La caracterització d'aquests nous materials i l'estudi de la incorporació de fàrmacs i la cinètica d'alliberament és fonamental pel desenvolupament de formes farmacèutiques segures i eficaces. És per això que s'ha desenvolupat un sistema de control senzill basat en l'equip de dissolució que ens ha permès comparar les característiques dels diferents materials sense haver de recórrer a tècniques complexes que suposarien un cost excessiu per a la fabricació industrial d'aquests nous materials per a ús farmacèutic.

S'han preparat materials porosos de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), partint d'emulsions altament concentrades W/O preparades pel mètode PIT o pel mètode de les addicions successives. Les diferents característiques de les emulsions i dels materials obtinguts han permès comprovar que les emulsions efectivament han servit de plantilla per a l'estructura porosa dels materials, obtenint-se porus més petits i homogenis quan les emulsions es preparen pel mètode PIT. És possible augmentar la hidrofília de la superfície d'aquests materials hidrofòbics amb un tractament amb plasma atmosfèric a baixa temperatura.

Les escumes sòlides que s'han format per polimerització de monòmers a la fase continua de l'emulsió altament concentrada, materials de PS-DVB i PAM, tenen una estructura més compacta i els porus són més ordenats i interconnectats. Quan es produeix la polimerització en un sistema col·loidal compartimentat, la reacció té lloc d'una manera més ordenada i les estructures que es formen tenen un grau d'ordenació més elevat. Els materials obtinguts conserven l'estructura de l'emulsió, són majoritàriament macroporosos, amb més d'un 90% de porositat, i tenen una baixa densitat. Els resultats de porosimetria han evidenciat la possibilitat de modificar les característiques dels

materials porosos, mida de por i superfície específica, mitjançant canvis en la mida de gota de l'emulsió de partida, per canvis en la composició o en el mètode de preparació.

Els resultats obtinguts en l'estudi dels mètodes d'incorporació de principis actius als monòlits han permès comprovar que es pot realitzar una impregnació eficient, uniforme i en profunditat dels monòlits hidròfobs de PS-DVB i QS pel mètode d'immersió en una solució hidroalcohòlica d'aigua/etanol (1:1, p/p). El mètode de degoteig es va reservar pels materials d'HA degut a la seva fragilitat. També s'ha comprovat que les solucions més concentrades en principi actiu permetien la incorporació de quantitats més elevades de fàrmac.

La posada a punt d'una metodologia per a la presa de mostres de manera automàtica amb l'equip de dissolució ha permès establir les condicions per a un mostreig fiable i reproduïble, per realitzar els assaigs d'alliberament de fàrmacs des dels materials polimèrics. L'automatització de l'equip ha permès assajar varies mostres simultàniament i obtenir resultats més fiables. Els dispositius basats amb bossa de diàlisi, cel·la d'immersió i cistell perforat (mètode 1 de la Real Farmacopea Española) són adequats per avaluar la cessió de principis actius des de materials porosos polimèrics fins una solució receptora; no obstant, aquest darrer mètode té l'avantatge de que l'alliberament es realitza directament a la solució receptora sense interferència de cap membrana i és el més adient per comparar diferents materials o diferents principis actius.

Les escumes sòlides hidròfobes de PS-DVB produeixen un alliberament retardat de fàrmacs lipòfils com el ketoprofèn (KP) i afecten en menor grau a la cessió de fàrmacs hidròfils com el clorhidrat de clindamicina i el sulfat de salbutamol, que queden menys retinguts pel material porós. El retard en l'alliberament de KP des dels materials hidròfobs és molt significatiu en comparació amb formes sòlides orals comercialitzades d'aquest mateix principi actiu. La retenció dels fàrmacs pels materials porosos estudiats està influenciada per l'estructura de l'emulsió que ha fet de plantilla perquè condiciona la morfologia de l'estructura porosa, per la composició dels materials porosos i la seva afinitat pels principis actius incorporats i per la rigidesa o fragilitat dels materials, que

condiciona els mètodes per a la seva impregnació. Considerar aquestes característiques permetrà modular les propietats de les escumes sòlides per adaptar-les als perfils de cessió més adequats per cada principi actiu.

INTRODUCCIÓ

L'objectiu principal de la Tecnologia farmacèutica és el disseny, la fabricació i el control de formulacions farmacèutiques, considerades com el producte resultant del procés tecnològic que confereix als medicaments les característiques adequades per facilitar la seva administració, assegurar la dosificació correcta i aconseguir una eficàcia terapèutica òptima (Domínguez-Gil & Martín, 2004). L'alliberament de fàrmacs és un àmbit d'investigació fonamental en Farmàcia i altres ciències relacionades amb la salut i la qualitat de vida. Els tractaments farmacològics per guarir o alleujar alteracions patològiques de l'organisme requereixen que la molècula activa administrada assoleixi la biofase o lloc d'acció. La rapidesa amb la qual el fàrmac accedeix a la zona patològica objecte del tractament depèn de la via d'administració i la durada de l'acció està condicionada per la forma de dosificació emprada. Per això, en el camp de la Tecnologia farmacèutica, és de gran importància el disseny de noves formulacions que permetin augmentar el rendiment terapèutic del fàrmac ampliant el seu temps de permanència a la biofase i, a més, permetin pautes de dosificació que redueixin al màxim els efectes adversos i afavoreixin l'adherència al tractament per part del malalt. Les formes farmacèutiques d'alliberament controlat compleixen aquestes condicions i són objecte preferent en la recerca i el desenvolupament farmacèutic (Allen & Curtis, 2004).

L'objectiu de l'alliberament controlat és aconseguir la quantitat necessària d'un fàrmac en el moment adequat i en el lloc precís (Zhang, Fai, & Leong, 2013). En un sistema d'alliberament controlat, el fàrmac s'incorpora a una formulació, que és un suport generalment constituït per un material polimèric. La velocitat d'alliberament del fàrmac des d'aquest sistema al medi que l'envolta ve determinada per les propietats del fàrmac i de la formulació, però també per factors ambientals com poden ser el pH, la temperatura i la composició dels teixits o les cèl·lules de l'organisme (Peppas N. , 2013). Depenent del fàrmac i de la patologia a tractar interessarà que l'alliberament tingui el perfil cinètic més adequat. Entre els avantatges dels sistemes polimèrics d'alliberament controlat de fàrmacs cal destacar: a) el manteniment de concentracions plasmàtiques de manera continuada durant l'interval terapèutic desitjat, disminuint així el nombre d'administracions, b) la reducció dels efectes adversos derivats d'un metabolisme massa ràpid o de la sobredosificació, c) la protecció del fàrmac d'una ràpida degradació química i la vectorització al lloc d'acció evitant efectes indesitjables en altres llocs de l'organisme

i d) l'aprofitament eficaç del fàrmac que permet reduir la dosi a administrar. Els sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs basats en materials polimèrics es poden classificar en tres tipus: sistemes polímer-fàrmac conjugat, sistemes reservori, i sistemes matricials (Yang & Pierstorff, 2012). Als sistemes polímer-fàrmac conjugat, el fàrmac es troba unit covalentment al polímer de manera que en aquest sistema, tant la velocitat com el temps d'alliberament del fàrmac es troba regulat per l'entorn del polímer, ja que cal una degradació d'aquest per al seu alliberament. Els sistemes reservori es poden dividir en dues parts, una part interior on es troba el fàrmac, i una altra part perifèrica on es troba el polímer, que serà el responsable de controlar l'alliberament. En aquests sistemes el fàrmac es troba encapsulat en la part interna, de manera que el seu alliberament estarà condicionat per les característiques i propietats de la coberta polimèrica i pel seu gruix. Finalment, als sistemes matricials el fàrmac es troba homogèniament distribuït dins de la matriu polimèrica, i l'alliberament dependrà de l'estructura de la matriu polimèrica.

La nanotecnologia aplicada al camp farmacèutic ha permès el desenvolupament de noves formes de dosificació basades en sistemes col·loïdals. Les tecnologies de nanofabricació, *top-down* i *bottom-up*, han proporcionat sistemes d'alliberament de fàrmacs més eficients, controlant la mida i la forma dels materials obtinguts (Zhang, Fai, & Leong, 2013). La interacció de farmacèutics, enginyers, químics, físics i metges, entre d'altres, ha afavorit el disseny de nous sistemes d'alliberament de fàrmacs estudiant els fenòmens de transport a través de materials avançats en diferents condicions de contorn, obtenint nous dispositius i perfils cinètics inesperats (Sharp & Langer, 2011). Les innovacions en química de materials han afavorit el desenvolupament de nous sistemes terapèutics (*drug delivery systems*), creant vehicles biodegradables, biocompatibles que permeten la vectorització (*targeting*) i que poden controlar l'alliberament de la molècula activa en funció d'estímuls del medi (Torchilin, 2012). En els últims anys, la nanotecnologia ha revolucionat conceptualment l'administració de fàrmacs, permetent millors índexs terapèutics, que es tradueixen en una millora de l'activitat farmacològica disminuint la toxicitat, així com la vectorització de fàrmacs a teixits i cèl·lules. No obstant això, l'estudi dels sistemes nanoestructurats, la correcta caracterització, i l'estudi de la cinètica d'alliberament i la biodistribució dels fàrmacs és el que permet el disseny òptim d'aquestes noves formes farmacèutiques (Couvreur,

2013). Sovint la caracterització i el control de qualitat dels nanosistemes terapèutics és difícil i econòmicament insostenible i aquest fet retarda considerablement l'aprovació de noves formes farmacèutiques per part de les agències del medicament (Fornaguera, et al., 2015). El desenvolupament de nous sistemes nanoestructurats d'alliberament controlat de fàrmacs, com ara les emulsions altament concentrades i, a partir d'elles, els materials porosos, basats en polímers biocompatibles, la caracterització i l'estudi de la incorporació de fàrmacs a aquests nous materials i la cinètica d'alliberament han estat objecte de la present tesi doctoral.

Les emulsions altament concentrades, també anomenades HIPREs (*High Internal Phase Ratio Emulsions*) (Princen, 1983) o emulsions-gel (Solans, Comelles, Azemar, Sánchez Leal, & Parra, 1986), són emulsions on la fracció de volum de la fase dispersa és superior a 0,74, valor corresponent a l'empaquetament màxim d'esferes monodisperses. Presenten unes propietats reològiques, estructurals i òptiques característiques a causa del seu alt contingut de fase dispersa. La seva estructura consisteix en un empaquetament de gotes en forma polièdrica separades per una fina capa de fase contínua que pot tenir, alhora, una estructura de microemulsió o de cristall líquid (Kunieda, Solans, Shida, & Parra, 1987), (Solans, Esquena, Azemar, Rodríguez, & Kunieda, 2004). Depenent de la fracció de volum de la fase dispersa, temperatura, etc., el seu comportament reològic pot passar d'elàstic a viscoelàstic (Pons, et al., 1993). Les emulsions altament concentrades són d'interès per a un gran nombre d'aplicacions: en indústria alimentària, en formulacions cosmètiques, com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs (Calderó, Patti, Llinàs, & García-Celma, 2012) i com a plantilles per a la preparació de materials porosos polimèrics (Ruckenstein & Park, 1992), (Williams & Wroblewski, 1988), (Bonilla, Arias, Solans, & García-Celma, 2018), (Roig, Blanzat, Solans, Esquena, & García-Celma, 2018) i partícules. Els materials porosos estructurats suposen una innovació galènica com a sistemes d'administració de fàrmacs i també com a materials filtrants. La utilització d'emulsions altament concentrades com a plantilla per a l'obtenció de materials porosos permet el control de la mida i de la forma dels porus (Esquena, Sankar, & Solans, 2003), (Blin, Bleta, Ghanbaja, & Stébé, 2006), (Canal, Aparicio, Vílchez, Esquena, & García-Celma, Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams, 2012). Les escumes polimèriques sòlides de baixa densitat, amb

macroporus interconnectats es poden obtenir per la polimerització o la deposició polimèrica en la fase contínua d'emulsions altament concentrades. Quan el procés té lloc en la fase interna, és possible obtenir material en forma de partícules. En aquest sentit, el nostre grup d'investigació ha estat pioner en el desenvolupament de materials meso/macroporosos a partir d'emulsions altament concentrades de fase externa aquosa i oliosa per a diferents aplicacions industrials (Esquena & Solans, 2006).

S'han seleccionat quatre polímers biocompatibles per desenvolupar materials nanoestructurats a partir d'emulsions altament concentrades: poliestirè-divinilbenzè, poliacrilamida, quitosan i àcid hialurònic. Els materials de poliestirè-divinilbenzè i els de poliacrilamida s'han obtingut mitjançant una reacció de polimerització de l'estirè amb divinilbenzè en el primer cas i d'acrilamida i bisacrilamida en el segon cas, fent servir com a plantilla (*template*) l'estructura de les emulsions altament concentrades. Per a l'obtenció de materials de poliestirè-divinilbenzè s'han emprat emulsions altament concentrades W/O i pels materials de poliacrilamida, emulsions O/W, degut a les diferents solubilitats de l'estirè i l'acrilamida en els components de les emulsions i per afavorir les reaccions de polimerització a la fase externa. Els altres polímers s'han incorporat directament preformats a les emulsions i s'han utilitzat agents reticulants (*cross-linkers*) per mantenir l'estructura. El reticulant emprat pel quitosan ha estat la genipina i per a l'àcid hialurònic, el butandiol diglicidil éter (BDDE).

En la present tesi doctoral s'han preparat emulsions altament concentrades, W/O i O/W, basades en poliestirè-divinilbenzè, poliacrilamida, quitosan-genipina i àcid hialurònic-BDDE, com a sistemes d'alliberament de fàrmacs hidròfils i lipòfils; a partir d'aquestes emulsions altament concentrades s'han preparat materials porosos. La caracterització d'aquests nous materials, l'estudi de la incorporació de fàrmacs i la cinètica d'alliberament és fonamental pel desenvolupament de formes farmacèutiques segures i eficaces. És per això que s'ha desenvolupat un sistema de control senzill basat en l'equip de dissolució que ens ha permès comparar les característiques dels diferents materials sense haver de recórrer a tècniques complexes que suposarien un cost excessiu per a la fabricació industrial d'aquests nous materials per a ús farmacèutic.

En l'apartat d'introducció d'aquesta tesi doctoral es descriuen els polímers biocompatibles emprats (poliestirè-divinilbenzè, poliacrilamida, quitosan i àcid hialurònic) amb els que s'han preparat emulsions altament concentrades com a plantilla per a la preparació de materials porosos (Capítol 1). Així mateix, s'explicaran les propietats característiques de les emulsions altament concentrades i dels materials meso/macroporosos i les seves potencials aplicacions farmacèutiques (Capítol 2). Per a l'estudi de l'alliberament de fàrmacs s'ha emprat un equip de dissolució automatitzat com una eina pel control de qualitat d'aquests nous materials, i per això es farà una revisió de l'aplicació d'aquest equip pel control de qualitat de formes farmacèutiques (Capítol 3).

1. POLÍMERS BIOCAMPATIBLES PER A LA PREPARACIÓ DE MATERIALS POROSOS

Els materials polimèrics s'utilitzen en molts productes farmacèutics i constitueixen components essencials de les formes farmacèutiques d'alliberament modificat. Per això és important conèixer les propietats dels polímers i els seus mètodes de caracterització per dissenyar sistemes d'alliberament de fàrmacs i desenvolupar correctament els processos de fabricació (Brady, Dürig, Lee, & Li, 2017). Els polímers s'utilitzen normalment com a excipients encara que algunes vegades els mateixos principis actius tenen estructura polimèrica. La selecció dels excipients per a una determinada aplicació dependrà de l'aplicació terapèutica, de la via d'administració, de la forma farmacèutica, del perfil d'alliberament del fàrmac i també del cost, la disponibilitat i la complexitat de les operacions bàsiques necessàries per a la seva producció.

En aquesta tesi doctoral s'han seleccionat polímers biocompatibles amb diferents propietats fisicoquímiques per a la preparació de materials meso/macroporosos a partir d'emulsions altament concentrades, que es descriuen a continuació. Els polímers seleccionats han estat el poliestirè-divinilbenzè, amb propietats hidrofòbiques, que s'ha obtingut per la copolimerització de l'estirè i el divinilbenzè; la poliacrilamida, de naturalesa hidrofílica, obtingut per la copolimerització de l'acrilamida i la bis-acrilamida;

el quitosan, un biopolímer que s'ha reticulat amb genipina i l'àcid hialurònic, un altre biopolímer que s'ha reticulat amb BDDE.

1.1. Poliestirè-Divinilbenzè (PS-DVB)

El poliestirè-divinilbenzè és un copolímer hidròfob que s'obté a partir de l'estirè i el divinilbenzè.

L'estirè és un compost orgànic derivat del benzè. És un líquid incolor d'aroma dolça que s'evapora fàcilment. Es troba de manera natural a algunes plantes i aliments, tals com els grans de cafè, cacauets, canyella, i també al coaltar (Steele, et al., 1994). La presència del grup vinil permet la polimerització donant lloc a poliestirè i a diversos copolímers, com el poliestirè-divinilbenzè. L'estirè és cancerigen (Kogevinas, et al., 2018) i neurotòxic (Cherry & Gautrin, 1990).

El divinilbenzè (DVB) consisteix en un anell benzènic unit a dos grups vinil. Està relacionat químicament amb l'estirè (vinilbenzè) del que es diferencia únicament per un grup vinil. L'estirè i el divinilbenzè reaccionen per formar el copolímer estirè-divinilbenzè (PS-DVB) (**Figura 1**), que s'utilitza principalment per a la producció de resines de bescanvi iònic (D. H. James, 2005). Les resines de bescanvi iònic s'utilitzen per emascarar sabors, estabilitzar fàrmacs, com a sistemes d'alliberació controlada o per obtenir cinètiques d'alliberament d'ordre zero degut a la seva elevada capacitat d'inflament en medi aquós (Elder, 2005), (Guo, Chang, & Hussain, 2009).

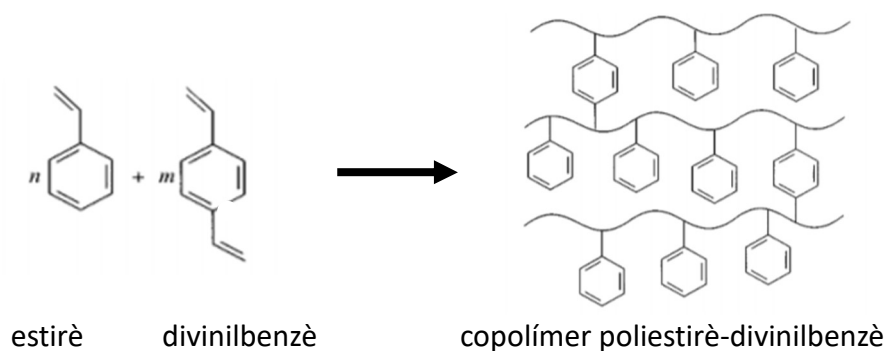


Figura 1. Polimerització d'estirè amb divinilbenzè

El procés de polimerització dona lloc a la formació d'un copolímer constituït per una xarxa infinita de molècules d'estirè i divinilbenzè entrecruades (**Figura 1**). En general, la reacció es produeix quan el doble enllaç del divinilbenzè reacciona. Inicialment es tracta d'un fenomen local acompanyat per la formació de petites partícules de microgel. Després, les molècules creixents del copolímer que estan dissoltes a la solució s'entrecruen en una xarxa infinita i el sistema assoleix el punt de gel. Si la polimerització té lloc en un recipient s'anomena polimerització en massa i en aquest moment el copolímer es converteix en un monòlit (gel tou) que omple l'espai disponible en el recipient. Finalment, los comonòmers líquids són consumits i s'obté un monòlit amb una estructura força rígida i uniforme (**Figura 2**) (Montoya, 2013).



Figura 2. Polimerització en massa per a l'obtenció de monòlits.

Per a la polimerització de l'estirè amb el divinilbenzè cal la presència d'un iniciador de la reacció, que en aquest treball ha estat el persulfat de potassi ($K_2S_2O_8$), que és un iniciador inorgànic soluble en aigua (Yohanala, Dewa, Quarta, Winardi, & Winardi, 2015). L'iniciador no és un catalitzador, ja que aquest roman inalterat durant la reacció. És una substància que es descompon a l'aigua formant "radicals" molt actius. La reactivitat es transfereix a una partícula de monòmer, la qual a la vegada podrà sumar-se a una altra partícula de monòmer sense perdre la seva reactivitat, iniciant la reacció en cadena. En aquesta tesi doctoral, la reacció de polimerització ha tingut lloc a la fase externa d'una emulsió altament concentrada W/O. D'aquesta manera s'ha obtingut un monòlit porós, corresponent els porus a l'espai ocupat per les gotes aquoses de l'emulsió. La completa polimerització de l'estirè evita la presència de monòmers lliures que podrien produir toxicitat.

1.2. Poliacrilamida (PAM)

Els polímers sintètics basats amb l'àcid acrílic, especialment els àcids metacrílics, s'utilitzen en nombroses formulacions farmacèutiques, per protegir els principis actius, com a recobriments pel·liculars, en sistemes d'alliberació controlada i en sistemes reservori formant matrius polimèriques o membranes de difusió (Brady, Dürig, Lee, & Li, 2017). Poden tenir naturalesa aniònica, catiònica o no iònica.

La poliacrilamida s'obté per la copolimerització de l'acrilamida amb bis-acrilamida (N,N'-metilen-bis-acrilamida) (**Figura 3**). La reacció és una polimerització per addició de vinil iniciada per un sistema generador de radicals lliures, com és el persulfat. Els radicals lliures de persulfat transformen els monòmers d'acrilamida en radicals lliures que reaccionen amb monòmers inactivats per començar la reacció de polimerització en cadena (Shi & Yackowsky, 1998). La reticulació de les xarxes polimèriques fa que els hidrogels de poliacrilamida tinguin propietats de sòlid, conferint-los una gran varietat de propietats mecàniques (Li & Mooney, 2016). L'acrilamida forma polímers lineals i la bis-acrilamida produeix l'entrecreuant entre cadenes de poliacrilamida. Les cadenes polimèriques formades s'entrecreuen a l'atzar mitjançant la bis-acrilamida, donant lloc a una estructura en forma de gel amb una porositat característica, que dependrà de les condicions de la polimerització i de la concentració dels monòmers. La mida dels porus formats ve determinada per la relació acrilamida/bis-acrilamida i per la concentració d'acrilamida.

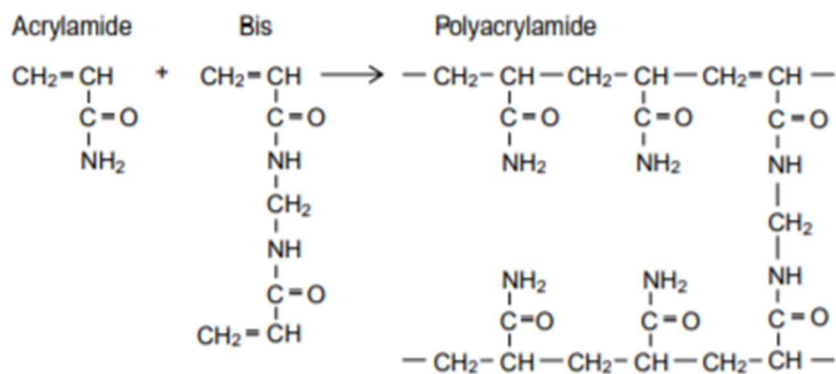


Figura 3. Polimerització de l'acrilamida amb bis-acrilamida.

La poliacrilamida és un biomaterial que s'ha utilitzat en diverses aplicacions biomèdiques, tals com implants, lents de contacte toves i sistemes d'alliberament de fàrmacs, ja que presenta les característiques adequades per estar en contacte amb teixits o amb fluids biològics (Peppas & Hoffman, 2013). Els gels de poliacrilamida s'han utilitzat per a la separació d'àcids nucleics i proteïnes mitjançant electroforesi, en funció del pes molecular i del grau d'ionització de les molècules a separar. També s'han estudiat gels de poliacrilamida per a l'alliberament controlat de principis actius (Ferreira, Vidal, & Gil, 2001), ja que presenten els avantatges del baix cost, preparació senzilla i habilitat per controlar les propietats de difusió del principi actiu. Cal tenir en compte que el monòmer d'acrilamida pot produir neurotoxicitat en humans (Zamani, Shokrzadeh, Fallah, & Shaki, 2017), pel que és molt important assegurar que després de la reacció de polimerització per obtenir poliacrilamida, no queden residus lliures d'acrilamida.

1.3. Quitosan (QS)

El quitosan és un disacàrid policatiònic lineal producte de la desacetilació parcial de la quitina (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009). És el disacàrid natural més abundant després de la cel·lulosa. En la naturalesa, es troba en l'exoesquelet d'insectes, crustacis i parets cel·lulars de fongs. Està compost per dues unitats diferents, la D-glucosamina i la N-acetil-D-glucosamina distribuïdes aleatòriament pel polímer. Les dues unitats estan enllaçades entre si mitjançant un enllaç β - (1-4). Té una naturalesa catiònica que és inusual, perquè la gran majoria dels polisacàrids són normalment neutres o tenen càrrega negativa en medi àcid. Aquesta propietat li permet formar complexos electrostàtics o estructures multicapa amb altres polímers naturals o sintètics que tinguin càrrega negativa (Ways, Lau, & Khutoryanskiy, 2018). La unitat estructural del quitosan es mostra a la **Figura 4**.

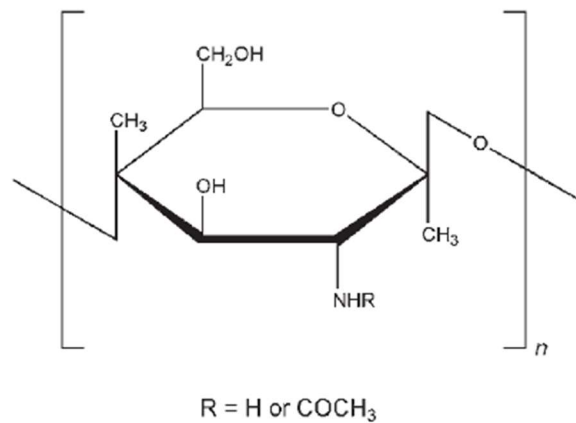


Figura 4. Fórmula estructural del quitosan (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009).

Les propietats que presenta el quitosan són de gran interès per aplicacions biomèdiques: té activitat antibacteriana, és biocompatible, biodegradable, no és tòxic i absorbeix la humitat. A més, té activitat analgèsica, antitumoral, hemostàtica, hipocolesterolèmica, antimicrobiana i antioxidant (Kim, 2018), (Islam, Bhuiyan, & Islam, 2017).

El quitosan s'utilitza en tecnologia farmacèutica com a agent de recobriment, disgregant, filmògen, mucoadhesiu, aglutinant en comprimits i viscositzant (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009). Forma part de nombrosos productes cosmètics i s'ha proposat en diverses aplicacions farmacèutiques, tals com sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs, formulacions mucoadhesives, d'alliberació ràpida, de vehiculació de pèptids, d'alliberació al colon i en teràpia gènica. Forma part de gels, recobriments pel·liculars, microesferes, comprimits, recobriments per liposomes, etc. (Shariatnia, 2019). S'ha demostrat la seguretat del quitosan com a excipient administrat per vies no parenterals, sense contacte directe amb la sang; no obstant, cal fer més estudis per demostrar la seva seguretat per via parenteral degut a la seva potencial influència en la coagulació de la sang (Baldrick, 2010). S'ha utilitzat en nombroses investigacions biomèdiques i farmacèutiques amb diferents finalitats (Li, et al., 2018). Cal destacar la seva aplicació formant part d'un composite per a l'alliberament sostingut d'ibuprofèn (Kamari & Ghiaci, 2016), com a material mesoporós per eliminar ions Pb(II) (Wen, et al., 2016) i en l'obtenció de escumes poroses utilitzant emulsions altament concentrades com a plantilla (Miras, Vílchez, Solans, & Esquena, 2013).

En aquest treball s'han preparat materials porosos de quitosà a la fase aquosa d'emulsions altament concentrades. Per això s'ha entrecruat amb un reticulat d'origen natural que és la genipina. Aquesta molècula no és tòxica i és biocompatible (Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010). La reacció de reticulació (**Figura 5**) té lloc quan el grup carboximetil de la genipina s'enllaça amb l'amina primària del quitosan, formant una amina secundària. Després, es produeix un atac nucleofílic del grup amino del quitosan al carboni C-3 de la deoxiglanina aglicona, seguit per l'obertura de l'anell de l'hidropirano, per formar una amina heterocíclica (Muzzarelli, El Mehtedi, Bottegoni, Aquili, & Gigante, 2015). És una reacció que s'aprecia pel canvi de color de la mostra, que una vegada reticulada pren un color blau característic de la genipina.

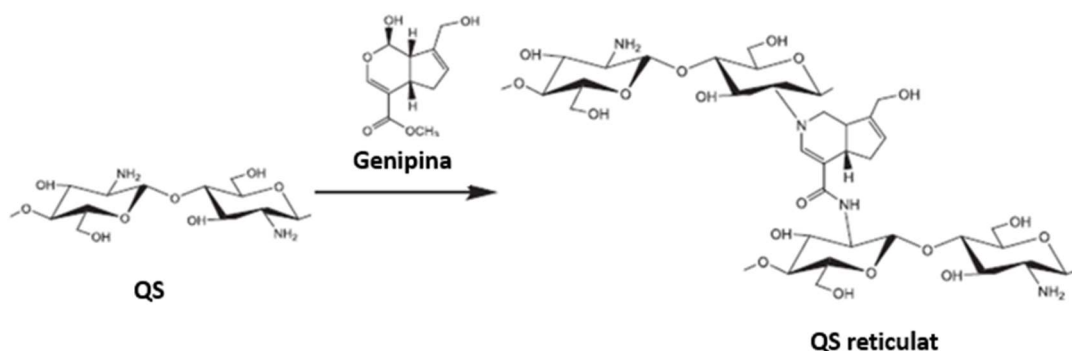


Figura 5. Reticulació del quitosan (QS) amb genipina.

Les aplicacions més importants del quitosan reticulat amb genipina són la preparació de substituïts elàstics de cartílag, vehicles per a l'alliberament controlat de fàrmacs, encapsulació de biomolècules i cèl·lules, biofabricació de teixit muscular i parets arterials i productes sanitaris per curació de ferides. La genipina ha substituït glutaraldehid i altres agents reticulants degut a les seves propietats bioquímiques i per la seguretat que comporta la seva manipulació, la seva biocompatibilitat, el seu fàcil control de qualitat i la possibilitat d'obtenir el quitosan reticulat garantint l'absència de citotoxicitat (Muzzarelli, El Mehtedi, Bottegoni, Aquili, & Gigante, 2015).

1.4. Àcid hialurònic (HA)

L'àcid hialurònic (HA), també conegut com hialuronà (Balazs, Laurent, & Jeanloz, 1986), és un polisacàrid lineal que pertany a la família dels glicosaminoglicans i consisteix en la repetició d'una unitat de disacàrid amb la següent fórmula general: sucre àcid- amino sucre. L'amino sucre del HA és la n-acetilglucosamina, que és un monosacàrid derivat de la glucosa i consisteix en una amida formada de la glucosamina i l'àcid acètic. El sucre àcid del HA és l'àcid glucurònic, que és un àcid carboxílic amb una estructura similar a la de la glucosa però amb un grup carboxílic en el sisè carboni. La n-acetilglucosamina i l'àcid glucurònic s'uneixen mitjançant enllaç glicosídic $\beta[1-4]$ tal i com s'observa en la **Figura 6**. L'HA consisteix en la repetició d'aquest disacàrid unit mitjançant enllaç glicosídic $\beta[1-3]$. L'HA pot arribar a pesos moleculars de fins a 10.000 kDa, essent un dels components més grans dels que forma part la matriu extracel·lular (Price & Berry, 2007).

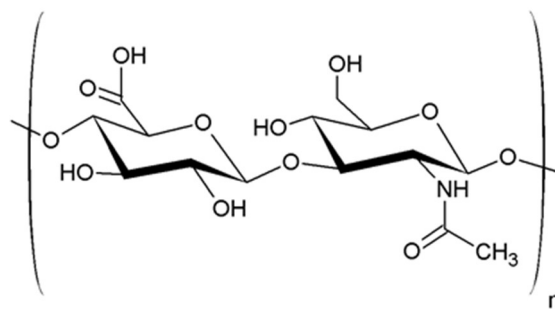


Figura 6. Estructura química de l'àcid hialurònic (HA).

L'HA és un dels components majoritaris de la matriu extracel·lular. El teixit dels vertebrats es mantenen units mitjançant una matriu complexa de macromolècules que retenen aigua i ions, mentre que permeten el pas de nutrients. Les molècules que componen aquesta matriu extracel·lular no només tenen un paper estructural sinó que també en regulen les funcions cel·lulars, i per tant posseeixen unes propietats biomecàniques i fisiològiques úniques. Es pot trobar HA en diferents teixits de l'organisme i s'estima que la quantitat total present a l'organisme d'una persona adulta d'uns 70 Kg de pes oscil·la entre 11 i 17 g (Laurent & Reed, 1991). Es troba distribuït de major a menor concentració al fluid sinovial (1400-3600 $\mu\text{g/g}$), a la pell (200 $\mu\text{g/g}$), a l'humor vitri (140-338 $\mu\text{g/g}$), al cervell (35-115 $\mu\text{g/g}$), a la limfa toràcica (8,5-18 $\mu\text{g/g}$), i en menor mesura al plasma sanguini (0,01-0,1 $\mu\text{g/g}$) (Fraser, Laurent, & Laurent, 1997).

Als mamífers, la degradació enzimàtica de l'HA resulta de l'acció de tres enzims: la hialuronidasa, la b-D-glucuronidasa, i la β -N-acetil-hexosaminidasa (Stern & Jedrzejas, 2006).

Les propietats fisicoquímiques i biològiques de l'HA resulten de gran interès per a un gran número d'aplicacions biomèdiques, tals com el manteniment del teixit connectiu, la hidratació de la pell, la viscosuplementació del teixit intraarticular o el seu efecte antiinflamatori a les articulacions (Masuko, Murata, Yudoh, Kato, & Nakamura, 2009) . No obstant, l'administració directa d'HA com a implant no resulta efectiva a llarg termini degut a la ràpida degradació enzimàtica que pateix dins de l'organisme. És necessària, doncs, una modificació química que el faci resistent a aquesta degradació. Recentment, s'han obtingut biomaterials basats en HA, que mitjançant una modificació química, permetent d'obtenir les propietats fisicoquímiques i mecàniques desitjades per a diferents aplicacions.

L'HA es pot unir a fàrmacs o formar part de transportadors de fàrmacs. La formació de conjugats entre l'HA i un fàrmac o l'associació a sistemes col·loïdals com les micel·les o les nanopartícules presenta nombrosos avantatges (Dosio, Arpicco, Stella, & Fattal, 2016). Les propietats més importants que es poden aconseguir amb les associacions són un increment amb la solubilitat del fàrmac, un augment amb la biodisponibilitat o una major semivida plasmàtica, disminuint el mecanisme d'aclariment (Han, et al., 2015). Nombrosos estudis s'han basat en l'àcid hialurònic per a la síntesi de materials porosos i hidrogels: en el camp de la medicina regenerativa s'han sintetitzat materials porosos injectables de HA, aconseguint estructures biomimètiques (Wang, et al., 2020) i hidrogels microporosos per a l'alliberament local de DNA, per tal d'incrementar l'aplicabilitat de la teràpia gènica en regeneració de teixits i angiogènesi terapèutica (Tokatlian, Cam, Siegman, Lei, & Segura, 2012). En l'àmbit de la tecnologia farmacèutica, també s'han sintetitzat materials porosos d'HA per a l'encapsulació de fàrmacs (Roig, Blanzat, Solans, Esquena, & García-Celma, 2018), línia de recerca que s'ha continuat en aquesta tesi doctoral.

Per a l'obtenció de biomaterials basats en HA per aplicacions biomèdiques, l'estratègia més utilitzada és l'entrecreuament, que consisteix en l'ús dels grups funcionals que presenta l'HA per a unir les cadenes de polímer mitjançant l'addició d'una espècie química (agent entrecruant). L'entrecreuament es pot produir per enllaç iònic o bé per enllaç covalent. Per a l'entrecreuament covalent de les cadenes d'HA, els agents entrecruants més utilitzats són: els diglicidils èters i les divinilsulfones sota condicions alcalines i els glutaraldehids, biscarbodiimida i hidrazides multifuncionals sota condicions àcides (Roig, 2016). L'entrecreuament de les cadenes polimèriques d'HA han permès l'obtenció d'una gran varietat de materials en diferents formes, entre les quals destaquen: films, microesferes, liposomes, fibres, i hidrogels (Xu, Jha, Harrington, Farach-Carson, & Jia, 2012). Alguns agents entrecruants descrits a la bibliografia no són adequats per aplicacions biomèdiques degut a la seva toxicitat.

En la present tesis doctoral s'utilitzarà per a entrecruar l'HA un diglicidil èter amb dos grups epòxid terminals, el butandiòl diglicidil èter (BDDE). Aquest agent entrecruant s'ha seleccionat per ser un dels més citocompatibles. A més, es troba en formulacions aprovades per la *Food and Drug Administration* (FDA) (Brandt & Cazzaniga, 2008). La reacció d'entrecreuament consisteix en l'apertura d'un grup epòxid del BDDE, en medi alcalí, que reacciona preferentment amb els grups hidroxil de l'HA (**Figura 7**). La reacció de reticulació tindrà lloc a l'emulsió altament concentrada, amb la finalitat d'obtenir materials porosos d'HA.

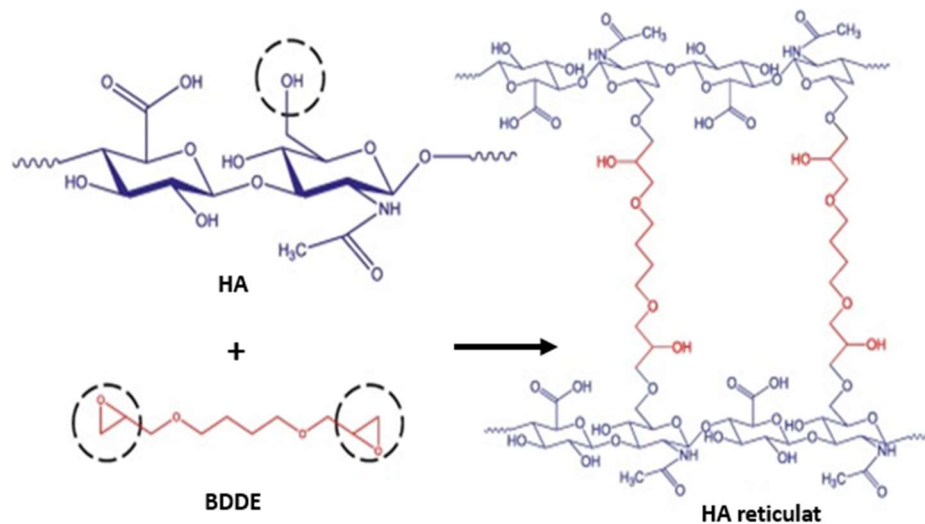


Figura 7. Reticulació de l'àcid hialurònic (HA) amb BDDE.

2. MATERIALS POROSOS OBTINGUTS A PARTIR D'EMULSIONS ALTAMENT CONCENTRADES

Les escumes, enteses com a dispersions de bombolles de gas en líquid, s'utilitzen en Farmàcia com a formes farmacèutiques en aerosol; poden ser aquoses i no aquoses i són administrades per via tòpica, rectal o vaginal i també en apòsits per al tractament de cremades. Les escumes medicamentoses contenen generalment un o més principis actius, un tensioactiu per permetre la seva formació i altres excipients (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2015). A causa de la seva elevada superfície interfacial i la tensió interfacial relativament elevada, les escumes són termodinàmicament inestables (Attwood, 2018), (Arzhavitina & Steckel, 2010). En canvi, les escumes sòlides, també denominades materials porosos, són estables, es poden preparar a partir de molts materials diferents (polímers, ceràmica, metalls i materials híbrids) i s'han estudiat pel seu potencial ús com a implants en aplicacions d'enginyeria de teixits. Diverses patents i articles (Perut, et al., 2011), (O'Brien, et al., 2007), (Karageorgiou & Kaplan, 2005), (Raucci, et al., 2010), (Kim, Knowles, & Kim, 2004), (Hedberg, et al., 2005), (Pek, Gao, Mohamed Arshad, Leck, & Ying, 2008) descriuen escumes de biopolímer o de fosfat de calci per a la reparació i reconstrucció de teixits que contenen col·lagen i fosfat de calci, hidroxiapatita o os desmineralitzat. Altres exemples són les escumes de col·lagen usades com a agents hemostàtics (Diamond, Casarella, Bachman, & Wolff, 1979), bastides per

a la reparació de teixits (Yannas, et al., 1981) i escumes de grafè i de col·lagen com a suports per a creixement cel·lular (Doillon, Silver, & Berg, 1987) (Tasnim, Thakur, Chattopadhyay, & Joddar, 2018). Recentment s’han dissenyat materials porosos tridimensionals per simular les característiques dels ossos, com ara la composició química (Grenga, Zins, & Bauer, 1989), (Liao, Cui, Zhang, & Feng, 2004), (Kashirina, Yao, Liu, & Leng, 2019) o la microestructura (Schliephake, Neukam, & Klosa, 1991), (Tancred, McCormack, & Carr, 1998), (Babaie & Bhaduri, 2018) i així facilitar la vascularització sobre el material i proporcionar un entorn adequat per a la formació òssia (Abbasi, Hamlet, Love, & Nguyen, 2020).

Els materials porosos són materials sòlids de baixa densitat i elevat volum de porus. Són ben coneguts per la seva varietat d’aplicacions, des de tamisos moleculars (Pizzoccaro-Zilamy, et al., 2019) fins a reaccions de catàlisi (Ruckenstein, 1997), (Ciesla & Schüth, 1999). Segons la IUPAC (Sing, Everett, & Hault, 1985) es denominen materials **macroporosos** els que tenen una mida de porus superior a 50 nm, materials **mesoporosos** si la mida dels porus està compresa entre 2 i 50 nm i materials **microporosos** si la mida és inferior a 2 nm. L’estructura ordenada dels porus és important per a aplicacions específiques (Wang, et al., 2017). Per la composició de la seva estructura, els materials porosos es classifiquen en orgànics, inorgànics o híbrids (Vadia & Rajput, 2019) (**Figura 8**).

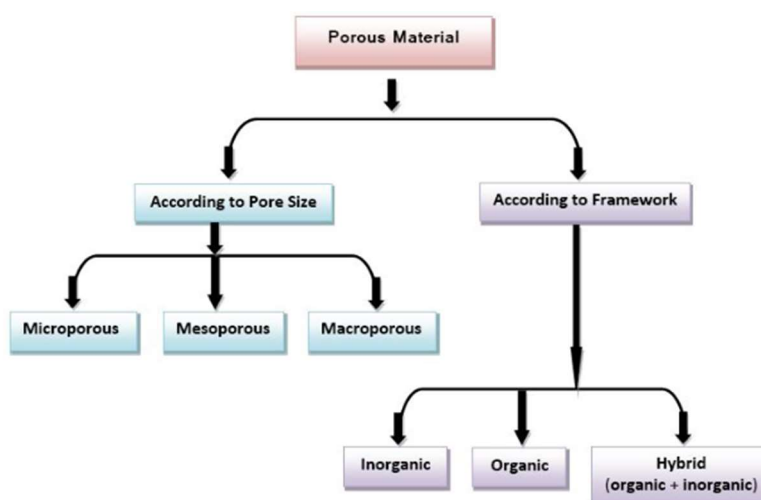


Figura 8. Classificació dels materials porosos en funció de la mida dels porus i la composició de la seva estructura.

Els materials porosos constitueixen una part integral de diverses formes de dosificació (Sher, Ingavle, Ponrathnam, & Pawar, 2007). La xarxa porosa és important per determinar fenòmens relacionats amb l'administració de medicaments, tals com la dissolució, adsorció i difusió de fàrmacs (Sant, Nadeau, & Hildgen, 2005). S'ha descrit l'ús de materials mesoporosos per incorporar i posteriorment alliberar diverses molècules d'interès farmacèutic (Hartmann, 2005), (Yiu & Wright, 2005), (Riachy, et al., 2016). S'ha demostrat que molècules de diferents mides poden quedar atrapades als mesopors mitjançant un procés d'impregnació i alliberades a través d'un mecanisme controlat per difusió (Vallet-Regí, Balas, & Arcos, 2007), (Wang S. , 2009). En aquest context, els materials porosos tenen característiques molt interessants com són superfícies elevades, mida de porus ajustable amb una baixa polidispersitat i propietats superficials ben definides, permetent així l'adsorció i alliberament de certs tipus de fàrmacs d'una manera més reproducible i predictable (Song, Hidajat, & Kawi, 2005), (Manzano, Colilla, & Vallet-Regí, 2009), (Canal, Aparicio, Vílchez, Esquena, & García-Celma, Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams, 2012).

La majoria de mètodes per fabricar materials porosos donen lloc a estructures poroses jeràrquiques (Wang, et al., 2017), però són processos laboriosos amb diverses etapes i, per aplicacions industrials es requereixen mètodes més simples (Esquena, Sankar, & Solans, 2003). Per exemple, les escumes sòlides de poliestirè (PS) es preparen normalment per extrusió o per expansió de perles de poliestirè i, per això, aquestes escumes poroses de macroporus tancats (no interconnectats) tenen propietats d'absorció i alliberament limitades. S'utilitzen generalment com a materials d'embalatge, com materials aïllants (Kaemmerlen, Vo, Asllanaj, Jeandel, & Baillis, 2010) o per a eliminació de metalls pesants d'efluents industrials (Memon & Pathan, 2008).

Com a alternativa als mètodes convencionals es poden obtenir materials porosos mitjançant sistemes col·loïdals, generant un sistema bifàsic i polimeritzant posteriorment la fase externa (Cameron, Krajnc, & Silverstein, 2011). Les entitats col·loïdals serveixen per a formar la porositat en el material final i després són eliminades del sistema. Depenent de la naturalesa del sistema col·loïdal (emulsions,

microemulsions, etc.), la grandària dels porus generats pot ser des de nanòmetres fins a centenars de micres.

Les emulsions altament concentrades també conegudes en la literatura com a HIPRE's (*high internal phase ratio emulsions*) (Princen, 1983), o emulsions gel (Solans, Comelles, Azemar, Sánchez Leal, & Parra, 1986), són aquelles emulsions en que la fracció de volum de la fase dispersa és superior a 0,74, valor corresponent a l'empaquetament màxim d'esferes monodisperses. Un empaquetament superior a 0,74 s'assoleix si les gotes són polièdriques i/o monodisperses. L'aspecte típic de les emulsions altament concentrades ja siguin del tipus O/W o del tipus W/O és mostra en la **Figura 9**.

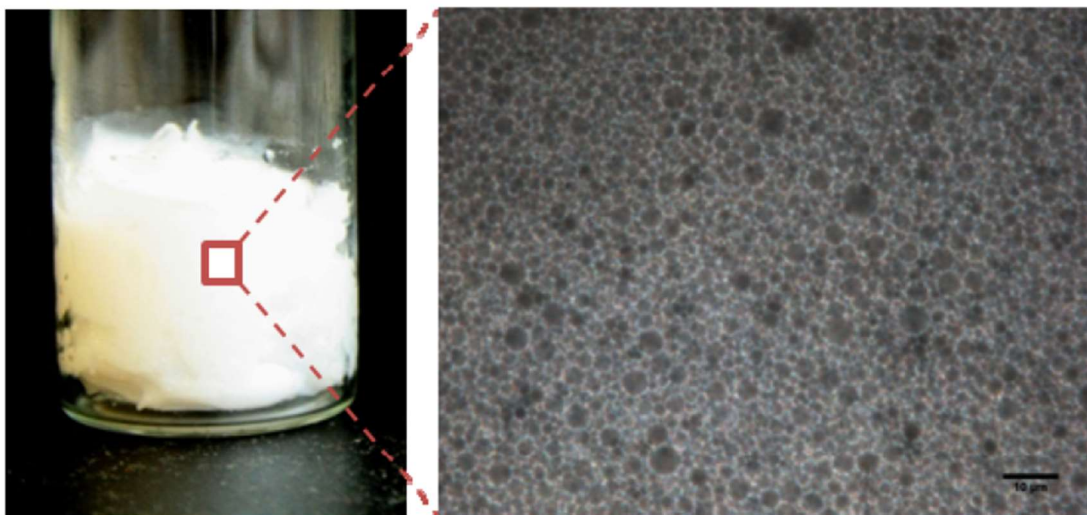


Figura 9. Aspecte macroscòpic (esquerra) i imatge en microscòpia òptica (dreta) d'una emulsió altament concentrada (Roig, 2016).

Aquestes emulsions presenten unes propietats reològiques, estructurals i òptiques característiques degut al seu alt contingut de fase dispersa. La seva estructura consisteix en un empaquetament de gotes en forma polièdrica separades per una fina capa de fase contínua que pot tenir, alhora, una estructura de microemulsió o de cristall líquid (Kunieda, Solans, Shida, & Parra, 1987), (Solans, Esquena, Azemar, Rodríguez, & Kunieda, 2004). Depenent de la fracció de volum de la fase dispersa, temperatura, etc., el seu comportament reològic pot passar d'elàstic a viscoelàstic (Pons, et al., 1993). Pel que fa al seu aspecte, solen ser opaques, tot i que també poden ser transparents o

translúcides en funció de la diferència en l'índex de refracció entre la fase interna i l'externa (Rodríguez, Shigeta, & Kunieda, 2000). Les emulsions altament concentrades generalment presenten una elevada polidispersitat.

Les emulsions altament concentrades es poden preparar per mètodes convencionals d'alta energia o també es poden preparar mitjançant mètodes d'emulsificació de baixa energia, com el mètode basat en la temperatura d'inversió de fase (PIT) (Kunieda & Shinoda, 1985). Els mètodes d'emulsificació de baixa energia, tals com el PIT, utilitzen l'energia de les transicions de fase que tenen lloc durant el procés d'emulsificació per produir emulsions altament concentrades gairebé espontàniament (Kunieda, Fukui, Uchiyama, & Solans, 1996), (Ozawa, Solans, & Kunieda, 1997), (Solans, Pons, & Kunieda, 1998). El mètode PIT es basa en el canvis de solubilitat, amb la temperatura, de tensioactius no iònics polioxietilenats. Aquests tensioactius esdevenen més lipòfils amb l'augment de la temperatura a causa de la deshidratació de les cadenes de polioxietilè. A baixa temperatura, la monocapa de tensioactiu té una curvatura positiva i dona lloc a solucions micel·lars aquoses que contenen oli o microemulsions O/W, que poden coexistir amb un excés de fase oliosa; al dispersar aquesta fase dona lloc a gotes que formen una emulsió O/W. A altes temperatures, la curvatura espontània de la monocapa de tensioactiu esdevé negativa i dona lloc a micel·les inverses que contenen aigua o microemulsions W/O, en equilibri amb un excés de fase aquosa; al dispersar aquesta fase dona lloc a gotes que formen una emulsió W/O. Hi ha una temperatura intermèdia (la temperatura HLB), on la curvatura espontània es fa propera a zero i es forma una microemulsió bicontinua, fase D, que conté quantitats comparables d'aigua i d'oli, en equilibri amb un excés d'aigua i un excés d'oli (Kunieda & Shinoda, 1985). El mètode d'emulsificació PIT aprofita les tensions extremadament baixes assolides a la temperatura HLB (Kunieda & Shinoda, 1985) per afavorir l'emulsificació. No obstant, la velocitat de coalescència a la temperatura HLB és ràpida i les emulsions són molt inestables, tot i que s'afavoreix l'emulsificació. Aquest problema es pot superar canviant ràpidament la temperatura d'emulsions preparades a la temperatura HLB, allunyant-se uns 25-30°C. El refredament o escalfament ràpid permet obtenir emulsions cinèticament estables (O/W o W/O) amb unes gotes molt petites i una estreta distribució de mida de gota (Solans, Pons, & Kunieda, 1998).

Les emulsions altament concentrades es poden utilitzar com a plantilles per fabricar partícules o estructures poroses segons la polimerització tingui lloc a la fase dispersa o a la fase contínua de l'emulsió (Esquena, Sankar, & Solans, 2003), (Esquena & Solans, 2006) (Cervantes-Martinez, Emo, García-Celma, Stébé, & Blin, 2019). La polimerització de la fase contínua d'una emulsió altament concentrada, seguida de l'eliminació de la fase interna, condueix a la formació d'escumes sòlides o materials porosos amb un volum de porus molt alt (Europa Patente nº 0060138, 1982), (Williams & Wroblewski, 1988). Els primers treballs publicats basats en l'obtenció de materials porosos a partir d'emulsions altament concentrades van ser el de Bartl l'any 1962 (Bartl, 1962), i posteriorment el de Barby i Haq (Europa Patente nº 0060138, 1982). Aquests primers treballs van posar de manifest el gran potencial que presentaven aquest tipus d'emulsions per a la preparació de materials porosos.

Les emulsions altament concentrades han estat utilitzades per a l'obtenció de materials porosos amb diferents estructures i obtinguts mitjançant una gran varietat de mètodes. Els primers treballs basats en l'obtenció de materials orgànics macroporosos es van centrar en l'ús de polímers orgànics com el poliestirè i el divinilbenzè com a agent entrecreuant (Ceglia, Merlin, Viot, Schmitt, & Mondain-Monval, 2014), (Esquena, Sankar, & Solans, 2003), (Solans, Esquena, & Azemar, 2003), (Wong, Baiz Villafranca, Menner, & Bismarck, 2013). A partir d'aquests resultats es van utilitzar altres polímers com acrilats per a l'obtenció de materials macroporosos. Per a l'obtenció d'aquests materials, a l'utilitzar polímers hidròfobs, s'usen emulsions altament concentrades del tipus aigua en oli (W/O) (Zhang, Sanguramath, Israel, & Silverstein, 2019) (**Figura 10**). D'aquesta manera s'han preparat escumes de poliestirè sòlid, amb un volum de porus molt gran (≥ 15 ml/g) amb una distribució de mida de porus relativament estreta. S'han obtingut escumes per polimerització en la fase contínua d'emulsions altament concentrades d'aigua-en-estirè estabilitzades per tensioactius no iònics.

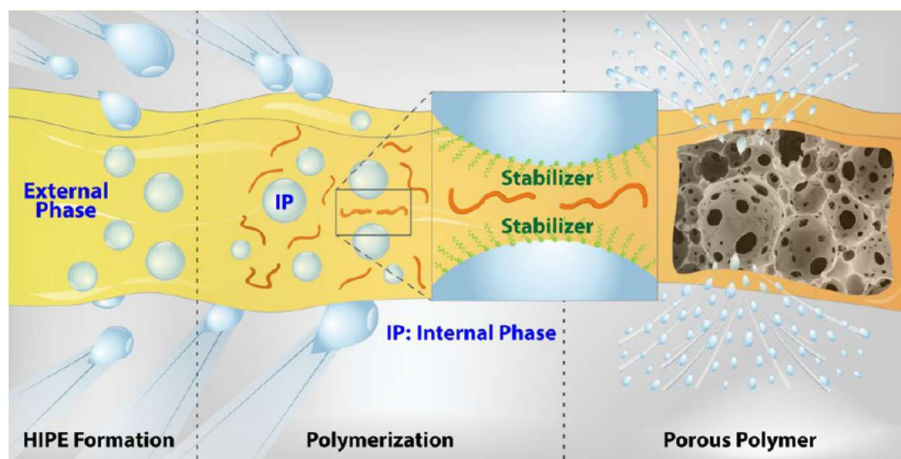


Figura 10. Formació de material polimèric porós per deposició de polímer a la fase externa d'una emulsió altament concentrada (*High Internal Phase Emulsion, HIPE*) (Zhang, Sanguramath, Israel, & Silverstein, 2019).

Mitjançant la polimerització d'un o més monòmers a la fase externa d'aquestes emulsions, es poden obtenir escumes macroporoses amb morfologia de porus controlada. L'estructura porosa de les escumes sòlides preparades a partir d'emulsions altament concentrades imita l'estructura òssia interna i resulta adient per aplicacions biomèdiques, com ara implants o pròtesis i, en conseqüència, les escumes sòlides es podrien utilitzar com a vehicles per a agents terapèutics.

Als darrers anys, l'aplicació clínica de biomaterials ha permès millorar la qualitat de vida de les persones, però encara hi ha diversos aspectes que es poden millorar. Per exemple, les infeccions relacionada amb els biomaterials suposen una greu amenaça per a la salut i, per evitar l'administració sistèmica d'antibiòtics, s'estan estudiant sistemes locals d'administració de medicaments (Qiu, Zhang, An, & Wen, 2007), (Salvagni, et al., 2020). També cal millorar les condicions de recuperació dels teixits després de la implantació dels biomaterials i limitar o evitar els processos inflamatoris que se'n deriven és un repte. Fàrmacs amb un baix pes molecular s'han incorporat a nanoestructures polimèriques biodegradables per controlar la proliferació o induir diferenciació cel·lular i la remodelació de teixits. Per exemple, un fàrmac antiinflamatori esteroïdal com la dexametasona, es va incorporar a la superfície interna de nanoestructures de PLGA (*poly-(lactic-co-glycolic acid)*) i es va assolir un alliberament sostingut (Yoon, Kim, &

Park, 2003). Es va observar que l'alliberament sostingut de dexametasona induïa amb eficàcia la diferenciació de cèl·lules mare de medul·la òssia a osteoblasts o condrocits (Chen, et al., 2005). La incorporació de fàrmacs a materials porosos permet un alliberament sostingut del principi actiu, el desenvolupament de sistemes flotants, l'augment de la biodisponibilitat de fàrmacs poc solubles, etc. (Ahuja & Pathak, 2009).

En aquesta tesi doctoral, s'han preparat escumes sòlides meso/macroporoses de poliestirè-divinilbencè, poliacrilamida, quitosan i àcid hialurònic a partir d'emulsions altament concentrades, s'han caracteritzat per diferents tècniques i s'han incorporat principis actius. La novetat del present estudi rau en avaluar la influència de les característiques de l'estructura porosa derivada de l'emulsió utilitzada en la cinètica d'alliberament dels principis actius. S'han utilitzat diferents fàrmacs model per les seves característiques fisicoquímiques. El ketoprofèn és un potent medicament antiinflamatori no esteroïdal (AINE), utilitzat àmpliament per al tractament de l'artritis reumatoide i altres malalties relacionades (Kantor, 1986). Presenta alguns efectes secundaris adversos inclosos irritació gastrointestinal quan s'administra per via oral (Carbone, et al., 2013). Atès que se sol administrar ketoprofèn als malalts durant un període de temps prolongat, s'han investigat noves formes farmacèutiques per reduir els seus efectes secundaris. El ketoprofèn és un fàrmac poc soluble en aigua i per comparar la seva incorporació i cèssió des dels materials sintetitzats, s'han seleccionat altres principis actius com són l'hidroclorur de clindamicina, que és un antibiòtic molt soluble en aigua (Smieja, 1998) i el sulfat de salbutamol, que és un antiasmàtic ionitzable en solució aquosa (Ullmann, Caggiano, & Cutrera, 2015). Els polímers seleccionats són químicament inerts i no es preveuen interaccions amb els principis actius.

3. L'ASSAIG DE DISSOLUCIÓ COM A EINA DE CONTROL DE QUALITAT DE NOVES FORMES FARMACÈUTIQUES

L'assaig de dissolució s'utilitza habitualment per dissenyar i seleccionar formulacions i com a eina comparativa de control de qualitat per assegurar la uniformitat dels lots en la fabricació rutinària de productes farmacèutics sòlids (Chen, Gao, & Duan, 2017).

L'assaig de dissolució és una eina comparativa per mesurar el rendiment *in vitro* d'una forma de dosificació oral sòlida. La dissolució d'un producte sòlid es pot veure afectada per la composició i les propietats de les pólvores, incloent-hi la mida de les partícules, el polimorfisme de l'ingredient actiu farmacèutic (API), els excipients al producte formulat, el procés de fabricació i altres factors del mètode i entorn de l'assaig de dissolució. Amb una selecció adequada del mètode de dissolució en un entorn ben controlat, l'assaig pot ser sensible als canvis en la composició, les propietats del material i el procés de fabricació.

L'assaig de dissolució va aparèixer com a control de qualitat en formes orals sòlides a la Farmacopea del Estats Units (USP) a finals dels anys seixanta; des de llavors s'ha adoptat a agències reguladores de diferents països per a l'aprovació de noves formes orals sòlides, ja sigui per nous productes, noves aplicacions o per medicaments genèrics. De totes maneres, tenir el mateix perfil de dissolució no garanteix que els productes tindran el mateix comportament *in vivo*. A diferència d'altres controls de qualitat del producte, els resultats de l'assaig de dissolució d'un producte depenen molt del mètode emprat. Es poden generar dades de dissolució significativament diferents per al mateix producte si s'utilitzen diferents mètodes de l'assaig de dissolució. Les dades de dissolució d'un producte farmacèutic es poden veure afectades per molts factors, tals com la composició del medi receptor, el tipus d'aparell utilitzat, la velocitat d'agitació i el dispositiu emprat. Per tant, la influència d'aquests factors s'ha de considerar acuradament per poder interpretar correctament els resultats obtinguts.

Inicialment, l'assaig de dissolució es va incloure a la USP amb la intenció de mesurar la disponibilitat fisiològica de medicaments administrats en formes orals sòlides al fluid gastrointestinal. No obstant, la verificació directa de la dissolució en aquest fluid és difícil. Cal destacar que el fluid gastrointestinal no és el destí final dels fàrmacs que entren a la circulació sistèmica. Després de que un fàrmac es dissol en el fluid fisiològic del tracte gastrointestinal, travessarà la membrana i serà transportat al torrent sanguini per arribar al lloc d'acció i exercir un efecte farmacològic. Suposant que el mecanisme d'absorció és el mateix per a lots diferents del mateix producte o del mateix producte fabricat per diferents fabricants (genèrics), la dissolució al tracte gastrointestinal es pot

inferir mesurant la biodisponibilitat del producte després de l'administració oral. La biodisponibilitat es defineix com la quantitat i velocitat en què s'absorbeix un fàrmac i està disponible al lloc de acció. La relació entre la dissolució *in vitro* i la biodisponibilitat *in vivo* es va incorporar oficialment al 1975 a la USP19. En els darrers 50 anys, l'interès per desenvolupar eines *in vitro* per descriure i intentar predir el comportament *in vivo* ha estat un element fonamental en la recerca biofarmacèutica.

Els perfils de dissolució es poden veure afectats per diferències quantitatives i qualitatives de la composició dels medicaments, pels processos de fabricació, les propietats físiques dels principis actius i els excipients i pels diversos paràmetres dels mètodes emprats per fer l'assaig de dissolució. Així, l'assaig de dissolució es pot convertir en una eina útil per al control de qualitat del medicament si s'estableix un mètode de dissolució amb la robustesa suficient per controlar el canvis. La sensibilitat i la versatilitat de l'assaig de dissolució per detectar els canvis en els materials i els processos es poden utilitzar com a eina per al control de qualitat, que pot ser avantatjós en comparació amb altres tècniques analítiques existents sovint més costoses.

Noyes i Whitney van desenvolupar una equació bàsica que indica que quan l'àrea superficial és constant, la velocitat de dissolució d'un sòlid és proporcional a la diferència entre la solubilitat i la concentració a la solució receptora (Noyes & Whitney, 1897). Més tard, Nernst i Brunner van proposar una teoria de capes de difusió per correlacionar la velocitat de dissolució amb el coeficient de difusió, àrea superficial, solubilitat i gruix de la capa de difusió (Nernst, 1904) (Brunner, 1904). Les equacions de Noyes-Whitney i Nernst-Brunner constitueixen les teories fonamentals de la teoria de capes per estudiar la dissolució de partícules. Teòricament, el procés de dissolució d'un sòlid inclou tres etapes:

- 1) despreniment de molècules de fàrmac a partir del sòlid,
- 2) solvatació de les molècules de fàrmac després mitjançant molècules dissolvents (medi) en una capa formada a la superfície del sòlid i
- 3) transport de les molècules de fàrmac solvatades des de la capa superficial cap a la solució receptora.

La velocitat de les etapes 1 i 2 teòricament ve donada per les propietats termodinàmiques del sòlid, com l'entalpia i l'entropia de fusió i de la interacció molecular entre el solut i el dissolvent. La correlació entre les propietats termodinàmiques amb la solubilitat (aquí la velocitat de dissolució) s'ha estudiat amb profunditat (Yalkowsky & Valvani, 1980). A l'etapa 3, les propietats termodinàmiques per a la interacció molecular continuen sent les que governen el procés de difusió. Malgrat això, la difusió pura és un procés molt lent i no és adequat per assaigs rutinaris. Als assaigs de dissolució moderns hi ha un procés de mesclat i el mecanisme de transport es converteix en un tipus mixt de difusió i convecció, sent la convecció el mecanisme dominant. En altres paraules, la velocitat de mesclat és el factor clau responsable de separar les molècules de fàrmacs solvatades des de la superfície sòlida i transportar les molècules del fàrmac cap a la solució receptora de l'assaig de dissolució. Per tant, la velocitat d'agitació del medi (solució receptora) afectarà la velocitat de dissolució.

3.1. TIPUS D'APARELLS DE DISSOLUCIÓ

L'assaig de dissolució és un mètode de control de formes de dosificació que està inclòs a la majoria de les Farmacopees. La *Real Farmacopea Española* (AEMPS, 2011) considera quatre aparells de dissolució per formes orals sòlides:

- aparell I o aparell de cistells perforats,
- aparell II o aparell de paletes,
- aparell III o aparell de pistons i
- aparell IV o aparell de flux continu.

A més, la *Real Farmacopea Española*, proposa tres mètodes per a l'assaig de dissolució dels pegats transdèrmics: mètode de l'aparell de disc, mètode de la cel·la i mètode del cilindre rotatori. Cadascun dels tres dispositius caldrà introduir-lo a l'aparell II o de paletes per fer l'assaig de dissolució. Així mateix, per a l'assaig de dissolució de xiclets medicamentosos, proposa dos aparells de mastegar i per a les formes farmacèutiques sòlides lipòfiles (supositoris i càpsules lipòfiles), proposa l'aparell de flux continu amb una cubeta especial.

Tant la Farmacopea Europea (EDQM, 2019), com la Real Farmacopea Española (AEMPS, 2011) i la USP (Convention, 2020) consideren set equips diferents, que es descriuran breument a continuació.

Els aparells més utilitzats per als assaigs de dissolució de les formes farmacèutiques orals sòlides són els anomenats per les Farmacopees Aparell I (cistell, *basket*) i Aparell II (pala, *paddle*) (**Figura 11**).

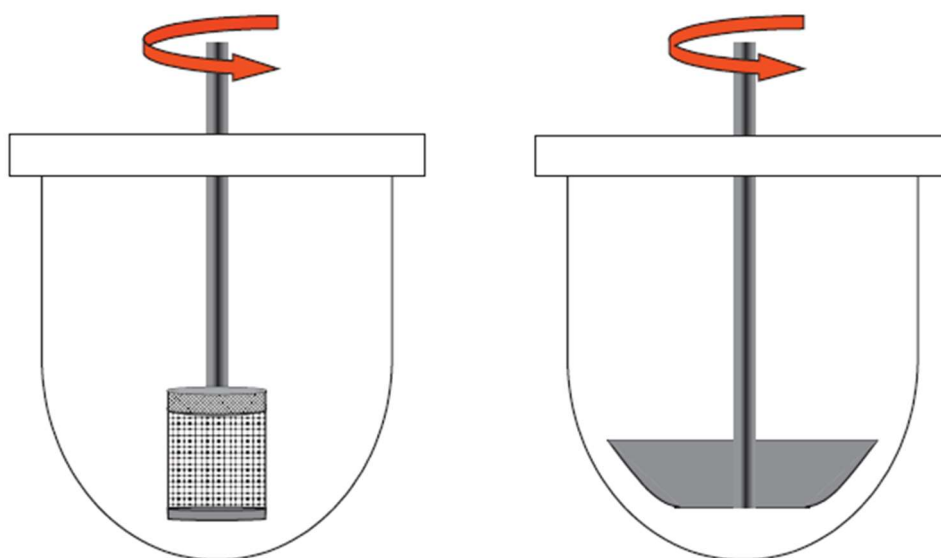


Figura 11. Representació esquemàtica de l'aparell I (cistell) i l'aparell II (pala) (Chen, Gao, & Duan, 2017).

Els aparells I i II consisteixen en vasos de borosilicat o de material plàstic inert, de fons semiesfèric, d'un litre de capacitat, que contenen el medi de dissolució; també tenen un motor i un eix d'acer inoxidable unit al motor i centrat, que es submergeix a l'interior del vas. La temperatura del medi de dissolució es controla dins d'uns límits estrets ($\pm 0,5$ C) per immersió en un bany d'aigua a temperatura constant o per una altra tecnologia adequada.

A l'**aparell I**, la forma de dosificació es col·loca en un cistell d'acer inoxidable fixat a l'extrem de l'eix central. L'agitació s'aconsegueix girant el cistell a una velocitat de

rotació que sol ser de 100 rpm, per això també s'anomena cistell rotatori. S'utilitza per càpsules, comprimits, supositoris, formes de dosificació que surten, formes d'alliberament retardat.

A l'**aparell II**, la forma de dosificació s'introdueix directament al vas i s'utilitza una pala d'acer inoxidable recoberta per provocar agitació, amb velocitats de rotació típiques de 50 a 75 rpm. Quan la forma de dosificació pot surar (per exemple, formulacions de càpsules), sol ser més adequat utilitzar l'aparell I (cistell). A vegades, quan s'utilitza l'aparell II, la forma de dosificació, ja sigui comprimit o càpsula, es pot col·locar en un dispositiu alternatiu d'immersió, fet d'un material no reactiu. El dispositiu d'immersió ha de ser d'un material no reactiu i estar validat. A la **Figura 12** es mostren alguns d'aquests dispositius, que poden ser tan senzills com una simple espiral de filferro. S'ha demostrat que el disseny del dispositiu d'immersió pot afectar els resultats de la dissolució, atrapant material o alterant la hidrodinàmica i alentint la dissolució. A més d'evitar la flotació, el dispositiu d'immersió pot ser útil per assegurar la correcta col·locació de la forma de dosificació a la part inferior del vas. L'entorn hidrodinàmic al vas de l'aparell II és molt heterogeni (Kukura, Arratia, Szalai, & Muzzio, 2003) i s'ha demostrat que la posició de la forma de dosificació (per exemple, al costat versus al centre del vas o l'alçada a la que se situa) pot alterar la velocitat de dissolució (Gao, Moore, Smith, Doub, & Westenberger, 2007).

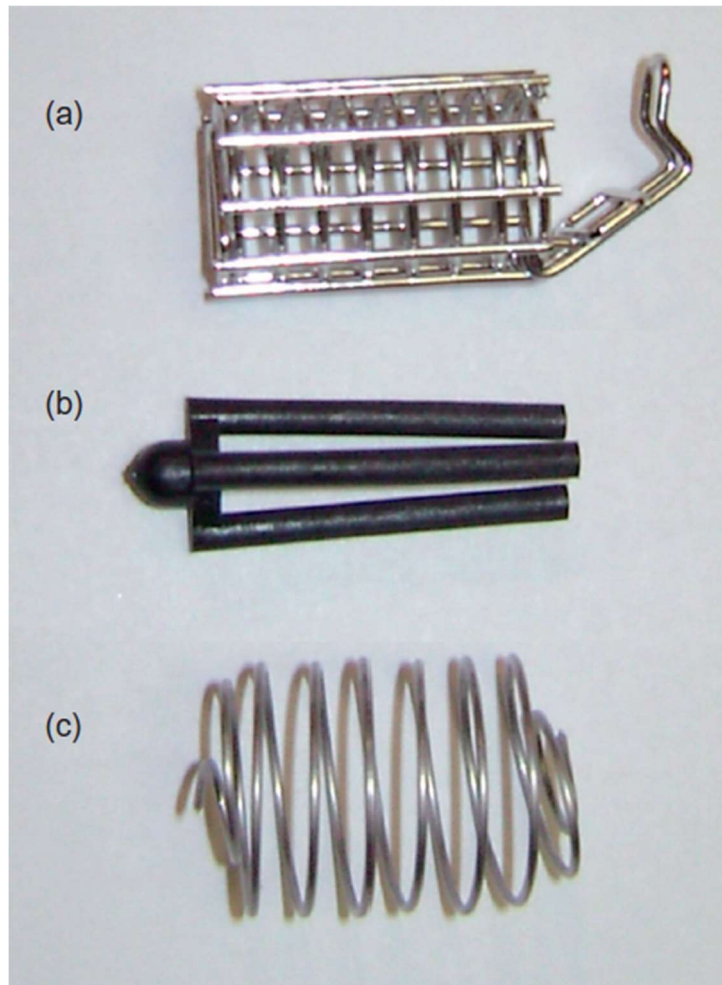


Figura 12. Exemples de dispositius d'immersió: a) tipus cistell, b) planxa de tres puntes y c) espiral (Chen, Gao, & Duan, 2017) .

Pels aparells I i II, el volum mitjà del medi de dissolució està entre 500 i 900 mL. Hi ha disponibles vasos més petits i més grans, per tal d'adaptar-los a dosis baixes o a principis actius molt poc solubles, respectivament. El medi de dissolució i la velocitat d'agitació se seleccionen en el desenvolupament de l'assaig de dissolució i cal justificar-los. La presa de mostra dels aparells I i II es pot fer manualment o automàticament i caldrà filtrar per eliminar partícules de fàrmac no dissoltes o excipients insolubles. El temps de mostreig es registra tenint en compte l'inici de l'assaig. Es pot realitzar manualment utilitzant xeringues equipades amb cànules d'una longitud adequada per garantir el mostreig dins de la zona correcta, definida verticalment com a mig camí entre la superfície del medi de dissolució i la part superior de la pala d'agitació o del cistell, i radialment a no menys d'1 cm de la paret del vas. Els vasos de dissolució solen estar equipats amb cobertes que contenen orificis pel mostreig, per facilitar la

reproductibilitat del procés. Aquestes cobertes també minimitzen l'evaporació del medi de dissolució durant assaigs prolongats (Tang & Schwartz, 1998). Els dispositius de mostreig automàtics utilitzen col·lectors de mostres que lliuren la mostra a un col·lector de fraccions o passen la alíquota a través d'un detector en línia. La filtració es pot realitzar al lloc de mostreig o també en línia. Tant si s'utilitzen mètodes manuals com automàtics, la presa de mostra es pot dur a terme amb o sense reemplaçament del volum de medi retirat. Amb detectors en línia, l'alíquota mostrejada es pot retornar al vas. En altres casos, un volum equivalent de medi de dissolució, escalfat prèviament a la mateixa temperatura de l'assaig, s'introdueix al vas després de cada presa de mostra, amb molta cura per tal d'evitar una alteració inacceptable de la hidrodinàmica del vas. Es calcula la quantitat de fàrmac alliberat versus el temps i s'ha de corregir el resultat tenint en compte els canvis de volum que es produeixen quan el mitjà no es substitueix. Els aparells I i II s'utilitzen per formes farmacèutiques sòlides d'alliberament convencional, d'alliberament prolongat i d'alliberament retardat.

Els aparells III, IV (flux continu) i VII s'utilitzen poques vegades amb formes de dosificació sòlides i se solen emprar per assajar formes d'alliberació controlada. L'**aparell III** (pistons, *reciprocating cylinder*) (**Figura 13**), utilitza un cilindre alternatiu per provocar agitació i transportar la forma de dosificació a través d'una sèrie de vasos. Això permet monitoritzar l'alliberament del fàrmac en una sèrie de medis amb diferents pH per simular el gradient de pH del tracte gastrointestinal. S'utilitza per formes d'alliberament retardat i per comprimits mastegables. L'**aparell VII** (*reciprocating disk*) és molt similar però utilitza vasos molt petits amb un volum aproximat de 10 ml, a diferència dels 250 ml de l'aparell III i una longitud de traç menor. L'aparell VII s'utilitza per a medicaments d'alliberament retardat on la quantitat de principi actiu alliberada és baixa i el petit volum dels vasos facilita la quantificació fiable del fàrmac alliberat

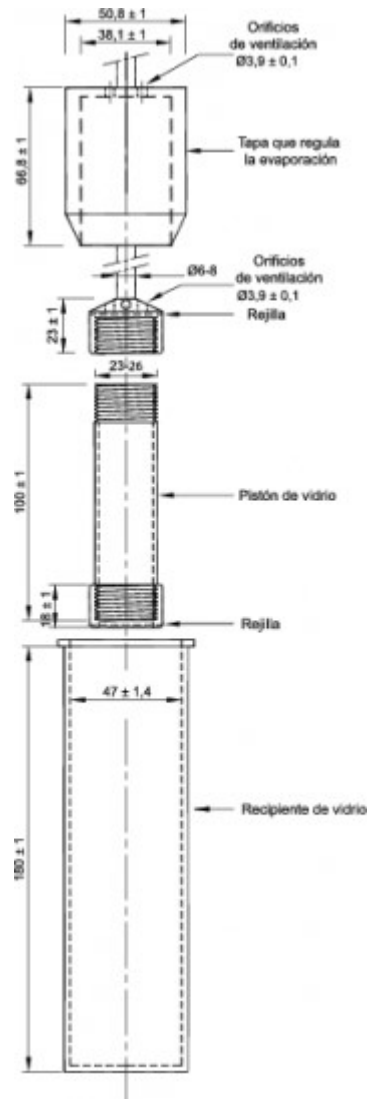


Figura 13. Aparell III (pistons) (AEMPS, 2011)

L'**aparell IV** (flux continu, *flow through cell*) (**Figura 14**) és un sistema de flux dissenyat per tenir un control millorat sobre la hidrodinàmica del medi. El flux té un moviment pulsatiu per imitar el flux intestinal. Aquest disseny també permet canvis continus en el medi, com ara induir un gradient de pH. Hi ha la possibilitat de renovar el medi receptor (sistema obert) o no renovar-lo (sistema tancat). S'utilitza per implants i per formes farmacèutiques amb dosis molt baixes. La quantitat de mostra extreta és molt petita.

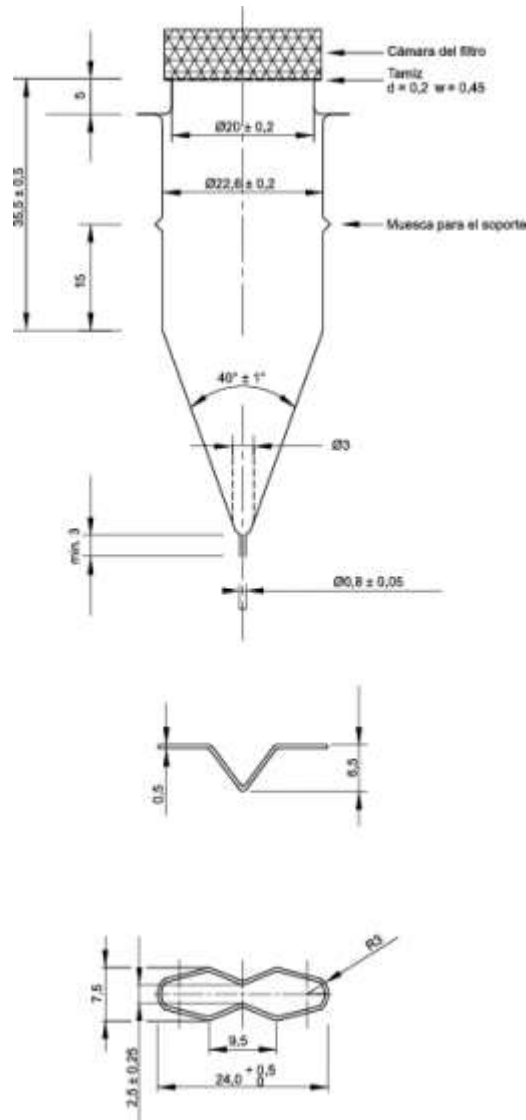
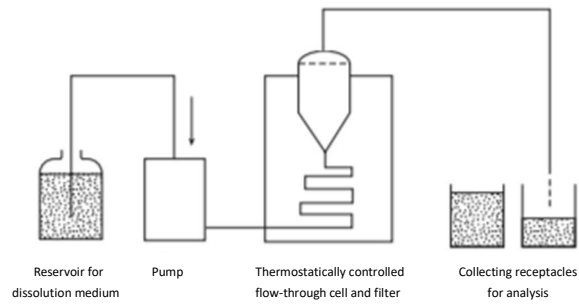


Figura 14. Aparell IV (flux continu) (EDQM, 2019)

L'aparell V (pala sobre disc, *paddle over the disk*) consisteix amb un eix unit a la pala agitadora a la que s'ensambla un disc on se situa la forma de dosificació. El volum de medi receptor és de 900 mL.

L'aparell VI (aparell de disc) (Figura 15) és igual que l'aparell II però hi ha un cilindre amb una xarxa d'acer inoxidable submergit en la solució receptora, a la part inferior del vas. S'utilitza per assajar pegats transdèrmics. Per aquestes formes de dosificació també es pot utilitzar el mètode de la cel·la d'extracció i el cilindre rotatori (*rotating cylinder*) (AEMPS, 2011).

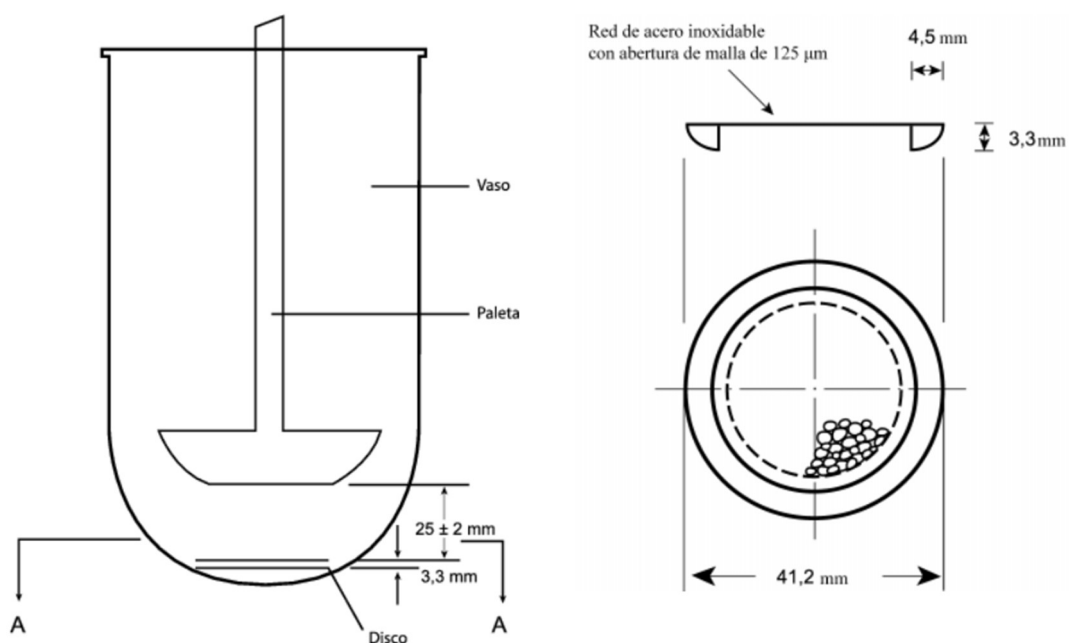


Figura 15. Aparell de disc per pegats transdèrmics (AEMPS, 2011)

A les Farmacopees s'indica la interpretació dels resultats de l'assaig de dissolució i els valors acceptats pels diferents aparells i formes de dosificació (AEMPS, 2011).

Els mètodes per a l'assaig de dissolució validats i descrits a les principals Farmacopees són principalment per a formes de dosificació sòlides (comprimits, càpsules). No hi ha cap mètode obligatori en cap farmacopea per a formes farmacèutiques semisòlides; només hi ha *guidelines* disponibles amb equips recomanats per la mesura de la quantitat de fàrmac alliberat des d'aquests preparats. Segons aquestes directrius i també basant-se en dades bibliogràfiques, l'alliberament de fàrmacs s'ha estudiat àmpliament mitjançant el sistema de difusió de cel·les de Franz amb membranes sintètiques (SUPAC-SS, 1997) (Siewert, Dressman, Brown, & Shah, 2003), (Zatz & Segers,

1998) (SUPAC-SS, 1998). Les condicions experimentals dels assaigs d'alliberament de fàrmacs, com ara les fases receptores, el tipus de membrana, etc., depenen de la finalitat dels experiments y de si l'objectiu és el control de qualitat o la determinació de la biodisponibilitat in vitro (Shah, 2001), (Shah, Siewert, Dressman, Moeller, & Brown, 2002). Pel que fa als productes cosmètics, el comportament del producte a la pell i l'alliberament de l'actiu cal assajar-lo evitant la utilització d'animals d'experimentació, ja que a la Unió Europea es van prohibir els assaigs de cosmètics amb animals l'any 2009 i cal trobar alternatives per avaluar-los (Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2004). En aquest cas, l'assaig de dissolució pot aportar informació de gran interès pel que fa al control de qualitat.

3.2. AUTOMATITZACIÓ DE L'EQUIP DE DISSOLUCIÓ

L'automatització al laboratori de desenvolupament farmacèutic ofereix un gran potencial per augmentar l'eficiència i reduir els errors de laboratori (Kretz & Wong-Moon, 2013). Un equip de dissolució totalment automatitzat (**Figura 16**) consisteix normalment en sis o vuit vasos que corresponen a un mateix tipus d'aparell de dissolució (normalment aparell I o II); l'automatització es pot aplicar a la neteja dels vasos, ompliment del medi de dissolució i a la introducció de les formes de dosificació a assajar. A més pot haver un sistema robotitzat capaç de col·locar i retirar els cistells de l'aparell I de dissolució, i també una vàlvula de commutació (capaç de subministrar quatre tipus de medi al bany de dissolució), un mostrejador automàtic, una dispositiu de recollida de mostres i un espectrofotòmetre ultraviolat/visible o un cromatògraf de líquids d'alta eficàcia connectat en línia, tot gestionat per una aplicació informàtica avançada amb gravació de vídeo. Existeixen equips parcialment automatitzats, que disposen únicament dels mostreig i la retirada i la reposició de medi automatitzats.



Figura 16. Equip de dissolució completament automatitzat (Erweka, 2020)

Un equip de dissolució completament automatitzat pot representar per al científic encarregat dels assaigs de dissolució una reducció d'aproximadament el 90% de la feina del protocol de l'assaig al laboratori i, a més, presenta altres avantatges (Chen, Gao, & Duan, 2017). En primer lloc, la neteja automàtica dels vasos del bany permet eliminar el costos del temps d'un analista, disminueix la probabilitat de trencament dels vasos guanyant en seguretat i també s'aconsegueix un nivell de neteja superior. En segon lloc, a excepció de la configuració inicial de l'execució de l'assaig, es poden realitzar les proves automatitzades sense que un analista hagi d'estar present. A més, els sistemes automatitzats poden tenir altres funcions, com per exemple, introducció de les formes de dosificació a assajar, anotació de la temperatura del medi abans i després de la prova,

desgasificació i distribució del medi receptor als vasos, mostreig dels vasos a temps programats prèviament i filtrat de les mostres extretes. Un sistema automatitzat redueix la variabilitat d'analista a analista, així com els problemes que poden sorgir de diferents posicions en la presa de mostra, variabilitat en el temps de mostreig i en la introducció simultània de les formes de dosificació. Els equips de dissolució automatitzats dispensen el medi de dissolució gravimètricament, el que redueix la possibilitat d'errors i es fa amb exactitud a tots els vasos de l'equip i a cada assaig. L'automatització també és important per recuperar el medi que s'ha perdut en cada presa de mostra.

No obstant, els equips de dissolució manuals (no automatitzats) tenen avantatges als laboratoris on l'analista no fa assaigs de dissolució de manera rutinària o quan la metodologia de la prova varia constantment (Chen, Gao, & Duan, 2017). Els canvis i modificacions per a cada prova individual són més fàcils d'adaptar manualment. Encara que els equips de dissolució completament automatitzats presenten avantatges relacionats amb el temps d'analista i en la reducció de la variabilitat, hi ha diversos desavantatges que cal considerar. El primer d'ells és que un equip completament automatitzat és complex i té moltes funcions. Com més funcions hi ha, més errors es poden generar. El segon desavantatge és que la corba d'aprenentatge del programa és molt pronunciada, fet que està més agreujat si l'analista no utilitza el programa de forma regular. El tercer inconvenient pot ser la dificultat per netejar correctament totes les connexions. També cal considerar el temps que es perd per solucionar problemes de juntes trencades o bombes que van perdent la seva màxima intensitat i les dificultats per portar-les de nou a un estat operatiu pot ser una tasca de molts dies. Un altre desavantatge és que els equips totalment automatitzats no estan estandarditzats pel que fa a l'automatització en comparació amb diferents fabricants: a més, les etapes que no formen part del protocol oficial de l'assaig de dissolució que apareix a les Farmacopees han d'estar validades. El desenvolupament i la validació del mètode a vegades són complicats i consumeixen molt de temps, però són necessaris per garantir la integritat i l'equivalència de l'equip completament automatitzat.

3.3. L'ASSAIG DE DISSOLUCIÓ COM A EINA DE CONTROL DE NOVES FORMES FARMACÈUTIQUES

L'alliberament d'un principi actiu des d'un producte farmacèutic és un indicador de qualitat i és de gran importància quan es vol descriure una determinada composició o bé cal detectar l'efecte dels canvis en els components o en el procés de fabricació o bé cal fer un seguiment dels canvis durant l'emmagatzematge (proves d'estabilitat). També algunes vegades es pot utilitzar com a prova de biodisponibilitat per tal de predir el comportament *in vivo* dels productes desenvolupats (Gray, 2018). La **Figura 17** resumeix el paper de l'estudi de l'alliberament de fàrmacs als medicaments, mitjançant l'assaig de dissolució (Kovács, Petró, Erős, & Csóka, 2014).

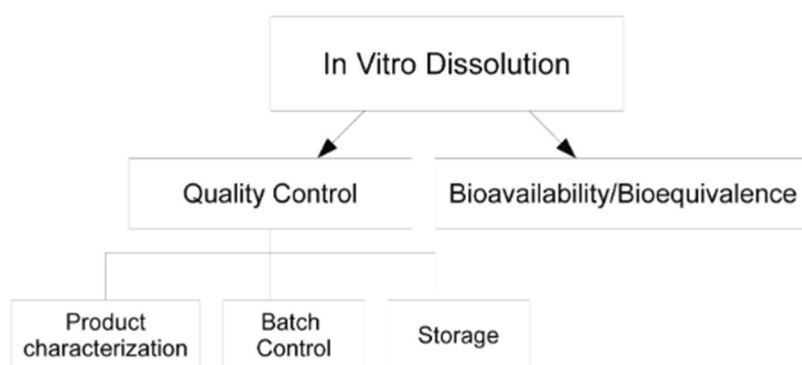


Figura 17. Aplicació de l'assaig de dissolució a la caracterització de medicaments (Kovács, Petró, Erős, & Csóka, 2014).

Actualment, l'assaig de dissolució descrit a les Farmacopees segueix sent una pedra angular del procés de desenvolupament de medicaments i del control de qualitat. No obstant això, hi ha nombrosos estudis que descriuen el desenvolupament de tecnologia relacionada amb l'alliberament d'un principi actiu de la forma de dosificació, que malgrat no aparèixer en cap Farmacopea aporten una informació rellevant tant del comportament de la nova forma de dosificació *in vivo* com del seu control de qualitat i de la variabilitat entre lots de fabricació (McAllister, 2010). Per a aquests mètodes de dissolució no oficials, s'han establert alguns paràmetres *in vitro* (medis receptors i hidrodinàmica,

forces físiques, etc.) per simular les condicions *in vivo* amb l'esperança de poder fer prediccions del comportament a l'organisme, especialment amb formulacions destinades a l'administració oral. Les dades disponibles de la majoria d'aquestes tècniques són limitades i es requereixen més estudis perquè alguna d'elles pugui arribar a ser una metodologia oficial (Chen, Gao, & Duan, 2017). Els aparells no oficials, és a dir, els que no estan descrits a cap Farmacopea, per poder ser utilitzats d'una manera fiable han de disposar d'una adequada justificació, qualificació i documentació que permeti assegurar que són més útils que els equipaments estàndard (Mann & Pygall, 2012). Per exemple, aparells de petit volum amb paletes o cistelles en miniatura es poden considerar per assajar medicaments amb una dosi baixa de principi actiu. Igualment, una ampolla giratòria o tubs de diàlisi poden ser d'utilitat per a microesferes i implants. Vasos o cel·les de flux modificades es poden emprar per assajar formes de dosificació especials, tal com formes en pols i stents (Chen, Gao, & Duan, 2017) .

L'assaig de dissolució per al control de qualitat hauria de ser capaç d'identificar els canvis en els productes i processos de fabricació que poden conduir a importants diferències en la biodisponibilitat o en la bioequivalència, però a la vegada evitar la discriminació excessiva que podria produir un rebuig innecessari als controls de qualitat (Klein, 2019) (Chen, Gao, & Duan, 2017). Les proves de dissolució tenen un paper creixent en el disseny i desenvolupament de formes farmacèutiques. La seva aplicabilitat es pot estendre també a productes cosmètics com a mètode alternatiu a l'ús d'animals d'experimentació (Kovács, Petró, Erős, & Csóka, 2014). Els diferents nivells de canvis en la composició del producte i la similitud en cas de diferents productes només es poden detectar després d'una validació acurada de l'alliberament dels principis actius, realitzat en alguns casos amb un sistema de cèl·lules de Franz de difusió vertical (Siewert, Dressman, Brown, & Shah, 2003). En els darrers anys han aparegut mètodes miniaturitzats basats en tècniques d'imatge, de dispersió de la llum, especialment per assajar l'alliberament de quantitats molt baixes de principi actiu o la dissolució de fàrmacs molt poc solubles en aigua (Alvebratt, Cheung, Stromme, & Bergstrom, 2018), (Long, Tang, Chokshi, & Fotaki, 2019).

La nanotecnologia ha donat lloc al disseny i desenvolupament de noves formes de dosificació, moltes vegades de difícil i costosa caracterització estructural. L'estudi de l'alliberament de fàrmacs des d'un nanotransportador polimèric és un factor clau per valorar la seva adequació com a nova forma de dosificació. Aquest alliberament es veu afectat per diversos factors, tals com la naturalesa dels components (fàrmac, polímer i excipient), la proporció de cada component a la formulació, la interacció física o química entre components i els mètodes de fabricació. El mecanisme d'alliberament de fàrmacs dels vehicles, es pot dividir en quatre categories: difusió, dissolució, interacció química i alliberament per estímuls externs (Son, Lee, & Cho, 2017). En aquest sentit, l'aplicació de l'assaig de dissolució a l'estudi de les noves formes de dosificació pot representar una eina assequible i eficient, no només des del punt de vista del control de qualitat rutinari sinó també per la informació que pot aportar sobre l'estructura interna del nanotransportador, la interacció fisicoquímica entre els fàrmac i el sistema d'alliberament, l'adequació del mètode de preparació emprat i la reproductibilitat entre lots de fabricació.

En aquesta tesi doctoral, s'han preparat uns nous materials polimèrics porosos, fent servir emulsions altament concentrades com a plantilla, s'han incorporat fàrmacs i s'ha avaluat l'alliberament des dels materials porosos fins solucions receptores. S'han desenvolupat mètodes de caracterització basats amb l'assaig de dissolució per tal d'aconseguir informació sobre l'adequació d'aquests nous materials com a formes de dosificació de fàrmacs.

OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

Els objectius generals de la tesi doctoral són la preparació de materials meso/macroporosos utilitzant emulsions altament concentrades com a plantilla, l'estudi de la incorporació de fàrmacs als materials i la seva alliberació a solucions receptores adequades, amb la finalitat de desenvolupar noves formes de dosificació de fàrmacs.

Aquests objectius generals es concreten en els següents objectius específics:

- Preparar materials meso/macroporosos amb diferents polímers biocompatibles, emprant emulsions altament concentrades com a plantilla, per la reacció de polimerització de monòmers o per la deposició i reticulació de polímers a la fase externa de les emulsions.
- Aconseguir la incorporació de fàrmacs a estructures meso/macroporoses, assolint uniformitat de contingut en quant al principi actiu i estabilitat fisicoquímica del sistema durant períodes de temps equivalents al període de reposició d'una especialitat farmacèutica.
- Estudiar l'aplicació de l'equip de dissolució automatitzat com a eina de control de qualitat per a noves formes farmacèutiques.
- Obtenir noves formes de dosificació que permetin la cessió controlada dels principis actius estudiats.

Per tal d'assolir els objectius proposats, s'ha seguit el següent pla de treball:

- Selecció de composicions que corresponen a emulsions altament concentrades W/O i O/W i de monòmers i polímers preformats que seran incorporats a la fase contínua per formar materials porosos.
- Selecció de principis actius model per ser incorporats als materials porosos i pels estudis dels perfils d'alliberament.
- Preparació i caracterització de les emulsions altament concentrades, que serviran de plantilla per a l'obtenció dels materials porosos.
- Preparació i caracterització dels materials obtinguts mitjançant la polimerització dels monòmers i la reticulació dels polímers preformats i la posterior purificació

dels materials mitjançant l'eliminació dels components oliosos i tensioactius per extracció amb dissolvents amb Soxhlet i eliminació de l'aigua per liofilització.

- Estudi dels mètodes per a la incorporació dels principis actius als materials porosos per les tècniques de degoteig i per immersió, en funció de les característiques fisicoquímiques del fàrmac seleccionat i de la composició dels materials.
- Selecció dels dispositius més adequats per efectuar els estudis d'alliberament des dels materials porosos polimèrics, així com dels medis receptors.
- Estudi dels perfils d'alliberament de fàrmacs des dels materials a una solució receptora. Aplicació de models matemàtics.
- Discussió dels resultats obtinguts i elaboració de conclusions.

PART EXPERIMENTAL

1. MATERIALS

1.1. Principis actius

Es van seleccionar els principis actius ketoprofèn, clorhidrat de clindamicina i sulfat de salbutamol per ser incorporats a emulsions i materials porosos. Les propietats característiques d'aquests principis actius es descriuen breument a continuació.

Ketoprofèn

(FAGRON) (CAS 22071-15-4)

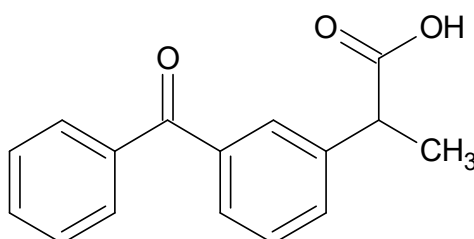


Figura 18. Estructura química del ketoprofèn

El ketoprofèn (àcid (R, S) 2-(3-benzoilfenil) propiònic) és un principi actiu que pertany al grup dels antiinflamatoris no esteroidals (NSAIDs), àmpliament utilitzat per al tractament de la inflamació, del dolor i del reumatisme. El seu pes molecular és 254 g/mol i es presenta com una pols cristal·lina blanca o gairebé blanca, pràcticament insoluble en aigua i fàcilment soluble en etanol al 96 per cent, acetona i en clorur de metilè (AEMPS, 2011). Actua inhibint la producció corporal de prostaglandina amb la inhibició reversible de l'enzim COX-2, responsable d'aquesta síntesi a partir de l'àcid araquidònic (Kantor, 1986).

El ketoprofèn, com molts NSAIDs, produeix efectes adversos com úlceres gastrointestinals, disminució del recompte de glòbuls vermells (com a resultat d'hemorràgia gastrointestinal) i, amb menor freqüència, mal renal, pèrdua de proteïnes i trastorns hemorràgics (Swetman, 2011). Aquests efectes secundaris podrien minimitzar-se transformant les formes convencionals de dosificació en sistemes

d'alliberament de fàrmacs capaços de millorar la biodisponibilitat. La curta semivida biològica ($t_{1/2} = 2,1$ h) i l'alta freqüència de dosificació (2-4 cops diaris) incrementen els riscos per l'ús prolongat als tractaments de malalties osteoarticulars (Arvidson, et al., 1994). Per aquesta raó el ketoprofèn és un principi actiu adequat per desenvolupar medicaments d'alliberament controlat, capaços d'anar alliberant el fàrmac de manera sostinguda, disminuint la incidència de determinats efectes adversos (Del Gaudio, Russo, Lauro, Colombo, & Aquino, 2009). El disseny de formes farmacèutiques que alliberen el principi actiu de manera sostinguda o retardada ha demostrat una reducció d'efectes secundaris dels NSAIDs amb la consegüent millora en el benestar i la qualitat de vida dels pacients (Del Gaudio, Russo, Lauro, Colombo, & Aquino, 2009).

Entre els estudis realitzats amb formes d'alliberament controlat de ketoprofèn als últims anys, cal destacar les que es detallen a continuació. Podlogar i col·laboradors van estudiar al 2005 l'alliberament de Ketoprofèn com a fàrmac model des de microemulsions en formulacions en les que el percentatge de tensioactiu i co-tensioactiu superaven el 80% i es va arribar a demostrar que existia una forta interacció entre el fàrmac i els components de la microemulsió (Podlogar, Rogac, & Gasperlin, 2005). Altres estudis van aconseguir establir la millora de la permeació del ketoprofèn en nano-emulsions d'èsters d'oli de palma en presència d'un 3% de limonè a través de pell de rata, sense majors problemes d'irritació cutània (Sakeena, et al., 2010). S'ha descrit la formació de perles d'alginat carregades amb ketoprofèn obtingut per filtre vibratòri injectant una suspensió de ketoprofèn-alginat a través d'un filtre de 400 micres de diàmetre (Auriemma, Del Gaudio, Barba, d'Amore, & Aquino, 2001). Alguns autors han utilitzat el catió Zn^{2+} com a reticulant juntament amb l'alginat en formulacions amb ketoprofèn en lloc de l'ió Ca^{2+} , observant-se una possible potenciació de les propietats antiinflamatòries del fàrmac en animals d'experimentació atribuïda a la presència d'antioxidants en la formulació (Gawel, Librowski, & Lipkowska, 2013), (Abbas, Schaalán, Bahgat, & El-Denshary, 2014).

Les formes de dosificació de ketoprofèn comercialitzades a Espanya són càpsules orals (50 mg/càpsula), gels tòpics (2,5%), injectables (50 mg/ml) i comprimits d'alliberament modificat (200 mg/comprimit) (AEMPS, 2020) (DOW , 2006).

En aquesta tesi doctoral s'ha seleccionat ketoprofèn, com a principi actiu, per les seves propietats fisicoquímiques (pes molecular i solubilitat) i per les seves possibilitats per desenvolupar formes farmacèutiques d'alliberament controlat per al tractament de malalties osteoarticulars. Es va utilitzar ketoprofèn 99,8% (Fagron, Espanya), com a model de molècula lipofílica per a l'estudi de la incorporació i alliberament de fàrmacs.

Clorhidrat de clindamicina

(FAGRON) (CAS 21462-39-5)

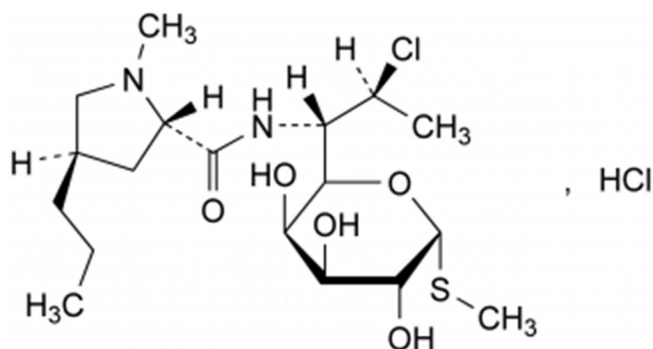


Figura 19. Estructura química del clorhidrat de clindamicina (RFE)

La clindamicina és un antibiòtic del grup de les lincosamines, d'espectre bacterià mitjà. El seu mecanisme d'acció es basa en que s'uneix a la subunitat 50S del ribosoma bacterià, inhibint la síntesi proteica. És un derivat semisintètic de la lincomicina, de la qual difereix estructuralment per la substitució d'un àtom de clor per un grup hidroxil i la inversió del carboni involucrat en la posició 7 (Sarfaraz, 2004). Posseeix activitat bacteriostàtica enfront de microorganismes gram positius aerobis i anaerobis i a elevades concentracions també té acció bactericida. La clindamicina és activa contra la majoria de cocs gram positius aeròbics, inclosos estafilococs, estreptococs pneumoniae i també és eficaç contra microorganismes gram positius i gram negatius aerobis com: *Actinomyces*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium* i alguns ceps d'*Haemophilus influenzae* i *Neisseria gonorrhoeae*. S'utilitza per al tractament d'infeccions de la pell i teixits tous així com en infeccions de peu diabètic. És més eficaç que la lincomicina, s'absorbeix millor i té un espectre antibacterià similar

(Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá (www.javeriana.edu.co), sense data)). La clindamicina està considerada dins dels medicaments essencials a nivell mundial segons la llista de medicaments essencials d'abril de l'any 2015 de l'OMS és a dir un medicament dins de la cura bàsic de la salut (WHO, 2019).

En preparacions farmacèutiques se sol utilitzar el fosfat i el clorhidrat de clindamicina El clorhidrat de clindamicina, $C_{18}H_{33}ClN_2O_5S \cdot HCl$, és una pols cristal·lina blanca o gairebé blanca, amb un pes molecular de 461,44 g/mol, molt soluble en aigua, soluble en metanol i lleugerament soluble en etanol (Swetman, 2011), (AEMPS, 2011). Posseeix un pKa de 7,6 i presenta un màxim d'absorció de la radiació ultraviolada de 210 nm (Harvey & Osol, 1980).

Quan s'administra per via oral, el 90% de la dosi s'absorbeix al tub digestiu, aconseguint concentracions de 2-3 mg/ml en el termini d'una hora després de l'administració d'una dosi de 150 mg. S'uneix a proteïnes plasmàtiques i es distribueix àmpliament en fluids i teixits corporals. En forma tòpica s'usa per tractar l'acne vulgar. A Espanya la clindamicina està comercialitzat en forma d'injectable (150 mg/ml), càpsules orals (150-300 mg/càpsula), òvuls vaginals (100 mg/òvul) i solucions, cremes i gels tòpics (1-2%) (AEMPS, 2020)

En aquesta tesi doctoral s'ha seleccionat clorhidrat de clindamicina, com a principi actiu, per les seves propietats fisicoquímiques (pes molecular i solubilitat) i per les seves possibilitats per desenvolupar formes farmacèutiques d'alliberament controlat per al tractament d'infeccions tòpiques i sistèmiques.

Sulfat de salbutamol

(FAGRON) (CAS 51022-70-9)

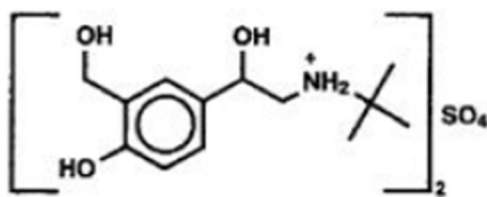


Figura 20. Estructura química del sulfat de salbutamol

El sulfat de salbutamol és un sòlid cristal·lí de color blanc a blanc trencat. El pes molecular és de 576,7 g/mol. És fàcilment soluble en agua, pràcticament insoluble o molt poc soluble en etanol al 96 per cent i en clorur de metilè. Presenta polimorfisme i cal protegir-lo de la llum (AEMPS, 2011).

El salbutamol, també denominat albuterol, és un agonista de receptor adrenèrgic beta 2 d'acció curta i ràpida, usat per a l'alleujament del broncoespasme en malalties com l'asma o la malaltia pulmonar obstructiva crònica. Es comercialitza amb el nom de Ventolin®, entre d'altres.

El sulfat de salbutamol es pot administrar per inhalació per produir un efecte directe sobre el múscul llis dels bronquis. També es pot administrar per via oral o intravenosa (Starkey, Mulla, Sammons, & Pandya, 2014). Quan l'administració del salbutamol és oral, s'absorbeix a la part alta del tracte digestiu, el seu efecte comença en 5 a 15 minuts després de la ingestió, la seva concentració màxima s'assoleix en 2-3 hores prolongant-se l'acció de 4 a 6 hores. Es metabolitza a nivell hepàtic formant metabòlits inactius. S'excreta en orina y femta en un 75%, després de 72 hores. Per inhalació actua de forma local a nivell pulmonar, pel que els nivells plasmàtics no són predictius de l'efecte terapèutic. Tal como succeeix amb altres fàrmacs administrats per inhalació, més del 85% de la dosi és deglutida essent susceptible d'absorció sistèmica. Així mateix, el començament de l'acció es produeix als 5-15 minuts, amb un efecte terapèutic màxim als 30-90 minuts. Per a la major part dels pacients la duració de l'acció és de 3-4 hores. La concentració plasmàtica màxima es va assolir després de 2-4 hores. Aproximadament el 72% de la dosi inhalada s'excreta amb l'orina en 24 hores.

El salbutamol va ser el primer agonista selectiu del receptor β_2 a ser comercialitzat el 1968. El medicament va ser un èxit i s'ha usat per al tractament de l'asma des de llavors. El BOE va publicar el 13 de juny de 2020 el llistat de medicaments que el Ministeri de Sanitat considera "essencials" per combatre el coronavirus, entre els qual està el salbutamol (Sanidad, 2020). Els efectes secundaris més comuns són el tremolor, l'ansietat, el mal de cap, l'espasme muscular, la sequedat de boca i les palpitations cardíques. Altres signes o símptomes poden ser la taquicàrdia, l'arrítmia cardíaca, sufocacions, la isquèmia miocàrdica i alteracions de la son i del comportament. Més rarament poden ocórrer reaccions al·lèrgiques com el broncospasme, manifestacions cutànies, l'angioedema, la hipotensió i la lipotímia. Una dosi alta o el seu ús perllongat pot causar la hipopotasèmia, especialment en malalts amb problemes renals, que prenen diürètics o derivats de la xantina.

A l'estat espanyol el sulfat de salbutamol està comercialitzat com a solució per a inhalació amb nebulitzador (3-6 mg en 2,5 mL de solució salina isotònica estèril), com a xarop (2 mg en 5 mL) o com a suspensió per inhalació (120 micrograms per dosi) (AEMPS, 2020).

1.2. Excipients

Per preparar les emulsions altament concentrades i els materials porosos es van utilitzar excipients diversos (monòmers, polímers, tensioactius, components oliosos i components aquosos) i a continuació es descriuen les seves característiques tècniques.

1.2.1. Tensioactius

Cremophor® RH40

(BASF) (CAS 61788-85-0)

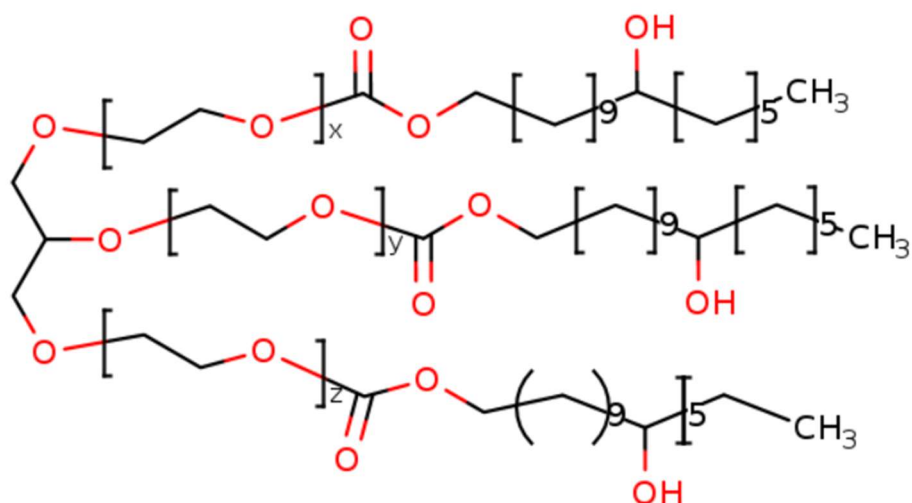


Figura 21. Estructura molecular del Cremophor® RH40

És un tensioactiu no iònic que s'obté de la reacció d'un mol d'oli de ricí hidrogenat amb 40 mols d'òxid d'etilè. El constituent principal és el oxiestereat de glicerina de polietilenglicol, que juntament amb esters d'àcids grassos de poliglicol, constitueixen la part hidròfoba del tensioactiu. La part hidròfila està formada per polietilenglicols i etoxilats de glicerina. És un pasta groguenca a temperatures inferiors als 20°C. A temperatures superiors, esdevé un líquid tèrbol viscos. El seu valor d'HLB està comprès entre 14-16. Actualment, el nom comercial ha canviat a Kolliphor® RH40.

El Cremophor® RH40 forma solucions transparents amb aigua, etanol, 2-propanol, n-propanol, acetat d'etil, cloroform, tetraclorur de carboni, toluè i xilè. És estable en solucions hidroalcohòliques i aquoses.

Les solucions aquoses de vitamines A, D, E i K per a l'administració oral i tòpica es poden preparar amb l'ajuda de Cremophor® RH40, ja que aquest no té pràcticament gust ni olor. Aquest tensioactiu permet la formació d'emulsions O/W a temperatura ambient (BASF, 2020).

Hexaetilenglicol n-hexadecil èter, C₁₆E₆

(Nikko Chemicals Co., Japó) (CAS 5168-91-2)



Figura 22. Estructura química de l'hexaetilenglicol n-hexadecil èter

Tensioactiu utilitzat per preparar emulsions per polimeritzar estirè. Té un pes molecular de 506,76 g/mol i un punt de fusió de 39-40°C

Octaetilenglicol n-dodecil èter, C₁₂E₈

(Nikko Chemicals Co., Japó) (CAS 3055-98-9)

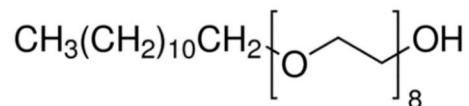


Figura 23. Estructura química de l'octaetilenglicol n-dodecil èter

Tensioactiu utilitzat per preparar emulsions per polimeritzar estirè. Té un pes molecular de 538,75 g/mol i la seva solubilitat en aigua és de 50 mg/mL.

Poloxamers

(BASF) (CAS 9003-11-6)

Els poloxàmers, coneguts amb el nom comercial de Pluronic[®] són una família de copolímers simètrics tribloc que contenen poli(òxid d'etilè) (PEO) i poli(òxid de propilè) (PPO) d'una manera lineal alternant, PEO-PPO-PEO. La característica única del bloc PPO, que és hidrofòbic a temperatures superiors a 288 K i soluble en aigua a temperatures inferiors a 288 K, condueix a la formació de micel·les formades per copolímers triblocs PEO-PPO-PEO. El nucli hidrofòbic conté el bloc PPO mentre que el bloc PEO constitueix una corona hidròfila. També es coneixen amb el nom genèric de Poloxamer. Els poloxàmers tenen un comportament similar al dels tensioactius hidrocarbonats i

formaran micel·les quan es col·loquen en un dissolvent selectiu com l'aigua. Poden formar micel·les tant esfèriques com cilíndriques (Wanka, Hoffmann, & Ulbricht, 1994). BASF, el seu fabricant original, va introduir una nomenclatura específica per diferenciar els Pluronic (**Figura 24**), de manera que si el nom va seguit de la lletra L es tracta d'un líquid, si la lletra és la P és una pasta i si la lletra és una F es tracta de flocs (*flake*). La lletra va seguida d'un número que indica 1/300 de la massa molar del bloc PPO per unimer. L'últim dígit representa una desena part del percentatge de massa molar de contingut de PEO per unimer. Com a exemple, P123 i P103 són pastes amb el mateix molar percentatge de massa de PEO per unimer (30%) amb unitats PO més llargues per a P123 (Alexandridis & Hatton, 1995). Les propietats físiques i químiques dels copolímers Pluronic® només es poden ajustar modificant la relació de massa molar entre els blocs PEO i PPO (d'1:9 a 8:2), que modifica directament les propietats i les interaccions *in vivo* amb cèl·lules i membranes cel·lulars, i proporciona un alt potencial per al disseny de nanomedicines innovadores i nous biomaterials (Kurahashi, Kanamori, Takeda, Kajib, & Nakanishia, 2012) (Pitto-Barry & Barry, 2014).

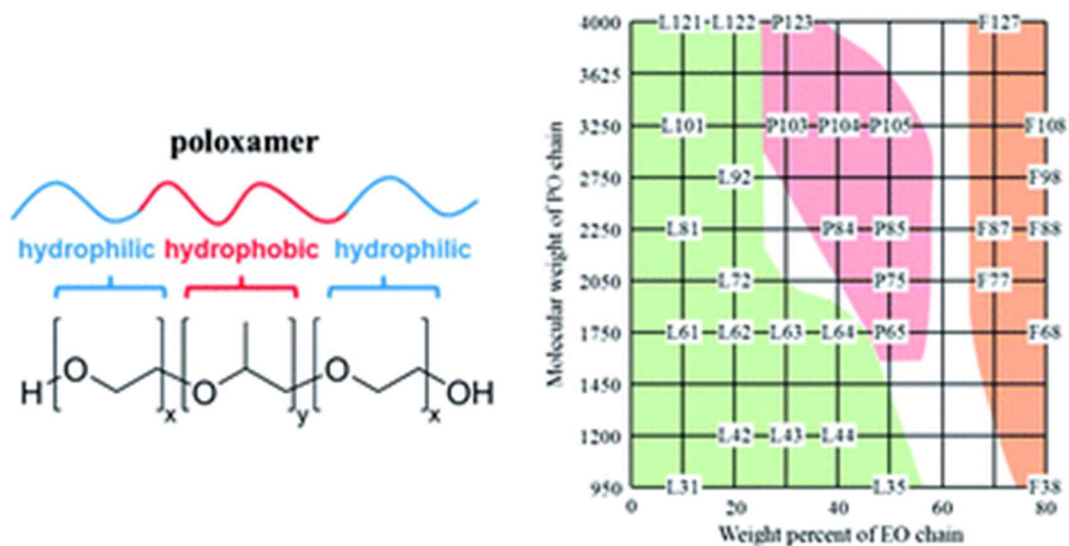


Figura 24. Estructura molecular d'un copolímer tribloc tipus Pluronic® (esquerra) i la nomenclatura establerta segons l'aspecte físic a temperatura ambient: líquid (verd), pasta (rosa), floculat (taronja) (Pitto-Barry & Barry, 2014).

Pluronic® P123 (BASF)

La fórmula química nominal de Pluronic P123 és $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{O})_{70}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{20}\text{H}$, que correspon a un pes molecular d'uns 5750 g/mol. El seu número HLB és 8. El número mitjà d'unitats d'òxid d'etilè és 39,20 i el d'òxid de propilè és 69,40 (Pitto-Barry & Barry, 2014). En una solució aquosa al 30% en pes, Pluronic P123 forma una fase de gel cúbic. Es presenta com una pols que té una densitat de 1,018 g/mL a 25°C (MERCK, 2019). S'ha utilitzat en la síntesi de materials mesoporosos de tipus silicat (Wan & Zhao, 2007)

Pluronic® P127 (BASF)

Pluronic F127 té un pes molecular de 12600 g/mol i un número HLB de 22. El número mitjà d'unitats d'òxid d'etilè és 200,45 i el d'òxid de propilè és 65,17 (Pitto-Barry & Barry, 2014). La seva densitat és 1,06 g/ml a 25 °C (MERCK, 2020). També es coneix amb el nom genèric de Poloxamer 407 o Synperonic PE/F 127 (CRODA). S'utilitza àmpliament en cosmètica per dissoldre ingredients greixosos en aigua. També es pot trobar en solucions per a la neteja de lents de contacte, on la seva finalitat és ajudar a eliminar les pel·lícules de lípids de la lent. És un component d'alguns colutoris buccals i s'ha investigat la seva aplicació en la reparació quirúrgica de vasos sanguinis tallats abans d'enganxar-los quirúrgicament (Chang, et al., 2011).

Synperonic® PE/L64 (Croda)

Tergitol® L-64 (Dow)

Synperonic PE/L64 i Tergitol L-64 també es coneixen amb el nom genèric de Poloxamer 184. El pes molecular total és aproximat 2900 g/mol; el pes molecular de la cadena de polioxipropilè és 1800 g/mol i té un 40% de polioxietilè. És líquid a temperatura ambient. El seu HLB està entre 12 i 18 (BASF, 2008). La seva densitat a temperatura ambient és 1,05 g/mL (DOW, 2006). És soluble en aigua, etanol i propilenglicol i insoluble en oli mineral. S'utilitza habitualment com a emulsionant O/W, solubilitzant i humectant en

formulacions farmacèutiques. També s'utilitza en cosmètica en desmaquillants i tònic facials. S'ha utilitzat per preparar emulsions per polimeritzar estirè.

1.2.2. Monòmers, polímers, iniciadors de polimerització i agents de reticulació

- **Per a l'obtenció de materials porosos de Polièstirè-divinil benzè:**

Estirè, abreujat com S.

(MERCK) (CAS 100-42-5)

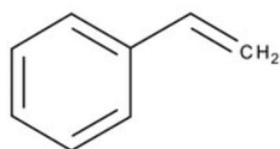


Figura 25. Estructura química de l'estirè

També denominat feniletilè o vinilbenzè. La seva massa molar és 104,15 g/mol. És un líquid incolor que té una solubilitat en aigua a 20°C de 0,24 g/L i una densitat de 0,906 g/cm³. El seu punt de fusió és -31°C i el punt d'ebullició és 145°C. És químicament estable a temperatura ambient. Conté l'estabilitzador 4-terc-butilpirocatecol. És irritant per a la pell i mucoses i pot produir toxicitat per exposició perllongada o repetida (Merck, 2017). En la seva utilització per a la preparació de materials porosos caldrà assegurar la correcta eliminació de restes de monòmer.

Divinilbenzè, abreujat com DVB.

(MERCK) (CAS 1321-74-0)

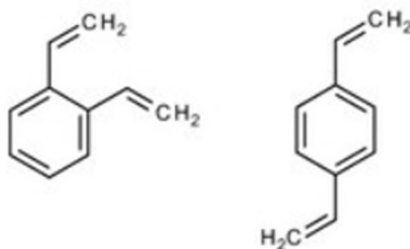


Figura 26. Estructura química del divinilbenzè

La seva massa molar és 130,18 g/mol. És un líquid groc d'olor desagradable, que té una solubilitat en aigua a 20°C de 0,005 g/L i una densitat de 0,91 g/cm³. El seu punt de fusió és -88°C i el punt d'ebullició és 195°C. Es pot descompondre per exposició perllongada a la llum. Conté l'estabilitzador 4-terc-butilpirocatequina. És irritant per a la pell, les mucoses i les vies respiratòries (Merck, 2015). Estirè i divinilbenzè es van purificar per elució a través d'òxid d'alumini cromatogràfic neutre, per eliminar l'inhibidor, que és un compost polar no volàtil.

Persulfat de potassi

(FLUKA) (CAS 7727-21-1)

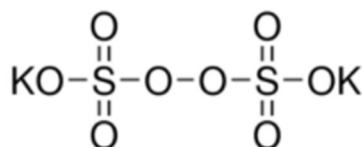


Figura 27. Estructura química del persulfat de potassi

La seva massa molar és 270,32 g/mol. És una pols blanca, que té una solubilitat en aigua a 20°C de 27 g/L. Amb una riquesa del 99%, es va utilitzar com a iniciador de la reacció de polimerització de l'estirè amb divinilbenzè.

- **Per a l'obtenció de materials porosos de Poliacrilamida:**

Acrilamida

(Merck) (CAS 79-06-1)

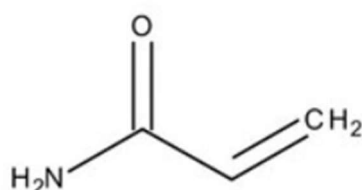


Figura 28. Estructura química de l'acrilamida

L'acrilamida (o amida acrílica) és un compost químic amb fórmula química C₃H₅NO. El seu nom de IUPAC és prop-2-enamida. El seu pes molecular és 71,07 g/mol i la seva densitat és 1,127 g/mL a temperatura ambient. És un sòlid blanc cristal·lí inodor, soluble en aigua (2,155 g/L a 30°C), etanol, èter i cloroform. L'acrilamida és incompatible amb àcids, bases, agents oxidants, ferro, i sals de ferro. Es descompon no tèrmicament per formar l'amoníac, i la descomposició tèrmica produeix el monòxid de carboni, el diòxid de carboni i òxids de nitrogen. És sensible a la llum (MERCK, 2018).

Principalment, l'acrilamida es fa servir per sintetitzar poliacrilamides, que són molt útils per al tractament d'aigües residuals, l'electroforesi en gel, la fabricació de paper, el tractament de minerals, a fabricació de teles de premsa permanents i també en la formulació de cosmètics i lents de contacte. L'acrilamida també s'utilitza en la fabricació de colorants i altres monòmers. La poliacrilamida es fa servir a molts productes d'alimentació emmidonats, fet que preocupa perquè l'acrilamida podria actuar com a agent cancerigen (Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002). El monòmer és un tòxic per inhalació i per contacte amb la pell i mucoses (MERCK, 2018). Cal tenir precaucions en la seva manipulació pels seus potencials efectes tòxics al sistema nerviós central (Liebert, 1991), (European Chemicals Bureau, 2002). Per a la preparació de materials porosos de poliacrilamida caldrà assegurar la correcta eliminació de restes de monòmer.

Bisacrilamida

(Sigma-Aldrich) (CAS 110-26-9)

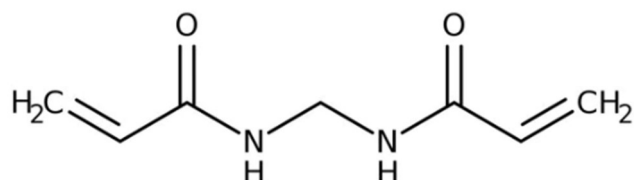


Figura 29. Estructura química de la bisacrilamida

La bisacrilamida o N,N'-metilenbisacrilamida ($C_7H_{10}N_2O_2$) té un pes molecular de 154,17 g/mol. És l'agent de reticulació més freqüent per als gels de poliacrilamida. La seva estructura està formada per dues molècules de poliacrilamida enllaçades pels seus grups amino, no reactius de cara a la polimerització. Per això, la bisacrilamida polimeritza conjuntament amb l'acrilamida però forma ponts entre les cadenes lineals de poliacrilamida i així evita el seu lliscament facilitant la formació del gel.

- Per a l'obtenció de materials porosos de Quitosan:

Quitosan

(Sigma-Aldrich) (CAS 9012-76-4)

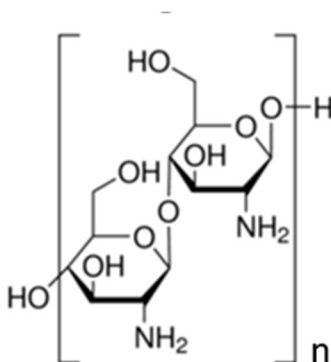


Figura 30. Estructura química del quitosan

El quitosan es un disacàrid policatònic lineal producte de la desacetilació parcial de la quitina. És el disacàrid natural més abundant a la natura després de la cel·lulosa. Es troba a l'exoesquelet d'insectes, crustacis i parets cel·lulars de fongs. Està format per dues unitats diferents, la D-glucosamina i la N-acetil-D-glucosamina distribuïdes aleatòriament a tot el polímer. Ambdues unitats estan enllaçades entre sí mitjançant un enllaç β -(1-4). El quitosan té una naturalesa catiònica que és inusual, perquè la majoria dels polisacàrids són normalment neutres o tenen càrrega negativa en medi àcid. Aquesta propietat li permet formar complexos electroestàtics o estructures multicapa amb altres polímers naturals o sintètics que tinguin càrrega negativa (Cheung, Ng, Wong, & Chan, 2015), (Islam, Bhuiyan, & Islam, 2017). A la *Real Farmacopea Española* està descrit el hidroclore de quitosan (AEMPS, 2011).

A aquesta tesi doctoral s'ha utilitzat quitosan amb un pes de molecular mitjà de 300 kDa i un grau de desacetilació del 85%, per a la preparació de materials polimèrics porosos amb ketoprofèn, utilitzant emulsions altament concentrades com a plantilla. S'ha utilitzat genipina com a agent de reticulació del quitosan.

Genipina

(Challenge Bioproducts Co.,Taiwan) (CAS 6902-77-8)

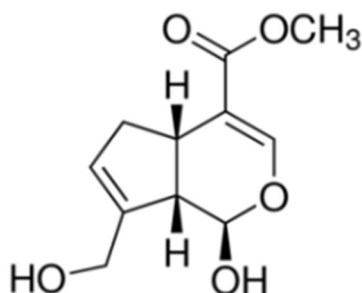


Figura 31. Estructura química de la genipina

La genipina és un compost químic que es troba a l'extracte de la fruita *Genipa americana*. És una aglicona derivada d'un glicòsid iridoide anomenat genipòsid que també està present en els fruits de *Gardenia jasminoides* (Ramos-de-la-Peña, Renard,

Montañez, Reyes-Vega, & Contreras-Esquivel, 2014). Té un pes molecular de 226 g/mol i és insoluble en aigua i soluble en dimetilsulfòxid (Merck, 2020).

S'utilitza com a agent reticulador natural per a proteïnes, col·lagen, gelatina i quitosan. Té una baixa toxicitat aguda, amb LD₅₀ i.v. 382 mg/kg en ratolins, per tant, és molt menys tòxica que el glutaraldehid i molts altres reactius de reticulació sintètica d'ús comú. A més, la genipina també s'ha estudiat en sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs, com a matèria primera per a la preparació de pigments blaus de gardènia i com a intermediari per a la síntesi d'alcaloides (Chang, Chang,, Lai, & Sung, 2003), (Muzzarelli R. , 2009).

- **Per a l'obtenció de materials porosos d'Àcid Hialurònic:**

Àcid hialurònic

(SIGMA-ALDRICH) (CAS 9067-32-7)

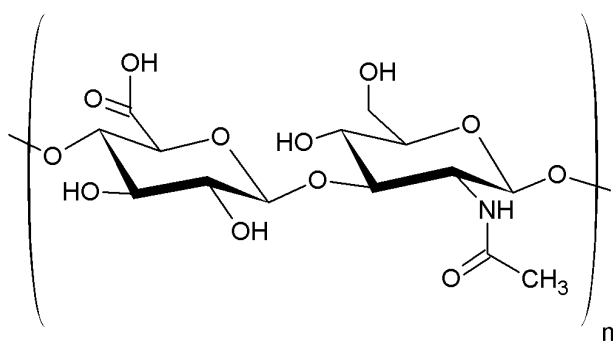


Figura 32. Estructura química de l'àcid hialurònic

L'àcid hialurònic (HA) és un polisacàrid de la família dels glicosaminoglicans format per N-acetilglucosamina (GlcNAc) i àcid glucurònic (GlcA) units per enllaç glicosídic β(1-4). S'ha utilitzat sal sòdica d'HA provinent de *Sreptococcus equi* d'un pes molecular de 1,6·10⁶ kDa i una puresa del 97%. És soluble en aigua i es presenta en forma de pols de color blanca molt higroscòpica. S'ha de conservar en un lloc sec i a una temperatura de -20°C. A la *Real Farmacopea Española* està descrit el hialuronat de sodi (AEMPS, 2011).

Aquest polímer és un component molt important de la matriu extracel·lular del teixit connectiu i es troba a la pell, cartílags, humor vitri, i en el fluid intraarticular dels genolls. L'HA juga un paper molt important en la estabilització de la matriu cartilaginosa, proliferació cel·lular, control de la morfogènesis, metàstasis del càncer, processos inflamatoris i cicatrització de ferides (Balazs, Laurent, & Jeanloz, 1986) (Chen & Abatangelo, 1999), (Entwistle, Hall, & Turley, 1996), (Hammad, Hammad, Abdelhadi, & Khalifeh, 2011).

Butandiol diglicidil èter

(SIGMA-ALDRICH) (CAS 2425-79-8)

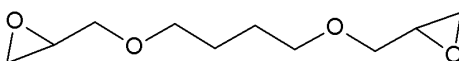


Figura 33. Estructura química del BDDE

El butandiol diglicidil èter (BDDE) s'ha utilitzat com a agent entrecreuant de l'HA. El seu pes molecular és de $202,25 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ i té una puresa del 95%. El BDDE conté dos grups epòxid terminals que poden reaccionar amb grups tals com $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ i $-\text{OH}$. El BDDE és soluble en aigua i ha estat seleccionat com a agent entrecreuant del HA, ja que un cop entrecreuat és el més citocompatible respecte a altres entrecreuants (Van Wachem, et al., 1999), (Zeeman, et al., 1999).

1.2.3. Components oliosos

Decà

(Sigma-Aldrich) (CAS 124-18-5)



Figura 34. Estructura química del decà

És un hidrocarbur alcà que es fa servir com a dissolvent no polar. En aquesta tesi s'ha utilitzat com a component oliós en la preparació d'emulsions altament concentrades per a l'obtenció de materials porosos de poliacrilamida.

Miglyol® 812

(FAGRON) (CAS 73398-61-5)

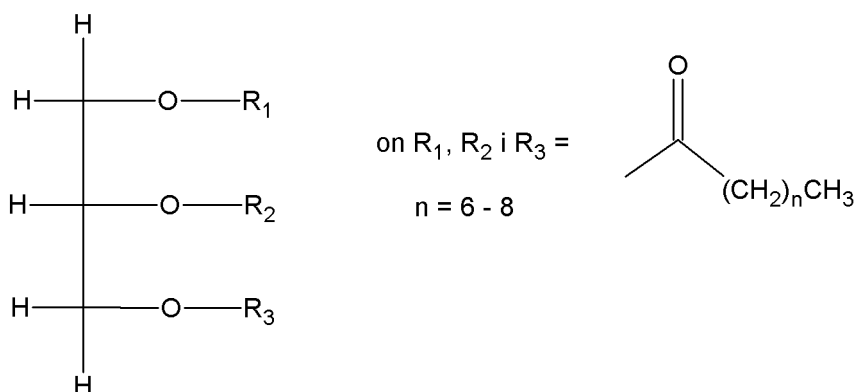


Figura 35. Estructura química del Miglyol® 812

El Miglyol® 812 és una mescla de triglicèrids de cadena mitjana obtingut de l'extracció de l'oli fixat de la fracció seca i dura de l'endosperma de la planta *Cocos nucifera L.* o de l'endosperma de la planta *Elaeis guineensis Jacq.* Està descrit a la Real Farmacopea Espanyola com a "*Triglicéridos de cadena media*" (AEMPS, 2011) i a la seva composició hi ha una barreja de triglicèrids d'àcids grassos el 95% dels quals, com a mínim, són saturats, amb 8-10 àtoms de carboni (àcid caprílic i àcid càpric).

És un líquid oliós transparent inodor i insípid amb una densitat de 0,94-0,95 g·mL⁻¹ a 20°C i una viscositat de 0,027-0,033 Pa·s a 20°C. És soluble a 20°C en els següents

dissolvents orgànics: hexà, toluè, èter dietílic, acetat d'etil, acetona, isopropanol, etanol 96%. És miscible en totes les proporcions en els hidrocarburs de parafina i olis naturals. Per a evitar la seva oxidació es recomanable emmagatzemar-lo en envasos ben tancats a una temperatura inferior als 25°C i protegits de la llum.

Els triglicèrids de cadena mitjana s'utilitzen en una gran varietat de formulacions farmacèutiques orals, parenterals i tòpiques. En formulacions orals, els triglicèrids de cadena mitjana s'usen per a la preparació d'emulsions, microemulsions, solucions, o suspensions de fàrmacs que són inestables o insolubles en medi aquós. En formulacions parenterals, els triglicèrids de cadena mitjana s'utilitzen també en la producció d'emulsions, solucions, o suspensions per a administració intravenosa. En formulacions rectals, s'usen en la preparació de supositoris que continguin matèries làbils. En cosmètica i preparacions farmacèutiques tòpiques, s'utilitzen en unguents, cremes, i emulsions líquides. Terapèuticament, s'utilitzen com a agents nutricionals. Els triglicèrids de cadena mitjana no presenten acció irritant ni tòxica per via tòpica ni ocular (Rowe, Sheskey, & Quinn, 2009) (Medicines Complete © Royal Pharmaceutical Society, 2020).

Tetradecà

(MERCK) (CAS 629-59-4)

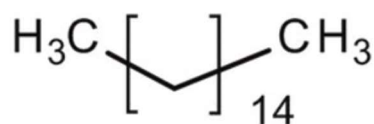


Figura 36. Estructura química del tetradecà

És un hidrocarbur alcà que es fa servir com a dissolvent no polar. En aquesta tesi s'ha utilitzat com a component oliós en la preparació d'emulsions altament concentrades per a l'obtenció de materials porosos de poliestirè-divinilbenzè.

1.2.4. Components aquosos

Aigua desionitzada

(MILLIPORE) (CAS 7732-18-5)

S'ha obtingut amb un sistema Milli-Q®. Es tracta d'un procés de purificació amb etapes successives de filtració i desionització per aconseguir una puresa caracteritzada per una resistivitat de 18,2 MΩ·cm a 25°C.

1.3. Reactius analítics

Acetonitril

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

L'acetonitril, C₂H₃N, és un dissolvent orgànic de polaritat mitjana. Miscible en aigua. L'acetonitril utilitzat és de qualitat cromatogràfica amb una puresa del 99%.

Àcid acètic

(Panreac) (CAS 64-19-7)

Àcid acètic glacial, CH₃COOH, utilitzat en la preparació dels materials porosos de quitosan.

Àcid cítric

(ACOFARMA®) (CAS 70-92-9)

$C_6H_8O_7$, utilitzat en la preparació de la fase aquosa de l'HPLC per a la quantificació del ketoprofèn.

Àcid fosfòric

(ACOFARMA[®]) (CAS 7664-38-2)

H_3PO_4 , utilitzat para ajustar el pH de la solució reguladora de fosfats (PBS) a pH 7,4.

Dihidrogen fosfat de potassi

(FAGRON) (CAS 7778-77-0)

KH_2PO_4 , utilitzat per preparar la solució reguladora de fosfats (PBS) a pH 7,4 i la fase aquosa per a l'HPLC, a pH 7,5, per les mostres amb clindamicina clorhidrat.

Clorur de sodi

(ACOFARMA[®]) (CAS 7647-14-5)

$NaCl$, utilitzat per preparar la solució reguladora de fosfats (PBS) a pH 7,4.

Etanol

(PANREAC) (CAS 64-17-5)

C_2H_5OH . Puresa > 95%, emprat per a la purificació dels materials porosos i com a cosolvent dels principis actius.

Hidrogen fosfat de disodi

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

Na₂HPO₄, utilitzat per preparar la solució reguladora de fosfats (PBS) a pH 7,4.

Hidròxid de sodi

(ACOFARMA) (CAS 1310-73-2)

NaOH, utilitzat per a la preparació de la solució de BDDE en la preparació dels materials porosos d'àcid hialurònic, per a la fase aquosa de l'HPLC per a la quantificació del ketoprofèn, i en solució al 40% per ajustar el pH de la fase mòbil de l'HPLC a pH 3.

Hidròxid de potassi

(PANREAC) (CAS 1310-58-3)

KOH, utilitzat per ajustar el pH la fase aquosa de l'HPLC a pH 7,5 en forma de solució 8N.

Fase aquosa HPLC pH 3.0 (ketoprofèn)

Àcid cítric	7,40 g
Clorur de sodi	3,89 g
Hidròxid de sodi	0,093 g
Aigua Milli-Q	q.s.p. 1L

Na OH 40% per ajustar pH

Fase aquosa HPLC pH 7,5 (clindamicina clorhidrat)

Dihidrogen fosfat de potassi	6,805 g
Aigua Milli-Q	q.s.p. 1L

KOH 8N per ajustar pH

Solució reguladora de fosfats (PBS, pH 7,4)

Dihidrogen fosfat de potassi	0,19 g
Hidrogen fosfat de disodi	2,38 g
Clorur de sodi	8 g
Aigua Milli-Q	q.s.p. 1L

1.4. Altres materials

Membrana de cel·lulosa

(ORANGE SCIENTIFIC)

La membrana de cel·lulosa utilitzada pels assaigs de difusió ha estat una *Cellu•Sep® Regenerated Cellulose Tubular Membranes T3* amb un Molecular Weight Cut Off (MWCO) de 12.000-14.000 Da i una amplada de la paret de 20 µm.

2. INSTRUMENTS I APARELLS

Microscopi òptic

El microscopi òptic utilitzat ha estat un LEICA REICHERT POLYVAR II, que disposa de diversos objectius, polaritzadors de llum, prisma, làmpada de llum blanca i de fluorescència, etc. Té acoblada una càmera digital connectada a un ordinador, el software del qual permet la captació d'imatges instantànies i la gravació de seqüències. També s'ha emprat el microscopi òptic BX51TRF-6 (Olympus) (**Figura 37**) amb càmera digital Olympus DP73 connectada a l'ordinador amb software per a l'obtenció d'imatges i vídeos. Amb aquests dos microscopis òptics s'han caracteritzat les emulsions.



Figura 37. Microscopi òptic BX51TRF-6 (Olympus)

Microscopi Electrònic de Rastreig (SEM)

El microscopi electrònic de rastreig utilitzat ha estat un HITACHI TM-1000 TABLETOP MICROSCOPE (**Figura 38**) amb un voltatge de 15 kV i fins a 10.000 augments. Aquest permet l'observació de la morfologia de mostres sòlides fins a una grandària de 7 cm de diàmetre. Amb aquest microscopi s'han caracteritzat els materials porosos.



Figura 38. Microscopi electrònic de rastreig Hitachi TM-1000 Tabletop Microscope

Equip de sorció de gasos

Per a determinar la superfície específica i la macro/mesoporositat de les mostres s'ha utilitzat un aparell de sorció de gasos AUTOSORB™ IQ (**Figura 39**). Aquest aparell consta d'un Dewar de refrigerant de 3 litres de capacitat (90 hores de funcionament) i dues parts per a mostres. Té capacitat de BET/Meso-porositat ($P/P_0 > 1 \cdot 10^{-3}$). El gas utilitzat per a fer les mesures ha estat el nitrogen, mentre que la tara (el desgasat) s'ha fet amb heli.



Figura 39. Autosorb IQ de Quantachrome Instruments

Cromatògraf líquid d'alta eficiència (HPLC)

El sistema cromatogràfic utilitzat ha estat un aparell HPLC de SHIMATZU (**Figura 40**) completament automàtic equipat amb un detector de UV/VIS. S'han utilitzat les columnes de fase reversa:

- KROMASIL® 100 C18, 25 x 0,46 mm, mida de partícula 5 µm
- Xbridge BEH C18, mida de partícula 2,5 µm
- Spherisorb ODS 2, 150 x 4,6 mm, mida de partícula 5 µm

Les dades han estat analitzades i processades mitjançant el software LC SOLUTION.



Figura 40. Equip HPLC Shimadzu

Espectrofotòmetre UV/VIS

L'espectrofotòmetre utilitzat ha estat un Thermo Fisher Helios β (**Figura 41**), dotat amb una làmpada de deuteri per fer les determinacions d'absorbància en el rang de l'ultraviolat ($\lambda = 233$ nm pel ketoprofèn, 210 nm per l'hidroclorur de clindamicina i 276 nm per al salbutamol sulfat). Les lectures s'han fet amb microcubetes de quars Starna® Tipus 18/B; de 5mm ample.



Figura 41. Espectrofotòmetre Thermo Fisher Helios β

Equip de dissolució

L'aparell de dissolució utilitzat ha estat un VISION ELITE 8TM (**Figura 42**) de HANSON RESEARCH CORPORATION (EUA). Aquest consta de 8 vasos de dissolució immersos en un bany termostatitzat. Els vasos de dissolució tenen un volum de 150 mL o de 1L i s'ha utilitzat el mètode 2 (pales) amb o sense cel·les d'immersió i el mètode 1 (mètode del cistell) de la Real Farmacopea Española (AEMPS, 2011).



Figura 42. Equip de dissolució Elite 8TM pels assaigs d'alliberament dels fàrmacs.

Liofilitzador

Els processos de liofilització s'han dut a terme mitjançant un liofilitzador CHRIST ALPHA 2-4 LD 2 de FISHER SCIENTIFIC (**Figura 43**). En el procés de liofilització s'extreu la humitat de la mostra per sublimació. La temperatura del condensador de la liofilitzadora arriba als -84°C i està connectada a una bomba de buit RZ6 d'un cabal nominal de $5,7 \text{ m}^3\cdot\text{h}^{-1}$ que permet obtenir un buit de $0,002 \text{ mbar}$.



Figura 43. Liofilizador Alpha 2-4LD Plus

Altres instruments i aparells per a la preparació de les mostres

Balances

- Balança analítica model METTLER-TOLEDO AB 104 amb una precisió de $\pm 10^{-4}$ g i capacitat màxima de 101 g.
- Balança semi-microanalítica OHAUS DISCOVERY amb una precisió de $\pm 10^{-5}$ g i una capacitat màxima de 200g.

Micropipetes

- Micropipetes model NICHIPET EX de volums: 1-10 mL, 1000-5000 μ L, 100-1000 μ L.
- Micropipetes model GILSON de volums: 2-20 μ L.
- Micropipetes digitals EDP3- Basic, RAININ[®] (Mettler Toledo), Volums 20-200 μ L i 200-2000 μ L

Bany a temperatura controlada

Cubeta de metacrilat de 15 L de capacitat amb termòstat d'immersió. La temperatura del bany s'ha controlat amb un termòstat d'immersió model TECTRON BIO amb un rang de temperatures de 0°C a 100°C i un criòstat model HAKKE EK20.

Bany d'ultrasons

- Bany d'ultrasons model TRANSONIC DIGITAL S amb una capacitat del tanc de 2,75 L, i una freqüència d'ultrasons de 40 kHz. Consta d'un sistema calefactor que permet escalfar les mostres fins a 80°C.
- Bany d'ultrasons P-Selecta
- Bany d'ultrasons Elma®

Incubador

Incubador model HERAEUS ELECTRONIC amb regulació de temperatura manual. Temperatura màxima de 70°C.

pH-metre

pH-metre digital CRISON MICRO pH 2000.

Agitadors

- Agitador tipus vòrtex models HEIDOLPH REAX TOP amb un rang de velocitats de 100-2500 rpm i HEIDOLPH REAX 2000 amb un rang de velocitats de 200-2400 rpm.
- Agitador magnètic Multipoint SBS (agitador amb tres posicions, velocitat màxima 1000 rpm).

Homogeneïtzador ultraturrax

Per a la preparació de les emulsions altament concentrades s'ha utilitzat un ULTRA-

TURRAX® T25 BASIC de IKA. El seu rang de velocitats és de $8 \cdot 10^3$ - $24 \cdot 10^3$ rpm amb una potencia de 350 w. Les eines de dispersió utilitzades han estat un dispositiu d'agitació S 25 N 8-G i S 25 N 10-G amb diàmetres del estator de 8 i 10 mil·límetres respectivament.

Extractor Soxhlet

L'extractor Soxhlet permet purificar una mostra sòlida amb un dissolvent líquid a reflux i en continu. Els components de vidre del Soxhlet provenen de FISHER SCIENTIFIC AFORA i les mantes calefactores utilitzades han estat una bateria de 4 mantes per a matrassos tipus Soxhlet de fons rodó. Les mostres s'han dipositat en cartutxos d'extracció de cel·lulosa de FILTER LAB.

3. MÈTODES

La descripció dels mètodes s'ha agrupat en tres apartats:

Mètodes per a la preparació de materials porosos

Mètodes per a la incorporació de principis actius

Mètodes per determinar l'alliberament de principis actius

3.1. Mètodes per a la preparació de materials porosos

3.1.1. Preparació d'emulsions altament concentrades

Les emulsions altament concentrades s'han preparat per dos mètodes de baixa energia: el mètode convencional o **mètode d'addicions successives**, a temperatura ambient (per emulsions W/O i O/W) i **el mètode PIT o mètode d'inversió de fases** per la temperatura, mantenint constant la composició de la mescla (per emulsions W/O).

El **mètode d'addicions successives** consisteix en la preparació d'una mescla binària (per exemple aigua i tensioactiu) i addicionar el tercer component (per exemple el component oliós) en petites quantitats per a l'obtenció d'una emulsió O/W (**Figura 44**).

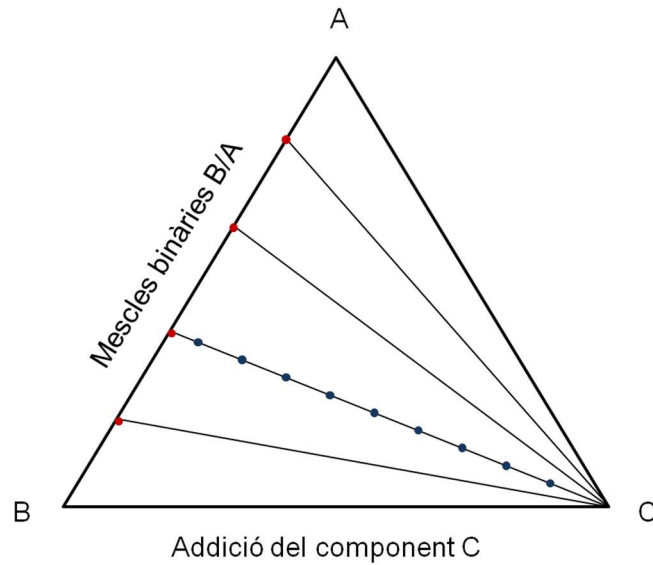


Figura 44. Representació d'un diagrama ternari on es descriu la preparació d'emulsions altament concentrades mitjançant el mètode d'addicions successives. Els punts de color vermell representen les diferents mesclades binàries (punts de partida per a l'obtenció de l'emulsió) i els punts de color blau les diferents addicions del tercer component (Roig, 2016).

A cada addició la mescla s'homogeneïtza amb un agitador de tubs, vòrtex, o bé amb un dispositiu d'alta cisalla (ultraturrax). Per a l'obtenció del sistema W/O es parteix d'una mescla binària tensioactiu i component oliós i s'addiciona l'aigua en petites quantitats tal i com s'ha fet pel sistema O/W. Les emulsions s'han preparat a temperatura ambient.

La preparació d'emulsions altament concentrades W/O pel **mètode PIT** consisteix en pesar i mesclar els components de l'emulsió altament concentrada en un recipient, agitar amb vòrtex i refredar-los a 0°C. A continuació s'escalfa ràpidament a 70°C posant la mescla en un bany termostatat a aquesta temperatura i agitant manualment de manera constant, per provocar la inversió de fases del sistema. La temperatura HLB o temperatura d'inversió de fases s'ha determinat prèviament mitjançant un mètode conductimètric i el valor pel sistema utilitzat en aquest treball s'ha obtingut de la bibliografia (Esquena, Sankar, & Solans, 2003). S'han obtingut emulsions altament concentrades W/O que s'han utilitzat per a la polimerització del poliestirè-divinilbenzè (Canal, Aparicio, Vílchez, Esquena, & García-Celma, Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams, 2012).

La mida de les gotes de l'emulsió s'ha determinat per microscòpia òptica i l'estabilitat s'ha determinat de forma qualitativa per observació visual de la fluïdificació o del procés de separació de fases al llarg del temps.

3.1.2. Polimerització

Els materials porosos o escumes sòlides de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB) i de poliacrilamida (PAM) s'han preparat per polimerització a la fase continua d'emulsions altament concentrades W/O i O/W respectivament.

Per a l'obtenció dels materials de PS-DVB a partir d'emulsions altament concentrades W/O preparades pel mètode de les addicions successives, en primer lloc es preparen en un recipient la fase aquosa (fase dispersa) que és una solució d'aigua amb persulfat potàssic, que és l'iniciador de la reacció de polimerització. Aquesta solució aquosa s'afegeix gota a gota a la mescla dels altres components: monòmers, tensioactiu i component oliós, que estan en un altre recipient de vidre o de plàstic, amb agitació constant i intensa amb un vòrtex, a 25°C. El procés per preparar 10 g d'emulsió és lent i es finalitza en 90 minuts aproximadament. És important tenir en compte que si la incorporació de la fase aquosa no es fa lentament i amb agitació intensa, es produeix una ràpida separació de fases

Per a l'obtenció dels materials de PS-DVB en emulsions altament concentrades W/O preparades pel mètode PIT (Esquena, Sankar, & Solans, 2003), es mesclen tots els components (aigua, monòmers, iniciador, tensioactius, component oliós) en un mateix recipient de vidre o de plàstic i s'incrementa la temperatura ràpidament des de 0°C fins a 60°C. Es manté la mescla a 60°C durant 48 hores, que és el temps necessari per assegurar que la reacció de polimerització ha tingut lloc.

Per a l'obtenció dels materials de PAM en emulsions altament concentrades O/W, preparades pel mètode d'addicions successives, la fase interna que és el component oliós

(decà), s'afegeix lentament, a 25°C amb agitació intensa i contínua amb un homogeneïtzador d'alta cisalla (ultraturrax) a la mescla de tots els altres components (aigua, tensioactiu, monòmers i iniciador de la reacció de polimerització), que estan en un recipient de vidre o plàstic. El procés per preparar 10 g d'emulsió té lloc en 60 minuts aproximadament. És important tenir en compte que si la incorporació del component oliós no es fa lentament i amb agitació intensa, es produeix una ràpida separació de fases.

Finalitzada la reacció de polimerització, tant per a l'obtenció dels materials de PS-DVB com pels materials de PAM, els monòlits humits obtinguts s'extreuen trencant el recipient amb molta cura perquè el material és molt fràgil, trencant el recipient. A continuació es procedeix a la purificació per extracció en Soxhlet, per eliminar restes de component oliós, tensioactius, monòmers que no hagin polimeritzat, i la posterior liofilització per eliminar les restes d'aigua.

3.1.3. Incorporació de polímer i reticulació a l'emulsió altament concentrada

Els materials porosos o escumes sòlides de quitosan (QS) i àcid hialurònic (HA) s'han preparat per incorporació dels polímers preformats a la fase contínua d'emulsions altament concentrades O/W i posterior adició dels agents de reticulació. Les emulsions s'han preparat pel mètode de les adicions successives.

Per a l'obtenció dels materials porosos de QS (Miras, Vílchez, Solans, & Esquena, 2013), s'afegeix gota a gota el component oliós (Miglyol 812) a la mescla de tensioactiu i solució aquosa de QS amb àcid acètic, amb agitació contínua i intensa amb vòrtex. Finalment s'addiciona la solució de genipina (reticulant) en PBS i es manté a 40°C durant 72 hores. Aquest mètode s'ha utilitzat per preparar 10 g d'emulsió, però per preparar 80 g d'emulsió, s'ha utilitzat un agitador de pales a 700 rpm.

Per a l'obtenció dels materials porosos d'HA (Roig, Blanzat, Solans, Esquena, & García-Celma, 2018), s'afegeix gota a gota el component oliós (Miglyol 812) a la mescla de tensioactiu i solució aquosa de HA amb agitació intensa i constant mitjançant homogeneïtzador d'alta cisalla (untraturrax). Finalment s'afegeix una solució bàsica de BDDE (reticulant). S'agita fins a la incorporació total de la solució de reticulant i es manté a 40°C durant 8 hores.

Finalitzada la reacció de reticulació (o entrecreuament) dels polímers, tant per a l'obtenció dels materials de QS com pels materials d'HA, els monòlits humits obtinguts s'extreuen, amb molta cura perquè el material és molt fràgil, trencant el recipient. A continuació es procedeix a la purificació per extracció en Soxhlet, per eliminar restes de component oliós, tensioactius, excés d'agent reticulant o polímer no reticulat, i la posterior liofilització per eliminar les restes d'aigua.

3.1.4. Purificació i assecat dels monòlits

Els monòlits humits de material porós es renten primer amb etanol durant 12 hores i després amb aigua durant 12 hores, a 60°C, amb un volum de solvent almenys 10 vegades superior al volum de la mostra de monòlit. Per això els monòlits es dipositen en un extractor Soxhlet en reflux i en continu per tal d'assegurar l'eliminació dels productes residuals i impureses.

A continuació, els monòlits es refreden amb una mescla de gel i acetona durant 10 minuts i es liofilitzen durant 48 hores, per assegurar l'eliminació completa de l'aigua.

Els materials porosos obtinguts es tallen amb fraccions mitjançant un bisturí d'acer inoxidable. A aquestes fraccions de monòlit s'incorporarà el fàrmac i s'estudiarà el seu alliberament.

Per tal d'obtenir material porós en forma de pols i estudiar la incorporació de fàrmac, alguns monòlits de PS-DVB es van micronitzar amb un molí rotatiu de boles Mixer Mill

MM 200 (Retsch) amb dues boles d'acer inoxidable de 7,15 g a 250 rpm durant 3 min. La proporció en pes bola-pols va ser de 15.

3.1.5. Modificació superficial dels materials mitjançant tecnologia de plasma

Per afavorir la incorporació d'alguns principis actius als monòlits de PS-DVB, es va procedir a la seva funcionalització. L'afinitat dels materials porosos per les solucions de fàrmac depèn de les propietats de les escumes sòlides, de la seva composició, de les propietats hidròfiles/lipòfiles i de la seva porositat, així com de les propietats de la solució de fàrmac. S'ha estudiat la modificació superficial dels materials porosos polimèrics mitjançant tecnologia de post-descàrrega de plasma (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009). La metodologia té l'avantatge de ser un procés sec, que no utilitza solvents ni genera residus i es realitza a temperatura ambient.

El plasma es genera quan un gas a baixa pressió i a una temperatura propera a la temperatura ambient s'exposa a un camp elèctric i es generen radicals, ions, electrons, fotons i altres espècies excitades. A la post-descàrrega de plasma, només queden les espècies estables o metaestables que, degut a la seva elevada reactivitat, poden interaccionar físicament o químicament amb la superfície d'un substrat a una profunditat de menys de 100 nm (Grill, 1994). Com a resultat del tractament amb plasma, la superfície del material polimèric porós es pot funcionalitzar generant nous grups químics i/o eliminar aquesta superfície, mantenint intactes les propietats de la resta del material.

Les escumes sòlides de PS-DVB estudiades són molt hidrofòbiques, per la seva composició química i per la seva elevada rugositat. El tractament durant un curt període de temps amb post-descàrrega de plasma produeix un notable augment de la humectabilitat superficial, millorant l'absorció de compostos hidròfils.

El tractament dels monòlits de PS-DVB es van fer amb un reactor de plasma experimental (**Figura 45**), seguint la metodologia descrita a la bibliografia (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009) i amb temps de descàrrega entre 10 i 900 s, utilitzant plasma atmosfèric. El flux d'aire va ser 0,11 L/min, la pressió 200Pa, la freqüència 20 KHz i la potència 75-100W.

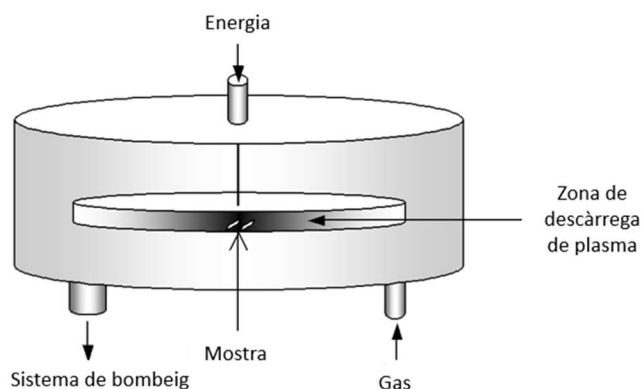


Figura 45. Esquema del reactor experimental de plasma (Canal, et al., Macroporous solid foams prepared from highly concentrated emulsions: Preliminary studies of drug delivery (Poster Communication), 2008).

Per a caracteritzar la descàrrega de plasma es va realitzar espectroscòpia òptica d'emissió amb una fibra òptica connectada a un espectròmetre Jobin-Yvon 270M equipat amb una càmera amb un detector CDD (*coupled Device detector*).

3.2. Caracterització dels materials porosos

Es va estudiar la topografia de les escumes sòlides mitjançant microscòpia electrònica de rastreig (SEM), també es va determinar la superfície específica i la porositat dels materials polimèrics.

3.2.1. Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

La microscòpia electrònica de rastreig (SEM, *scanning electron microscopy*) permet l'observació i caracterització de materials orgànics i inorgànics en escales nanomètriques i μ micromètriques, a més de tenir la capacitat d'obtenir imatges tridimensionals de superfícies en un ampli rang de materials, utilitzant les interaccions electró-material. La tècnica SEM permet obtenir imatges topogràfiques a magnificacions molt altes i consisteix a fer incidir un feix d'electrons sobre la mostra. Aquest bombardeig d'electrons provoca l'aparició de diferents senyals, tals com electrons Auger, electrons secundaris, electrons retrodispersats, raigs X, etc. Els electrons secundaris són els que proporcionen la imatge de la morfologia superficial de la mostra (Inkson, 2016).

Per aconseguir les millors condicions d'imatge en SEM es necessari que les mostres siguin conductores. Per això es recobreix la mostra amb una fina capa d'or o de carboni. Posteriorment, es rastreja la superfície amb electrons accelerats que viatgen a través del canó. Un detector format per lents basades en electroimants, mesura la quantitat i intensitat dels electrons que retorna la mostra, sent capaç de mostrar figures en tres dimensions mitjançant imatge digital.

Per a la caracterització de les escumes sòlides, el material porós sec es va recobrir de pols de grafit o amb or i es van prendre microfotografies. Es va realitzar amb el microscopi de la Plataforma NANBIOSYS del CIBER-BBN ubicat a l'IQAC-CSIC i també al servei de Microscòpia electrònica dels Centres Científics i Tecnològics de la Universitat de Barcelona (CCiTUB).

3.2.2. Determinació de la superfície específica i de la porositat

Per a determinar la superfície específica i la porositat de les escumes sòlides s'ha utilitzat un aparell de sorció de gasos que permet obtenir les isoterms d'adsorció i desorció de nitrogen dels materials porosos. D'acord amb la teoria BET (Brunauer, Emmett, & Teller,

1938) que amplia la teoria de Langmuir mitjançant les suposicions d'adsorció en multicapa i condensació capil·lar, s'obté per a les situació d'equilibri la següent equació que descriu l'adsorció d'un gas en funció de la seva pressió parcial:

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

on P_0 és la pressió de saturació del vapor, v_m representa el volum de gas adsorbit quan tota la superfície de la mostra està coberta per una monocapa, i C és la constant BET que relaciona la calor d'adsorció de la primera capa i la calor d'adsorció de les multicapes. Normalment, el model BET és vàlid en el rang de pressions relatives de $0,05 < P/P_0 < 0,35$. El valor del pendent i el valor de l'ordenada a l'origen ens permet calcular la quantitat de volum adsorbit per la monocapa així com determinar la constant BET (Figura 46).

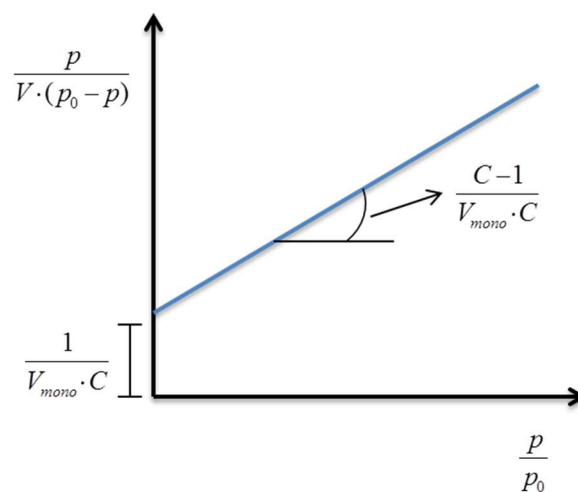


Figura 46. Representació lineal de la isoterma d'adsorció del gas en la regió lineal, segons el model teòric BET.

Amb el valor del volum adsorbit per la monocapa, v_m , es calcula la quantitat d'adsorbat que es diposita en una monocapa, X_m . Així, es determina la superfície específica del material mitjançant la següent relació (Fagerlund, 1973):

$$A = \frac{X_m}{M} U_0 N_A$$

on M és el pes molecular de l'adsorbat (generalment nitrogen) i U_0 és el valor de l'àrea molecular de la secció transversal de l'adsorbat (16,2 Å² pel nitrogen).

La distribució de la mida de porus es va calcular utilitzant el mètode BJH (Barret, Joyner, & Halenda, 1951) aplicat a les corbes de desorció. Aquest mètode es basa en l'equació de Kelvin, que estima la pressió a la que l'adsorbat s'evaporarà d'un porus cilíndric d'una mida determinada. Això permet calcular la mida de porus a partir de la isoterma de desorció.

$$\ln \left(\frac{P^*}{P_0} \right) = - \left(\frac{2\gamma v \cos \theta}{R T r_m} \right)$$

A l'equació de Kelvin, P^* és la pressió de condensació crítica, γ és la tensió superficial del líquid, v és el volum molar de l'adsorbat condensat, θ és l'angle de contacte entre el sòlid i la fase condensada (que es considera zero quan l'adsorbat és nitrogen i llavors $\cos\theta=1$), r_m és el radi mitjà de corbatura del menisc líquid, R és la constant universal dels gasos i T la temperatura absoluta.

Mitjançant el programa *ImageJ* aplicat a imatges de microscòpia òptica es va mesurar la mida dels porus (definites com espais buits) i la mida de les connexions entre porus (definites com a finestres que connecten els porus més grans). Es van mesurar aproximadament 200 porus i 200 connexions entre porus i es van calcular els valors mitjans dels diàmetres i les desviacions estàndard. La porositat (P), definida com a percentatge de volum de porus, es va calcular amb la densitat aparent (densitat *bulk*, ρ_b), i la densitat real (densitat *skeletal* dels materials no porosos, ρ_s), assumint que aquesta darrera és la mateixa que la dels polímers no porosos, tal com es troba a la bibliografia.

$$P = 100 (1 - \rho_b / \rho_s)$$

També és possible determinar el tipus de porositat de la mostra examinant el cicle d'histèresi entre la isoterma d'adsorció i la isoterma de desorció de nitrogen (**Figura 47**) (Mason, 1988).

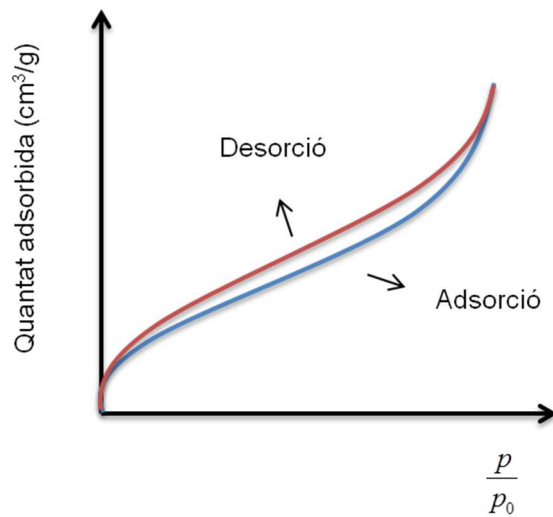


Figura 47. Representació del cicle d'histèresi entre les isoterms d'adsorció i desorció de nitrogen.

Això es degut a que la presència de poros provoca una condensació capil·lar de l'adsorbat que produeix una diferència (cicle d'histèresi) entre les pressions d'adsorció i de desorció.

Per caracteritzar els materials porosos obtinguts es va determinar la mida dels porus i la capacitat d'adsorció de nitrogen mitjançant l'adsorció de gas i la interpretació posterior de les isoterms d'adsorció. Es va utilitzar un equip de sorció de gasos: el porosímetre Quantachrome Autosorb-iQ. Les mostres es van desgasejar durant 12h a 55°C, per eliminar humitat i qualsevol component volàtil present, i es van pesar abans de realitzar l'assaig. Es va utilitzar el mètode BET (Brunauer, Emmett, & Teller, 1938) per calcular la superfície específica a partir de la corba d'adsorció.

A la Real Farmacopea Española (AEMPS, 2011) hi ha descrit un mètode per a la determinació de la porositat i la distribució de mida de porus de materials sòlids per porosimetria de mercuri. La tècnica es basa en la mesura del volum de mercuri que penetra en un sòlid porós en funció de la pressió aplicada. La mesura inclou només aquells porus en els que pot penetrar el mercuri a la pressió aplicada. Es tracta d'un assaig comparatiu, destructiu i que utilitza mercuri, que és un component tòxic i difícil d'eliminar del medi. No s'ha considerat un mètode adient per la fragilitat de les escumes poroses obtingudes.

3.2.3. Determinació de l'angle de contacte

L'angle de contacte (θ) es va calcular a partir de les mesures de la força dinàmica de mullat realitzades mitjançant el mètode de Wilhelmy en una electrobalança (KSV Sigma 70) (Berg, 1993). Les mostres es van escanejar a 0,5 mm/min utilitzant com a líquid de mullat aigua Milli-Q.

3.3. Mètodes per a la incorporació de principis actius

Els principis actius s'han incorporat als materials polimèrics porosos per diferents mètodes, en funció de les característiques dels materials emprats. Es descriuen a continuació.

3.3.1. Mètode de degoteig

S'ha preparat una solució del fàrmac a una concentració determinada i s'ha addicionat sobre l'escuma sòlida. L'addició s'ha dut a terme en petites quantitats (gota a gota), fins a la total incorporació de la solució o fins que ja no admetia més. Després, l'escuma sòlida s'ha deixat assecar a 50°C fins a la total evaporació del solvent (**Figura 48**).

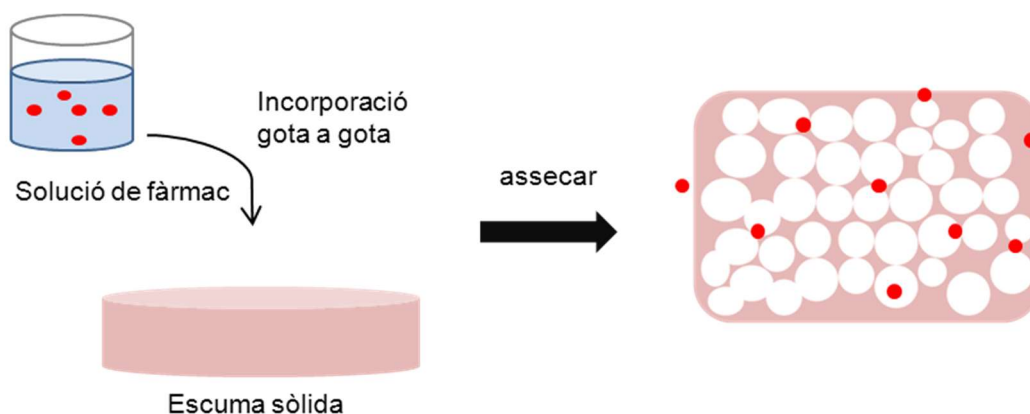


Figura 48. Representació esquemàtica de la incorporació del fàrmac a les escumes sòlides per degoteig (Roig, 2016).

La quantitat de fàrmac incorporat a l'escuma sòlida s'ha determinar per diferència de pes de la mostra abans i després de la incorporació del fàrmac, un cop eliminat el solvent per desecació.

Aquest mètode s'ha emprat en la incorporació de colorants, de solució hidroalcohòlica de ketoprofèn a materials de PS-DVB, a materials de PS-DVB modificats superficialment amb tecnologia de plasma i a materials d'HA.

3.3.2. Mètode d'immersió

Es preparen solucions hidroalcohòliques de principi actiu a diferents concentracions. En un recipient de vidre es disposen 10 mL d'una solució de principi actiu i s'introdueix un fragment de monòlit prèviament pesat. El material s'impregna durant 24 hores amb la solució de fàrmac i en absència de llum. Després de 24 hores d'immersió a 25°C, els fragments de monòlit s'introdueixen en una estufa a 40°C durant 24 hores, per evaporar el solvent fins a pes constant. La quantitat de principi actiu incorporat és l'increment de pes que té el monòlit després d'aquest procediment en relació al pes inicial del monòlit.

3.4. Determinació de la concentració dels principis actius

Els principis actius utilitzats han estat: ketoprofèn, clorhidrat de clindamicina i sulfat de salbutamol. A més, en estudis preliminars es van assajar els colorants blau de metilè i Sudan III per avaluar els mètodes d'incorporació de principi actiu.

3.4.1. Determinació quantitativa del ketoprofèn

La cromatografia líquida d'alta eficiència (HPLC) és una tècnica utilitzada per a la separació de components d'una mescla, basada en diferents tipus d'interaccions químiques o físiques entre els analits i la columna cromatogràfica. En cromatografia líquida, la fase mòbil és un líquid que flueix a través de la columna que conté la fase estacionària.

S'ha utilitzat el règim d'elució isocràtic que consisteix en la separació en un dissolvent de composició constant al llarg del temps. La mostra a analitzar passa a través de la columna cromatogràfica a través de la fase estacionària (típicament un cilindre amb petites partícules amb certes característiques químiques en la seva superfície) mitjançant el bombeig de líquid (fase mòbil) a alta pressió a través de la columna. Els diferents components de la mostra es retarden de manera diferent depenent de les interaccions químiques o físiques amb la fase estacionària a mesura que avancen a través de la columna. El grau de retenció dels components depèn de la seva naturalesa, la composició de la fase estacionària i la fase mòbil. El temps necessari perquè un component elueixi de la columna s'anomena temps de retenció i es considera una propietat característica d'identificació d'un component en una fase mòbil i estacionària determinades.

El KP ha estat analitzat per HPLC. El sistema cromatogràfic utilitzat ha consistit en un aparell Shimadzu amb una columna de fase reversa Kromasil® 100-5C18, i un detector de UV fixat a una longitud d'ona de 233 nm per a la detecció del KP.

La elució del KP per la columna ha tingut lloc a temperatura ambient utilitzant una fase mòbil composta d'un 55% d'acetonitril com a fase orgànica i un 45% de fase aquosa (pH 3,0). El cabal ha estat d'1 mL/min, i el volum d'injecció de 20 µL. El temps d'elució pel ketoprofèn ha estat de 7 min amb la columna Kromasil (**Figura 49**) i de 3,4 min amb la columna Xbridge BEH .

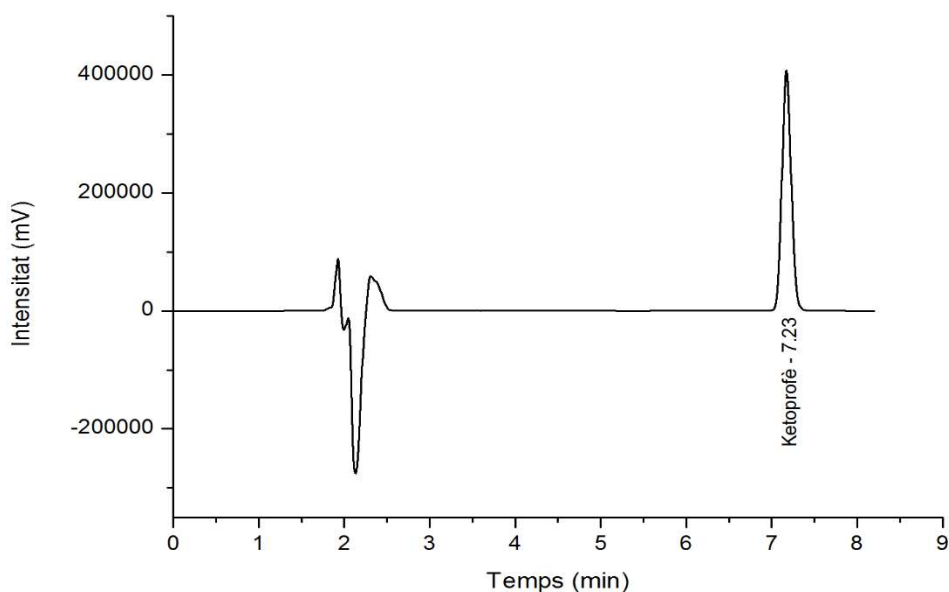


Figura 49. Cromatograma corresponent al KP mitjançant l'ús d'una columna de fase reversa, Kromasil® 100-5 C18, i amb les condicions analítiques especificades anteriorment.

El mètode d'HPLC descrit ha estat prèviament validat.

Algunes determinacions de ketoprofèn es van realitzar mitjançant espectrofotometria UV-visible, amb l'equip Thermo Spectronic Helios β.

3.4.2. Determinació quantitativa del clorhidrat de clindamicina

Seguint el mètode proposat per la Farmacopea dels Estats Units (USP), les condicions experimentals per a l'anàlisi del clorhidrat de clindamicina mitjançant HPLC han sigut les següents: Columna Spherisorb ODS 2 (150 x 4,6mm, 5 µm), utilitzant com a fase mòbil

una mescla d'acetonitril: solució d'hidrogenfosfat de potassi a pH 7,5 (ajustat amb una solució d'hidròxid potàssic 8N) (550:450) en volum. El flux es va fixar en 1 mL/min i la longitud d'ona del detector corresponent al màxim d'absorció del clorhidrat de clindamicina va ser de 210 nm. El volum d'injecció va ser de 50 µL. El temps de retenció del principi actiu en aquestes condicions va ser de 6 minuts.

3.4.3. Determinació quantitativa del sulfat de salbutamol

Les determinacions de sulfat de salbutamol es van realitzar mitjançant espectrofotometria UV-visible, amb l'equip Thermo Spectronic Helios β, a una longitud d'ona de 276 nm.

3.5. Mètodes per determinar l'alliberament de principis actius

Inicialment, als estudis preliminars, es van utilitzar vasos de vidre topazi termostatats on es van introduir bosses de diàlisi que contenien els materials porosos amb fàrmac i es va estudiar el seu perfil d'alliberament a una solució receptora (PBS a pH 7,4). Prèviament es va verificar que complia condicions *sink* en aquest medi. El medi receptor es mantenia en constant agitació mitjançant placa magnètica i imans, sempre a temperatura de 37°C.

Els estudis posteriors de difusió del principi actiu des dels materials porosos preparats fins una solució receptora s'han dut a terme amb un equip de dissolució automatitzat. L'equip de dissolució és el Vision Elite 8TM de Hanson Research Corporation (EUA), que consta de 8 vasos de dissolució immersos en un bany termostatitzat. Hi ha vasos de 900 mL de capacitat i de 150 mL, en vidre topazi. Els vasos estan coberts per unes tapes de teflon amb orificis per on passen l'eix d'agitació, les sondes de presa de mostra, de reposició de solució receptora i la sonda de temperatura. Estan automatitzades la presa de mostres a intervals prefixats, la reposició de solució receptora, l'agitació i el control

de temperatura. Les mostres extretes es dipositen en vials en un mòdul denominat **Autofill**, per ser analitzades posteriorment. Tot l'equip està controlat pel mòdul **Autoplus**. La primera mostra de solució receptora s'ha extret al minut 5 d'haver començat l'estudi. Les següents en intervals de 15 minuts fins a la primera hora. La segona hora en intervals de 30 minuts. Les següents mostres s'han extret en intervals d'una hora fins a assolir les primeres 8 hores d'estudi. Les últimes mostres s'han obtingut passades 22 hores de l'inici de l'estudi i a intervals d'una hora fins a la finalització d'aquest després de 24 hores.

S'han assajat diferents dispositius per avaluar la idoneïtat dels mètodes emprats per a l'assaig de dissolució d'aquests nous materials. S'han estudiat tres mètodes, que es descriuen a continuació:

- a) Aparell 1 o mètode del cistell perforat
- b) Aparell 2 o mètode de paleta, amb bossa de diàlisi
- c) Aparell 2 o mètode de paleta, amb un dispositiu específic per formes semisòlides anomenat cel·la d'immersió.

3.5.1. Aparell 1 o mètode del cistell perforat

A l'**aparell 1**, el fragment de monòlit es col·loca en un petit cistell d'acer inoxidable fixat a l'extrem de l'eix central (**Figures 50 i 51**). L'agitació s'aconsegueix girant el cistell perforat a una velocitat de rotació que sol ser de 100 rpm, per això també s'anomena cistell rotatori. Les parets del cistell estan perforades i l'avantatge d'aquest mètode és que el monòlit està en contacte directe amb la solució receptora, sense la interferència de cap membrana.

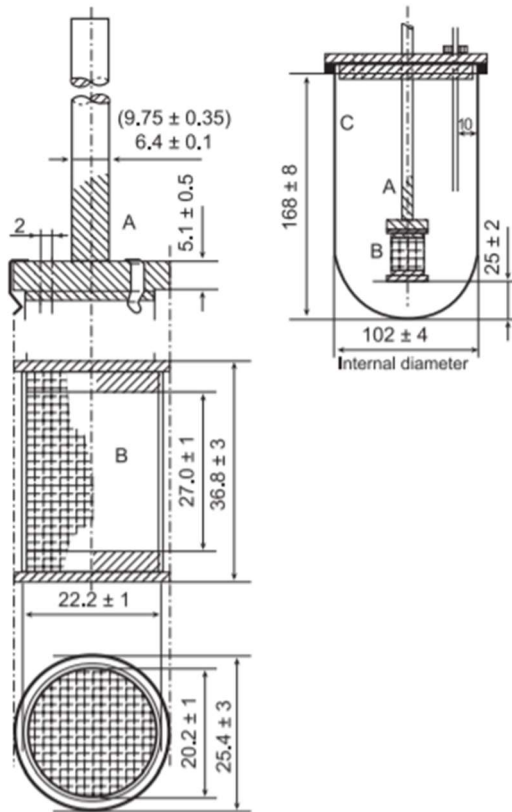


Figura 50. Aparell 1, element agitador en cistell perforat, segons la Farmacopea Europea (EDQM, 2019). Les dimensions estan expressades en mm.

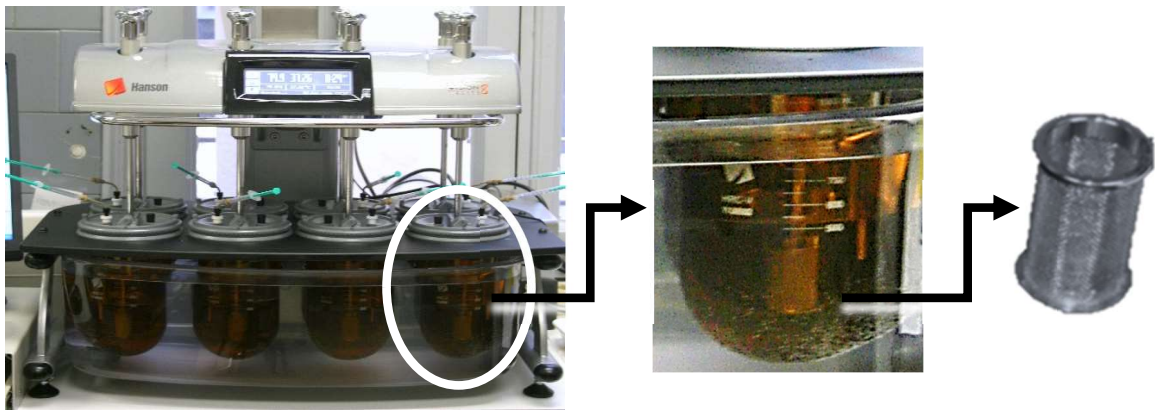


Figura 51. Imatge de l'aparell I utilitzat.

Es pesa el fragment de monòlit que té una concentració coneguda de principi actiu i es situa a l'interior del cistell perforat. Es submergeix en una solució receptora, que és una solució de PBS a pH 7,4. A intervals prefixats, s'extreu mostra de la solució receptora i s'afegeix el mateix volum de solució de PBS a la mateixa temperatura, per mantenir el

volum constant. Es determina la quantitat de principi actiu a la solució receptora i es representa el percentatge de principi actiu cedit en funció del temps. L'assaig dura 24 hores.

3.5.2. Aparell 2 o mètode de paletes amb bossa de diàlisi

A l'**aparell 2**, el fragment de monòlit es col·loca en un sac de diàlisi, tancat pels dos extrems amb unes pinces que pel seu pes fan que la bossa de diàlisi es depositi al fons del vas de vidre que conté la solució receptora. L'agitació s'aconsegueix mitjançant una paleta agitadora que està unida a l'eix (**Figura 52**).

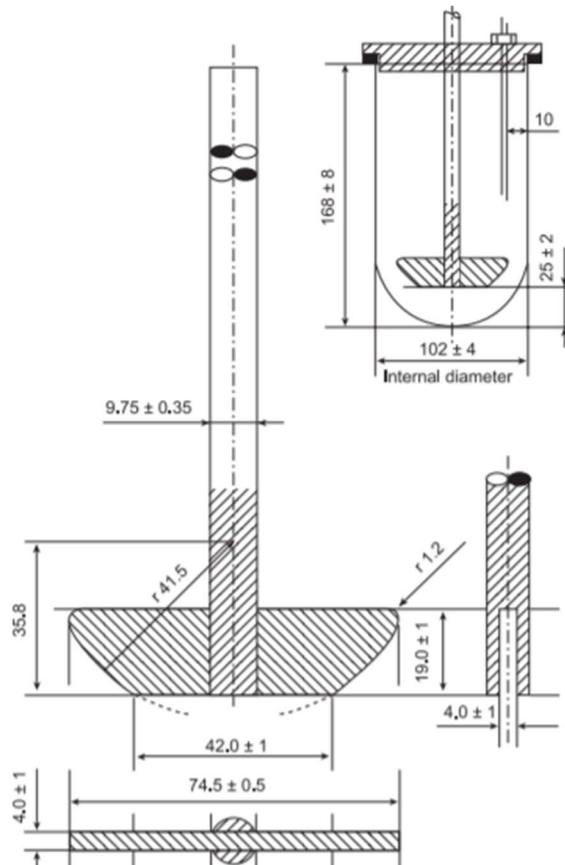


Figura 52. Aparell 2, element agitador en paleta, segons la Farmacopea Europea (EDQM, 2019). Les dimensions estan expressades en mm.

Es prepara un fragment tubular de membrana de diàlisi i es tanca per un costat amb pinces. Es pesa el fragment de monòlit que té una concentració coneguda de principi actiu a l'interior de la bossa de diàlisi; s'afegeix solució de PBS a l'interior de la bossa i es tanca l'altre extrem amb pinces. Es submergeix en una solució receptora, que és una solució de PBS a pH 7,4. Es manté una agitació constant amb la paleta. A intervals prefixats, s'extreu mostra de la solució receptora i s'afegeix el mateix volum de solució de PBS fresca, per mantenir el volum constant. Es determina la quantitat de principi actiu a la solució receptora i es representa el percentatge de principi actiu cedit en funció del temps. L'assaig dura 24 hores.

L'avantatge que té aquest mètode és que a dintre de la bossa es poden introduir fragments irregulars de monòlit, fins i tot en forma pulverulenta. Les limitacions del mètode és que la membrana de diàlisi pot retenir el principi actiu i que les dimensions de la bossa de diàlisi poden variar de una mostra a una altra i llavors, la superfície en contacte amb la solució receptora pot ser diferent en tots els replicats. La bossa de diàlisi no és un mètode oficial per fer l'assaig de dissolució; és una adaptació de l'aparell 2 per als materials porosos, que s'ha utilitzat en aquest treball de recerca.

3.5.3. Aparell 2 o mètode de paletes amb cel·la d'immersió

A l'**aparell 2**, s'han substituït els vasos convencionals de 900 mL per uns vasos de fons pla amb 150 mL de capacitat, també de vidre topazi. Als vasos s'introdueix un contenidor específic per a formulacions semi sòlides que rep el nom de cel·la d'immersió (*ointment cell*) (**Figura 53**). El sistema s'agita mitjançant una paleta.

La cel·la d'immersió està construïda de politetrafluoretilè i té una secció per a la mostra a assajar de 15 mm i permet un volum de mostra de 45 mm². Consta d'un cilindre de borosilicat i d'una rosca per a mantenir estanca la formulació. Es col·loca una membrana hidròfila de cel·lulosa en cada cel·la d'immersió per tal de separar la formulació de la solució receptora. La solució receptora consisteix en 150mL de solució reguladora de

fosfats a pH 7,4 (PBS). La temperatura de la solució receptora ha estat de 37°C. La velocitat d'agitació de les pales per a cada vas de dissolució s'ha ajustat a 25 rpm.

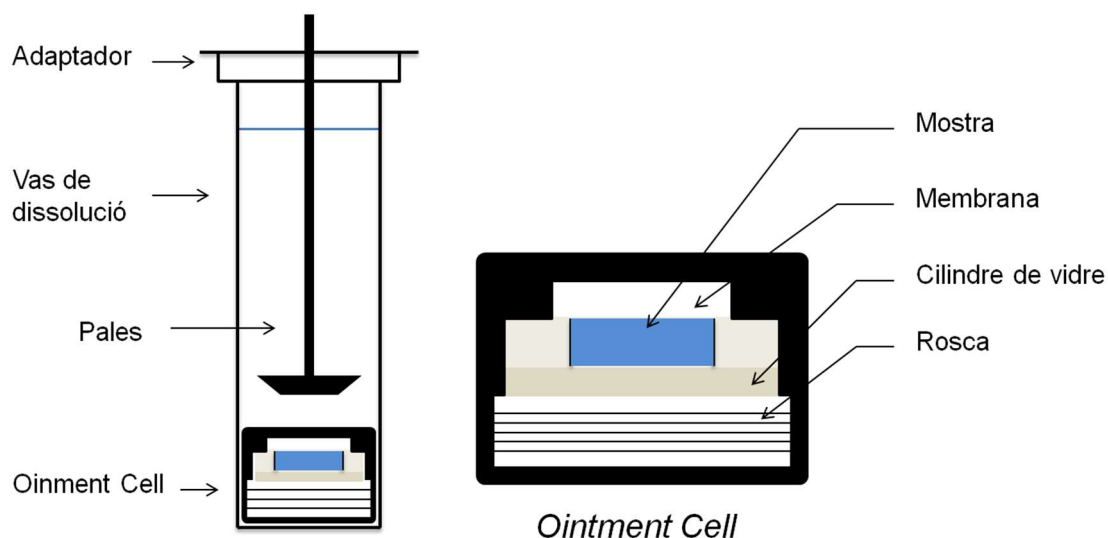


Figura 53. Dibuix esquemàtic del vas de dissolució juntament amb la cel·la d'immersió.

A cada cel·la d'immersió s'ha situat una quantitat de monòlit de 8 -10 mg. En quan a la solució receptora (PBS), s'introdueix un volum corresponent a 150 mL. Amb l'objectiu de determinar la quantitat de fàrmac alliberat per a la formulació en funció del temps, s'ha extret un volum de 0,5 mL de solució receptora a diferents temps per a ser analitzada, i la mateixa quantitat de solució receptora fresca ha estat introduïda al vas en cada una de les extraccions.

Els estudis d'alliberament han tingut una durada de 24 hores, a 37°C i velocitat d'agitació de les pales de 25 rpm. La primera mostra de solució receptora s'ha extret al minut 5 d'haver començat l'estudi. Les següents en intervals de 15 minuts fins a la primera hora. La segona hora en intervals de 30 minuts. Les següents mostres s'han extret en intervals d'una hora fins a assolir les primeres 8 hores d'estudi. Les últimes mostres s'han obtingut passades 22 hores de l'inici de l'estudi i a intervals d'una hora fins a la finalització d'aquest després de 24 hores.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

1. SELECCIÓ DELS PRINCIPIS ACTIUS I MÈTODES ANALÍTICS PER A LA SEVA QUANTIFICACIÓ

S'han seleccionat tres principis actius com a model per les seves propietats fisicoquímiques:

- Ketoprofèn (KP), un antiinflamatori no esteroïdal amb efecte analgèsic i lleugerament antipirètic (Kantor, 1986). És lipòfil, presenta un log P de 3,12, un pKa de 4,45 (Sangster, 1993) i té un pes molecular de 254 g/mol. La seva solubilitat en aigua és de 51 mg/L a 22°C (Yalkowsky & Dannenfelser, 1992).
- Clorhidrat de clindamicina (CLIN), un antibiòtic del grup de les lincosamines. És hidròfil, presenta un log P d' 1,01, un pKa de 7,55 i també de 12,41 (Chemaxon, 2020) i té un pes molecular de 461,44 g/mol. La seva solubilitat en aigua és de 3,1 mg/mL (Drugbank, 2020), és soluble en metanol i lleugerament soluble en etanol (Swetman, 2011), (AEMPS, 2011).
- Sulfat de salbutamol (SB), un broncodilatador. És hidròfil, presenta un log P de 0,34, un pKa de 9,4 i també de 10,12 (Chemaxon, 2020) i té un pes molecular de 576,7 g/mol. La seva solubilitat en aigua és 2,15 mg/mL (Drugbank, 2020), és pràcticament insoluble o molt poc soluble en etanol al 96 per cent i en clorur de metilè. Presenta polimorfisme i cal protegir-lo de la llum (AEMPS, 2011).

Les propietats dels tres principis actius estan descrites a l'apartat 1.1. de la secció de Materials.

1.1. Solubilitat dels principis actius

S'ha determinat experimentalment la solubilitat dels tres fàrmacs en solució reguladora de fosfats (PBS) a pH 7,4, que és la solució que s'utilitzarà en els assaigs d'alliberament. Es van fer addicions de principi actiu a cada solució, a 25°C i es va mantenir agitació constant amb vòrtex i ultrasons. L'aparició de cristalls, l'observació d'un precipitat o la terbolesa de la mostra es van considerar indicatius de manca de solubilitat. Es van

quantificar la concentració dels principis actius per HPLC. S'han obtingut els següents resultats:

- Solubilitat de KP: 0,41% (4,1mg/mL).
- Solubilitat de CLIN: aproximadament 70%. A aquesta concentració forma un gel viscos i transparent.
- Solubilitat de SB: aproximadament 22,5%

Els valors obtinguts són superiors als de la solubilitat en aigua. Tant CLIN com SB són solubles en aigua i en PBS. El resultat del KP és especialment important, ja no és soluble en aigua i l'increment de solubilitat en PBS respecte a l'aigua garanteix l'acompliment de les condicions *sink* en PBS als assaigs d'alliberament i no fa necessari estudiar un altre solvent per garantir aquestes condicions.

També es va estudiar la solubilitat del KP a diferents pHs i, tal com es mostra a la Taula 1, la solubilitat augmenta a pH bàsic. A mesura que augmenta la concentració de KP en la solució, es produeix un descens del pH degut al caràcter àcid del principi actiu.

Taula 1. Solubilitat de KP en funció del pH.

pH solvent	Solubilitat màxima %KP (p/v)	pH solució
5,0	0,041	5,0
6,0	0,023	5,5
7,0	0,803	6,0
8,3	1,152	6,0

Es va determinar la solubilitat del KP en aigua, etanol i mescles hidroalcohòliques, obtenint-se els resultats que es mostren a la **Taula 2**.

Taula 2. Solubilitat del KP en etanol, aigua i mescles hidroalcohòliques a 25°C.

	Solvent				
	EtOH	EtOH/H ₂ O (3:1, p/p)	EtOH/H ₂ O (1:1, p/p)	EtOH/H ₂ O (1:3, p/p)	H ₂ O
Solubilitat KP (%)	48,80	46,50	17,52	0,43	< 0,01

La mescla hidroalcohòlica EtOH/H₂O (1:1, p/p) és la que es va seleccionar per a la impregnació dels monòlits perquè augmentava considerablement la solubilitat del KP i era més fàcil la seva manipulació pel que fa a l'evaporació d'altres mescles més concentrades en etanol.

1.2. Estabilitat de ketoprofèn

Segons la bibliografia (Liversidge, 1981), KP és estable a temperatura ambient però cal protegir-lo de la llum i la humitat. Per això es va determinar l'estabilitat del KP en solució de PBS pH 7,4 en presència i absència de llum i a temperatura ambient.

Es va preparar una solució de 50 µg/mL de KP i es va distribuir en tres vials transparents i en tres vials topazi. Es va determinar mitjançant espectrofotometria UV-VIS la concentració de KP a cada recipient en funció del temps, comparant amb una solució patró de KP. A la **Figura 54** es mostren els resultats obtinguts.

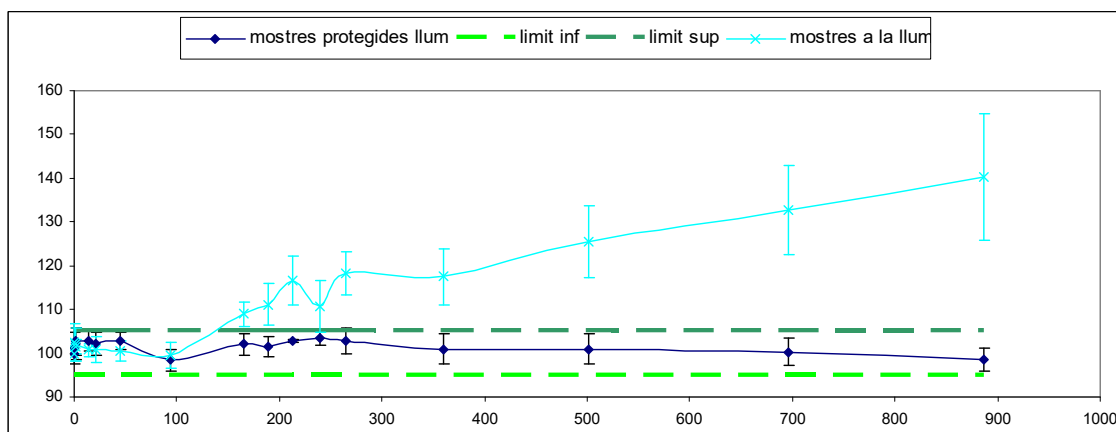


Figura 54. Percentatge de KP en solucions de 50 mg KP/mL determinat en funció del temps, a temperatura ambient i en presència o absència de llum.

S'observa que les solucions protegides de la llum es mantenen dins dels límits (95-105%) en quant a la concentració de KP; en canvi, les exposades a la llum es degraden amb el temps i estan fora d'especificacions. Per això, totes les mostres que contenen KP en

aquest treball de recerca s'han mantingut protegides de la llum. Aquests resultats estan d'acord amb les indicacions de la bibliografia en relació a la preservació de la llum.

1.3. Validació del mètode analític per a la quantificació de ketoprofèn

Es va posar a punt i validar un mètode per a la quantificació del KP amb l'espectrofotòmetre Thermo Fisher Helios β i també amb l'HPLC. A la secció 3.4.1. de Mètodes es descriuen les condicions de l'assaig. A continuació es descriu la validació del mètode analític per a l'espectrofotòmetre.

Determinació de la linealitat del mètode analític

Es van preparar cinc rectes de calibratge, cadascuna amb 11 solucions de KP a diferent concentració. Les dades d'absorbància (ABS) i concentració (Conc) es relacionen per calcular el factor de resposta (FR) que indica la relació que hi ha entre l'absorbància d'una solució i la seva concentració (ABS/Conc) i intenta estandaritzar els resultats de les diferents mostres per poder-les comparar. A les **Taules 3 i 4** es mostren els valors individuals de concentració i absorbància en les cinc rectes preparades.

Taula 3. Dades d'absorbància i concentració de KP corresponents a les cinc rectes preparades per avaluar la linealitat del mètode analític per espectrofotòmetre.

RECTA 1		RECTA 2		RECTA 3		RECTA 4		RECTA 5	
Conc $\mu\text{g/ml}$	ABS	Conc $\mu\text{g/ml}$	ABS	Conc $\mu\text{g/ml}$	ABS	Conc $\mu\text{g/ml}$	ABS	Conc $\mu\text{g/ml}$	ABS
0,50	0,007	0,51	0,005	0,50	0,026	0,51	0,010	0,50	0,010
2,48	0,044	2,54	0,025	2,50	0,044	2,54	0,033	2,52	0,035
4,97	0,058	5,08	0,059	5,00	0,067	5,07	0,066	5,04	0,063
9,94	0,113	10,17	0,116	9,99	0,136	10,14	0,121	10,09	0,129
19,87	0,236	20,34	0,233	19,98	0,263	20,29	0,244	20,18	0,249
39,74	0,472	40,67	0,461	39,97	0,497	40,58	0,465	40,35	0,489
59,62	0,707	61,01	0,700	59,95	0,739	60,86	0,730	60,53	0,716
79,49	0,952	81,34	0,955	79,94	1,005	81,15	0,983	80,70	0,958
99,36	1,194	101,68	1,205	99,92	1,249	101,44	1,214	100,88	1,204
119,23	1,426	122,02	1,431	119,90	1,489	121,73	1,441	121,06	1,443
139,10	1,672	142,35	1,674	139,89	1,731	142,02	1,678	141,23	1,701

Taula 4. Anàlisi del Factor de resposta (FR) en la determinació de la linealitat del mètode analític per a la quantificació de KP.

Conc teòrica µg/ml	FR M.1	FR M.2	FR M.3	FR M.4	FR. M.5	MITJANA FR	SD FR	CV FR
0,5	0,014	0,010	0,052	0,020	0,020	0,023	0,017	72,334
2,5	0,018	0,010	0,018	0,013	0,014	0,014	0,003	23,106
5	0,012	0,012	0,013	0,013	0,012	0,012	0,001	6,426
10	0,011	0,011	0,014	0,012	0,013	0,012	0,001	7,889
20	0,012	0,011	0,013	0,012	0,012	0,012	0,001	5,236
40	0,012	0,011	0,012	0,011	0,012	0,012	0,000	3,852
60	0,012	0,011	0,012	0,012	0,012	0,012	0,000	2,587
80	0,012	0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,000	2,657
100	0,012	0,012	0,013	0,012	0,012	0,012	0,000	2,128
120	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,000	2,208
140	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,000	2,016

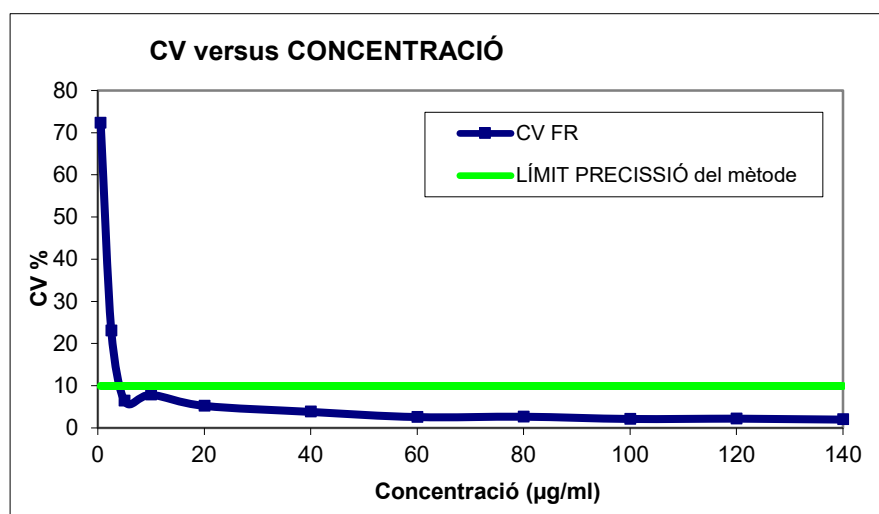


Figura 55. Límit de precisió del mètode analític per a la quantificació de KP.

Els resultats obtinguts han sigut els següents:

- **Límit de detecció = 2,5 µg/ml**
- **Límit de quantificació = 5 µg/ml**

Per calcular la linealitat s'ha de recórrer a la recta de regressió a partir del límit de quantificació. La recta de regressió s'indica la **Figura 56**.

ESPECIFICACIONS: CV Factor Resposta \leq 5%

$R \geq 0,999$

$R^2 \geq 0,999$

mitjana FR	0,0121
SD FR	0,0005
CV FR	4,2660

Coeficient de correlació	0,9996
Coeficient de determinació R ²	0,9991
R ² ajustat	0,9991

Recta: $y = 0,0121x + 0,0006$

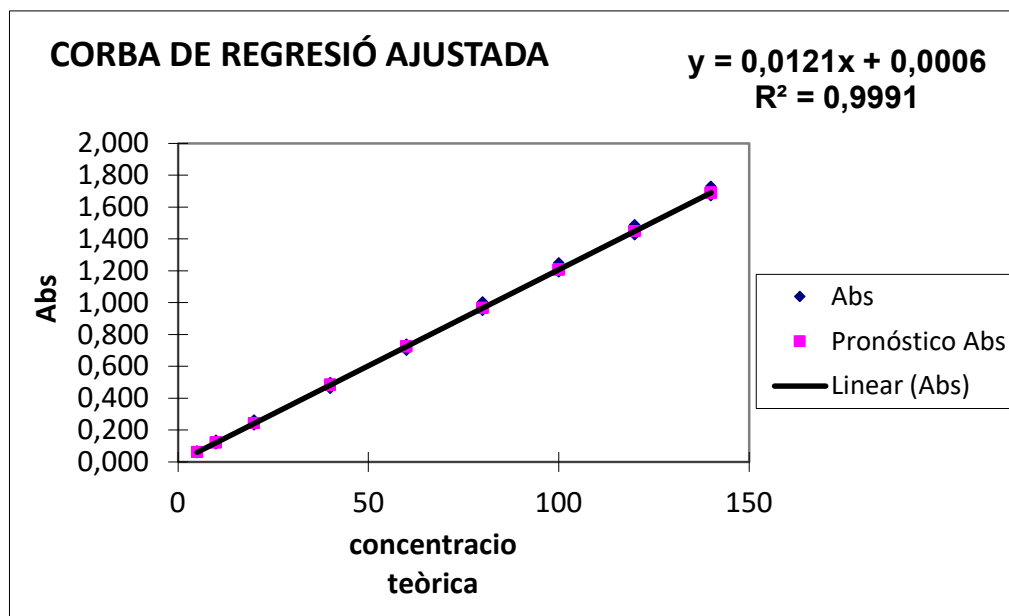


Figura 56. Recta de regressió per a la quantificació de KP

Amb els resultats obtinguts a l'assaig de linealitat del mètode analític per a la determinació de KP es pot concloure que com el coeficient de variació del factor resposta és inferior a 5% i tant el coeficient de correlació com R² són $\geq 0,999$ es pot assegurar que el mètode és lineal.

Determinació de la precisió del mètode analític

Per determinar la precisió del mètode analític, s'han fet 10 mesures d'una solució de KP de la mateixa concentració. Els resultats de les lectures d'absorbància es mostren a la **Taula 5**. Per assegurar la precisió del mètode, el coeficient de variació haurà de ser inferior a l'1%

Taula 5. Resultats de la determinació de la precisió del mètode analític de quantificació de KP.

LECTURA	ABS
1	1,177
2	1,185
3	1,182
4	1,180
5	1,177
6	1,173
7	1,182
8	1,181
9	1,170
10	1,176

Mitjana	1,178
Desviació estàndard	0,0046
Coefficient de variació (%)	0.3880
ESPECIFICACIONS: CV ≤ 1%	

Donat que el coeficient de variació és inferior a l'1%, hi ha repetibilitat del mètode experimental i el mètode emprat és precís.

Determinació de l'exactitud del mètode analític

L'exactitud del mètode analític s'expressa en funció de l'error relatiu, mitjançant la fórmula:

$$E (\%) = \frac{X - X_r}{X_r} \cdot 100$$

On:

X_r : concentració teòrica de cada solució del fàrmac

X : concentració mitjana experimental

A la **Taula 6** es mostren els resultats obtinguts i l'error relatiu.

Taula 6. Error relatiu per les concentracions assajades en la validació del mètode analític de KP.

Conc teòrica µg/ml	CONC R 1	CONC R 2	CONC R 3	CONC R 4	CONC R 5	CONC MITJANA	SD	CV	ERROR
0,5	0,53	0,36	2,10	0,78	0,78	0,91	0,69	75,68	82,99
2,5	3,59	2,02	3,59	2,68	2,84	2,94	0,66	22,59	18,44
5	4,74	4,83	5,49	5,40	5,16	5,12	0,33	6,51	3,14
10	9,29	9,54	11,19	9,95	10,61	10,12	0,78	7,73	1,81
20	19,45	19,21	21,69	20,12	20,53	20,20	0,98	4,87	1,64
40	38,96	38,05	41,02	38,38	40,36	39,36	1,29	3,27	-0,98
60	58,38	57,80	61,02	60,28	59,12	59,32	1,33	2,24	-0,49
80	78,63	78,88	83,01	81,19	79,12	80,17	1,89	2,35	0,85
100	98,63	99,54	103,17	100,28	99,45	100,21	1,75	1,75	0,86
120	117,80	118,21	123,01	119,04	119,21	119,45	2,07	1,73	0,19
140	138,13	138,30	143,01	138,63	140,53	139,72	2,07	1,48	0,44

L'error relatiu està comprès entre -0,98 i 3,14 amb un CV entre 7,73 i 1,48 %. A partir del límit de quantificació, tots els valors corresponents a l'error relatiu són $\leq \pm 5\%$, per tant es pot afirmar que el mètode és exacte.

2. SELECCIÓ, PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ D'EMULSIONS ALTAMENT CONCENTRADES

La preparació dels materials polimèrics porosos s'ha dut a terme utilitzant emulsions altament concentrades (HIPRE) com a plantilla, que són emulsions amb un contingut de fase interna superior al 74%. Per això es va fer una recerca de formulacions d'HIPREs de la bibliografia i d'estudis previs realitzats al nostre grup de recerca. Era necessari que les emulsions seleccionades tinguessin l'estabilitat cinètica suficient per poder realitzar les reaccions de polimerització o d'entrecreuament dels polímers. També era necessari que l'extracció de tensioactius i components oliosos en el procés de purificació dels materials polimèrics porosos es pogués dur a terme amb dissolvents acceptats per a usos farmacèutics, fàcilment eliminables i poc tòxics, com l'etanol. Es van seleccionar HIPREs W/O per preparar materials porosos amb polímer soluble a la fase oliosa i HIPREs O/W per preparar materials porosos amb polímer soluble a la fase aquosa. La composició de les emulsions seleccionades s'indica a la **Taula 7**.

La **HIPRE1**, de fase externa oliosa, conté un 90% d'aigua i està preparada amb tensioactius de grau pur, C16(EO)6 i C12(EO)8, juntament amb una petita quantitat d'un tensioactiu de grau tècnic, Synperonic L-64. Els tensioactius i el component oliós es troben en una relació en pes de 20:80. El component oliós és tetradecà, que malgrat no ser d'ús farmacèutic, es va utilitzar com a model d'hidrocarbur per dissoldre els monòmers posteriorment i procedir a la reacció de polimerització. Finalitzat el procés de polimerització es realitza la purificació dels materials i no quedaran restes. Aquesta emulsió, amb la major part de components purs, es va utilitzar per comparar mètodes de preparació, concretament es va comparar el mètode PIT amb el mètode convencional d'addicions successives.

Taula 7. Composició de les HIPREs seleccionades per a la preparació dels materials porosos.

Composició % p/p	HIPRE1 W/O	HIPRE2 W/O	HIPRE3 O/W	HIPRE4 O/W	HIPRE5 O/W
Aigua	90	80	18	18	17,5
C16(EO)6	1,2	-	-	-	-
C12(EO)8	0,7	-	-	-	-
Synperonic L-64	0,1	-	-	-	-
Pluronic 123	-	1,5	-	-	-
Tergitol L-64	-	0,5	-	-	-
Pluronic F127	-	-	2	-	-
Cremophor RH40	-	-	-	2	7,5
Tetradecà	8	18	-	-	-
Decà	-	-	80	-	-
Miglyol 812	-	-	-	80	75

La **HIPRE2**, també de fase externa oliosa, conté un 80% d'aigua i és similar a la HIPRE1 però els tensioactius que la componen són de grau tècnic. Els tensioactius i el component oliós es troben en una relació en pes de 10:90. El contingut de component oliós (18%) és més elevat que a la HIPRE1 (8%). Totes dues s'han utilitzat per a la polimerització de l'estirè amb divinilbenzè per obtenir materials de PS-DVB.

La **HIPRE3**, de fase externa aquosa, conté un 80% de decà i el tensioactiu utilitzat, Pluronic F127, s'utilitza en formulacions farmacèutiques i cosmètiques. El tensioactiu i l'aigua es troben en una relació en pes de 10:90. A la fase externa aquosa es dissoldran l'acrilamida i la bisacrilamida i es realitzarà la reacció de polimerització per obtenir poliàcrilamida (PAM).

Les **HIPREs 4 i 5**, de fase externa aquosa, són molt similars. Contenen un 80 i un 75% respectivament de Miglyol 812, que és una mescla de triglicèrids de cadena mitjana. El tensioactiu utilitzat és el Cremophor RH40, en un 2 i 7,5% respectivament, que s'utilitza àmpliament en productes farmacèutics sobretot per via tòpica. El tensioactiu i l'aigua es

troben en una relació en pes a la HIPRE4 de 10:90 i de 30:70 a la HIPRE5. La concentració d'aigua és molt similar, 18 i 17,5% respectivament. A la HIPRE4 s'ha incorporat quitosan i a la HIPRE5 àcid hialurònic. La fórmula quantitativa de la HIPRE4 és igual a la HIPRE3 però canviant Pluronic F127 per Cremophor RH40 i substituint el decà per un oli més adequat per aplicacions farmacèutiques com és Miglyol 812.

Es van preparar les emulsions seguint la metodologia indicada a l'apartat 3.1.1 de Mètodes. La HIPRE1 es va preparar pel mètode PIT i pel mètode d'adicions successives a 25°C. Les altres emulsions es van preparar pel mètode d'adicions successives a 25°C. Les emulsions es van caracteritzar per microscòpia òptica i es va observar qualitativament si presentaven separació de fases o fluïdesa. Les emulsions presentaven l'aspecte característic de gotes polièdriques i polidispersitat de mida. La HIPRE1, preparada pel mètode PIT va mostrar unes gotes més uniformes i menys polidispersitat. Totes les HIPREs preparades van mostrar estabilitat cinètica superior a dos dies, que és un temps suficient per a la realització de la reacció de polimerització.

3. PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE MATERIALS POROSOS

Les HIPREs descrites a l'apartat anterior es van utilitzar com a plantilla per a la preparació de materials porosos i per tant, se'ls van incorporar monòmers i iniciador de la reacció de polimerització o bé polímers preformats i agents reticulants. Les formulacions d'HIPRE amb els components necessaris per a l'obtenció de materials porosos es descriuen a continuació.

3.1. Preparació i caracterització de materials de Polièstirè-Divinilbenzè (PS-DVB)

Preparació de materials porosos de PS-DVB

Es van preparar materials de PS-DVB utilitzant la HIPRE1 i la HIPRE2, totes dues de fase externa oliosa, ja que tant l'estirè com el divinilbenzè són solubles en tetradecà. Les emulsions que contenen els monòmers (estirè i divinilbenzè) i l'iniciador de la reacció de polimerització (persulfat potàssic) s'han denominat PoliHIPRE1 i POLIHIPRE2, respectivament. A la **taula 8** s'indiquen les composicions.

Taula 8. Composicions de les emulsions altament concentrades W/O per a l'obtenció d'escumes sòlides de PS-DVB.

HIPRE1 (W/O)	% p/p		PoliHIPRE1 (W/O)	% p/p
Aigua	90	→	Aigua	89.9
C16(EO)6	1.2		Persulfat potàssic	0.1
C12(EO)8	0.7		C16(EO)6	1.2
Synperonic L-64	0.1		C12(EO)8	0.7
Tetradecà	8		Synperonic L-64	0.1
			Estirè	4.0
			Divilibenzè	1.0
			Tetradecà	3.0

HIPRE 2 (W/O)	% p/p		PoliHIPRE 2 (W/O)	% p/p
Aigua	80	→	Aigua	79.9
Pluronic 123	1.5		Persulfat potàssic	0.1
Tergitol L-64	0.5		Pluronic 123	1.5
Tetradecà	18		Tergitol L-64	0.5
			Estirè	9.3
			Divinilbenzè	2.0
			Tetradecà	6.7

La PoliHIPRE1 es va preparar per dos mètodes: pel mètode PIT i pel mètode de les addicions successives (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009).

- El mètode PIT va consistir mesclar tots els components, refredar-los a 0°C i augmentar la temperatura ràpidament des de 0°C fins a 60°C en un bany termostatat, agitant constantment amb un vòrtex i passant per la temperatura d'inversió de fases. D'aquesta manera a temperatura baixa es formava una emulsió O/W i a 60°C una emulsió W/O. L'emulsió es va mantenir a 60°C durant 48 hores per deixar que tingui lloc la reacció de polimerització.
- El mètode de les adicions successives va consistir en afegir lentament la fase aquosa (aigua i persulfat potàssic) a la mescla de tots els altres components, a temperatura ambient i en constant agitació amb vòrtex. La incorporació de la fase aquosa sobre l'oliosa es va dur a terme durant 90 minuts. L'emulsió preparada es va mantenir a 60°C durant 48 hores perquè tingués lloc la reacció de polimerització.

La poliHIPRE2 es va preparar únicament pel mètode de les adicions successives.

Es van preparar 10g d'emulsió cada vegada, a l'interior de recipients de vidre o plàstic. Els recipients es van trencar amb molta cura per extreure el material polimèric, el qual tenia forma de monòlit cilíndric, amb les dimensions del recipient que l'havia contingut. Els monòlits de PS-DVB són molt fràgils en aquesta etapa. Es van assecar a temperatura ambient i es van tallar amb un bisturí d'acer inoxidable en forma de discs, de 25 mm de diàmetre de gruix variable: des de 1-2mm fins 20 mm (**Figura 57**). Es van rentar amb aigua i posteriorment amb etanol, a 60°C, amb un volum de solvent aproximadament 10 vegades superior al volum de la mostra. Es van dipositar en un extractor Soxhlet en reflux i en continu per tal d'assegurar l'eliminació dels productes residuals i impureses, de forma que només quedi el material polimèric porós de PS-DVB. Es va refredar en un bany que contenia una mescla de gel i acetona durant 10 minuts. Finalment les mostres es van liofilitzar per eliminar l'aigua residual.

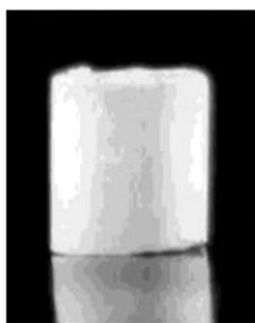


Figura 57. Aspecte d'un monòlit de PS-DVB (esquerra) i després de ser tallat en forma de discs (dreta).

Després de la purificació dels monòlits amb Soxhlet i l'assecat es van pesar i es va comparar el pes del monòlit obtingut amb el dels monòmers utilitzats per fer la reacció de polimerització. A la **taula 9** es mostren els pesos obtinguts amb dos monòlits de PS-DVB preparats pel mètode PIT.

Taula 9. Pes de monòmers i de monòlits de PS-DVB després de la purificació i assecat.

MONÒLITS	Pes (estirè + divinilbenzè) (g)	Pes final del monòlit (g)
PS-DVB 1	0,1011	0,1021
PS-DVB 2	0,1399	0,1370

S'observa que la variació de pes respecte al pes dels monòmers utilitzats és insignificant.

Per a la purificació dels monòlits es van estudiar altres mètodes: a) rentat amb aigua i etanol, amb renovació del solvent, i assecat en estufa a 70°C fins pes constant i b) rentat amb aigua i etanol, amb renovació del solvent, i sonicació a 70°C durant 2 hores, però el mètode que va resultar ser més eficaç va ser el rentat amb aigua i etanol i la posterior extracció amb Soxhlet. Amb els mètodes a i b, el pes final del monòlit era superior al dels monòmers inicials. Per determinar el millor mètode de purificació es va realitzar

una detecció de traces de C, H, N y S per anàlisi elemental. Aquest mètode consisteix en estudiar l'oxidació completa de la mostra mitjançant la combustió amb oxigen pur a una temperatura de 1000°C. Els productes resultants: CO₂, H₂O i N₂ s'utilitzen per calcular la concentració de cada element (C, H, N y S) a la mostra. El monòlit purificat hauria de contenir únicament àtoms de C i H, procedents de l'estirè i el divinilbenzè. La detecció d'àtoms de N, S i O indicaria la presència d'altres molècules diferents al polímer, com el persulfat potàssic, els tensioactius o el component oliós. A la **Taula 10** es mostren els resultats de l'anàlisi elemental realitzat amb monòlits de PS-DVB preparats a partir de la PoliHIPRE1 pel mètode PIT i purificats amb Soxhlet. Els monòlits es van seccionar en parts per poder avaluar l'eficàcia de l'extracció a l'interior i a la superfície del monòlit. Es van fer els assaigs per duplicat.

Taula 10. Resultats de l'anàlisi elemental realitzat amb monòlits de PS-DVB purificats amb Soxhlet.

Anàlisi elemental	Zona del monòlit	Concentració (%)	Valor mitjà (%)
C + H	Interior	99,94	99,87
		99,80	
	Exterior	98,16	98,04
		97,91	
S	Interior	-	-
		-	
	Exterior	-	-
		-	
O (per diferència)	Interior	0,06	0,13
		0,20	
	Exterior	1,84	1,97
		2,09	
C	Interior	92,13	92,07
		92,00	
	Exterior	90,29	90,19
		90,08	
H	Interior	7,81	7,81
		7,80	
	Exterior	7,87	7,85
		7,83	

Els percentatges teòrics de C i H presents al monòlit es van calcular a partir dels pesos moleculars de l'estirè i el divinilbenzè. Aquests valors són 92,26% de C i 7,74% de H, molt similars als obtinguts a l'anàlisi de traces i demostren una eficient purificació del monòlit amb l'extracció amb Soxhlet. Amb els altres dos mètodes es trobaven concentracions elevades d'oxigen (7-10%) i traces de sofre.

Alguns discs de PS-DVB van ser tractats amb plasma de baixa temperatura, per tal de modular la hidrofília de la superfície i facilitar el mullat del material amb solucions de fàrmac, ja que els materials de PS-DVB són hidrofòbics. Està descrit que les espècies oxidatives generades pel plasma poden canviar la naturalesa hidrofòbica de superfícies orgàniques amb la introducció de grups hidròfils (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009).

Per tal d'estudiar la incorporació de fàrmac al material polimèric porós, alguns discs es van micronitzar mitjançant un molí de boles rotatori (Mixer Mill MM 200, Retsch), amb dues boles d'acer inoxidable de 7,15 g i una relació de bola/pols de 15, a una velocitat de 250 rpm durant 3 minuts.

Caracterització de materials porosos de PS-DVB

Els materials de PSV-DB es van caracteritzar per microscòpia. A la **Figura 58** es mostren les imatges d'una emulsió PoliHIPRE1 preparada pel mètode d'adicions successives (**Figura 58a**) i pel mètode PIT (**Figura 58b**) observades per microscòpia òptica i dels materials obtinguts, després dels processos d'assecat, purificació i liofilització, observats per SEM. La **Figura 58c** correspon a un material obtingut a partir d'una emulsió preparada pel mètode d'adicions successives i la **Figura 58d** a material preparat a partir de les emulsions obtingudes pel mètode PIT.

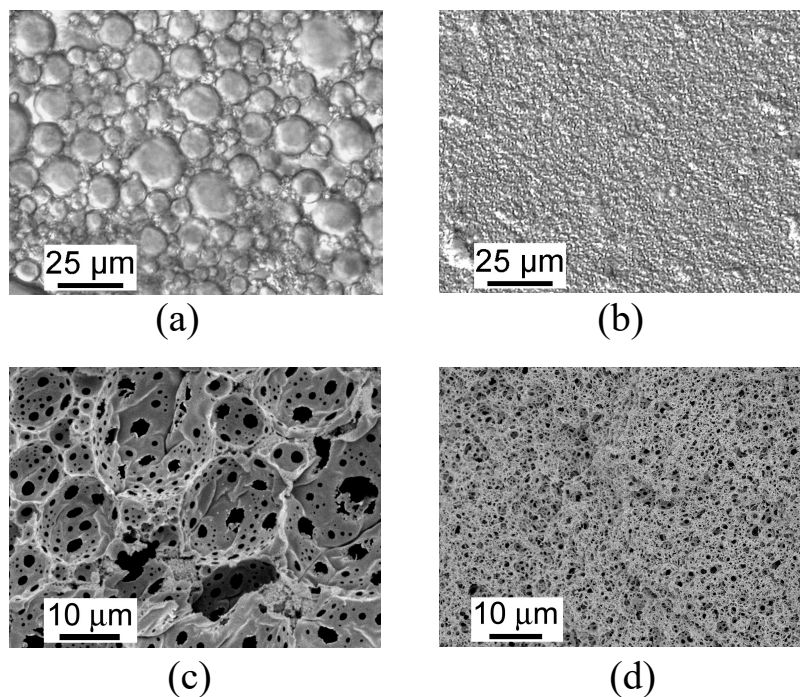


Figura 58. Micrografies de emulsió PoliHIPE1 i de materials de PS-DVB: (a) emulsió obtinguda pel mètode d'addicions successives; (b) emulsió obtinguda pel mètode PIT; (c) material porós obtingut a partir d'emulsions preparades pel mètode d'addicions successives i (d) material porós obtingut a partir d'emulsions preparades pel mètode PIT. Micrografies a i b obtingudes per microscòpia òptica; c i d obtingudes per SEM. (Esquena, Sankar, & Solans, 2003)

Tal com s'observa a la **Figura 58**, l'emulsió POLIHIPRE1 presenta l'aspecte característic d'una emulsió altament concentrada, amb gotes polièdriques i polidisperses, al voltant dels 5 µm de diàmetre, quan es preparen pel mètode convencional de les addicions successives (**Figura 58a**); en canvi, quan les emulsions es preparen pel mètode PIT, la mida de les gotes és considerablement inferior i la distribució de mides és més homogènia (**Figura 58b**). Això fa que no es pugui determinar la mida a partir d'aquesta imatge de microscòpia òptica. L'aspecte dels materials obtinguts a partir d'aquestes emulsions s'ha observat per SEM (**Figures 58c i 58d**) i s'ha pogut comprovar que els materials contenen majoritàriament macroporus (mides superiors a 50 nm) polidispersos, mantenint l'estructura de l'emulsió, que ha servit de plantilla per a la reacció de polimerització, que ha tingut lloc a la fase externa oliosa ja que els monòmers són més solubles en el component oliós de l'emulsió W/O. L'emulsió altament concentrada té un elevat volum de fase dispersa i per això les gotes estan empaquetades amb molt poca separació entre elles. En conseqüència, a la polimerització a la fase

externa, a les regions on la fase contínua és massa fina, es forma un orifici entre dos porus produint-se interconnectivitat. D'aquesta manera, els macroporus estan interconnectats per orificis de diàmetre més petit. Es pot observar com els porus del material obtingut fent servir com a plantilla l'emulsió preparada pel mètode PIT (**Fig 58d**) estan més interconnectats, són més petits i homogenis, igual com l'emulsió de partida (**Fig 58b**). Aquest fet posa en evidència el paper de l'emulsió com a plantilla per a l'obtenció dels materials i la possibilitat de controlar la mida dels porus a partir del control de la mida de gota de l'emulsió.

S'han observat diferències entre la superfície del material que ha estat en contacte amb el recipient durant la reacció de polimerització i la part més interna del monòlit. Aquestes diferències s'han posat de manifest per SEM (**Figura 59**). Quan els materials es preparen pel mètode convencional, els macroporus a la part interna del monòlit estan en el rang de 5-10 μm , sent els més grans de 30 μm aproximadament i els més petits de 600 nm aproximadament. En canvi, el material que s'ha format en contacte amb les parets del recipient (**Figura 59b**) té menys rugositat i és menys porós, probablement degut a la coalescència de les gotes d'emulsió per la manipulació de la mostra. Aquest fet ja s'ha observat també en estudis anteriors (Molina, Vílchez, Canal, & Esquena, 2009).

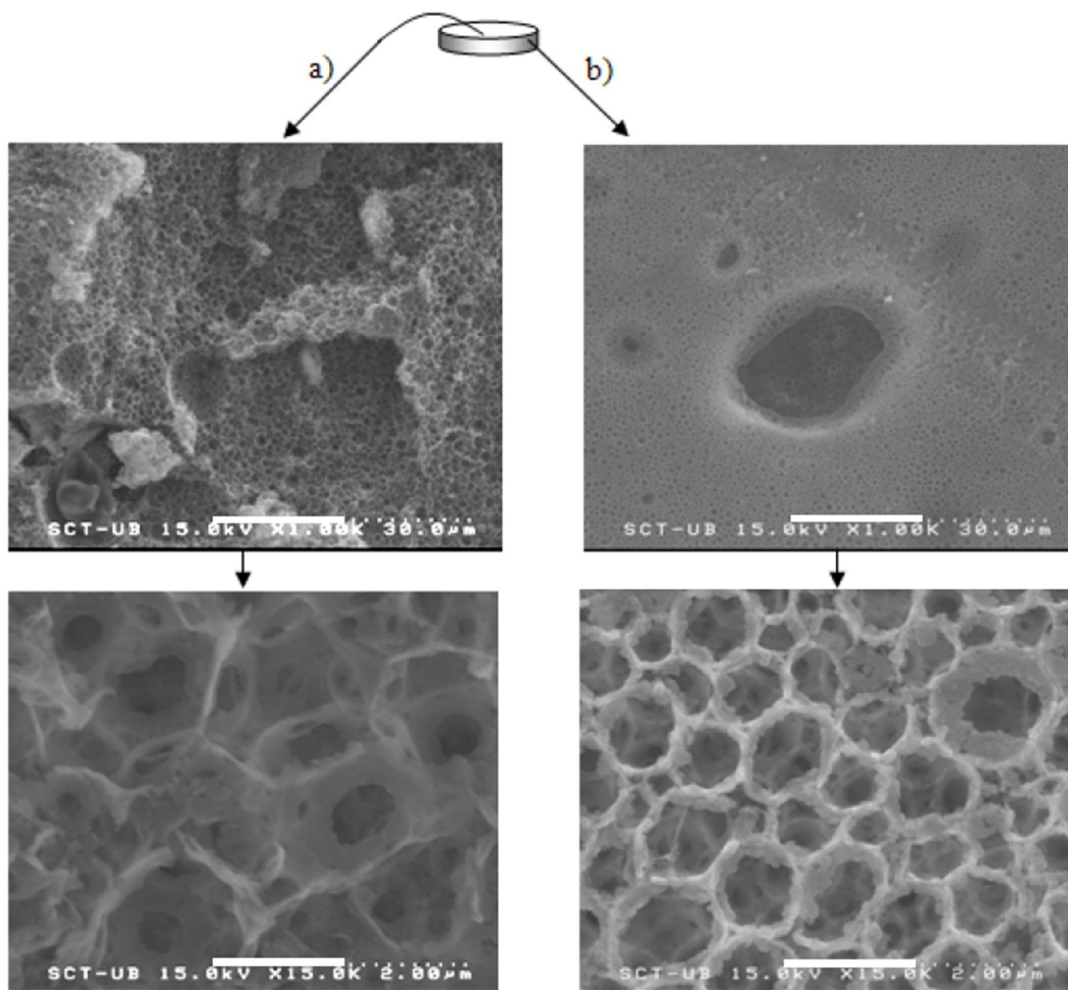


Figura 59. Micrografies de SEM de l'estructura dels monòlits de PS-DVB: a) zona interna del monòlit i b) zona en contacte amb les parets del recipient on s'ha produït la polimerització.

Es van comparar els resultats obtinguts en materials porosos en forma de disc i en forma de pols, obtinguda per micronització dels discs amb un molí de boles, tal com està descrit a l'apartat de 3.1.4. de Mètodes. La micronització dels discs va suposar una reducció considerable dels porus, tal com s'observa a la **Figura 60**.

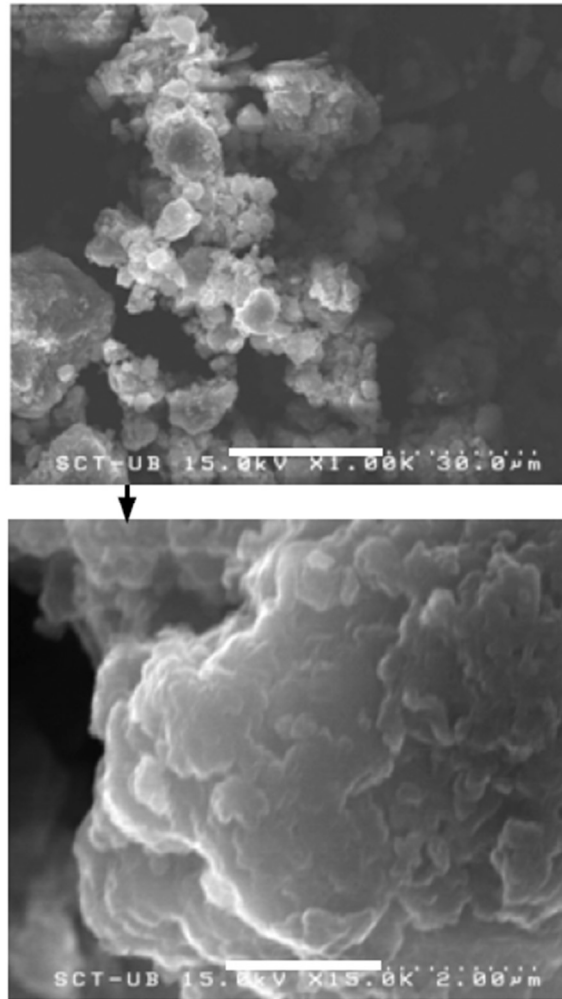


Figura 60. Caracterització per SEM del material de PS-DVB micronitzat.

Es va determinar l'angle de contacte dels materials de PS-DVB en forma de discs, pel mètode de Wilhelmy, tal com es descriu a l'apartat 3.2.3. de Mètodes. Es va obtenir un valor de $143\pm 13^\circ$, proper a 150° , valor que correspon a les superfícies superhidrofòbiques (Quéré, 2002). Considerant que l'angle de contacte mitjà de pel·lícules de poliestirè segons la bibliografia (Kang, Jung, Kim, & Jin, 2008) és de $92,98^\circ$, el valor més elevat obtingut amb els materials porosos de PS-DVB es pot explicar per la rugositat de la seva superfície. El tractament amb plasma atmosfèric a baixa temperatura dels discs de PS-DVB va suposar una disminució de l'angle de contacte a $103\pm 29^\circ$, per tant, un augment de la hidrofília, probablement per l'aparició de nous grups funcionals a la superfície del material i per la disminució de la rugositat, tal com

s'observa a la **Figura 61**. La disminució de la rugositat ja s'observa des de 10s de l'aplicació de plasma als materials. La variació en l'angle de contacte pot facilitar la humectació dels materials amb solucions aquoses.

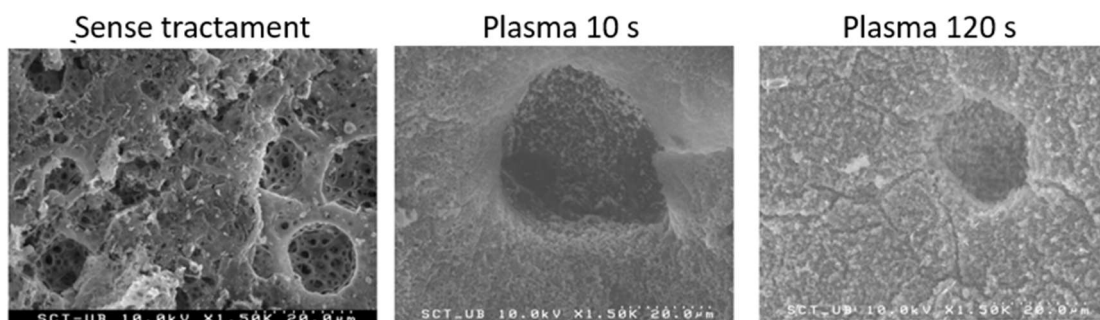


Figura 61. Topografia (SEM) de la superfície dels materials porosos de PS-DVB sense tractament i amb tractament amb plasma atmosfèric durant 10s i 120s.

Els materials de PS-DVB també es van caracteritzar per tècniques de porosimetria, i es va determinar la porositat dels materials i la superfície específica. Es va mesurar la mida dels porus (definitos com espais buits) i la mida de les connexions entre porus (definitos com a finestres que connecten els porus més grans) mitjançant el programa ImageJ aplicat a imatges de microscòpia. Es van mesurar aproximadament 200 porus i 200 connexions entre porus i es van calcular els valors mitjans dels diàmetres i les desviacions estàndard. La porositat (P), definida com a percentatge de volum de porus, es va calcular amb la densitat aparent (densitat *bulk*, ρ_b), i la densitat real (densitat *skeletal* dels materials no porosos, ρ_s), assumint que aquesta darrera és la mateixa que la dels polímers no porosos, tal com es troba a la bibliografia.

$$P = 100 (1 - \rho_b / \rho_s)$$

La densitat real del poliestirè, ρ_s , es va assumir que és $1,04 \text{ g/cm}^3$ (MERCK, 2020).

Es van preparar tres replicats de materials porosos de PS-DVB obtinguts a partir de l'emulsió PoliHIPRE2. Es va calcular la porositat (P) segons l'equació anterior. Els tres

replicats tenien una mida similar, un diàmetre de 2,5 cm i un gruix de 0,7 cm, amb un volum de 3,43 cm³. El pes dels tres replicats va ser 0,32, 0,28 i 0,27g. La densitat aparent mitjana dels tres replicats va ser 0,084 g/cm³, amb una desviació estàndard de 0,0076. Es tracta d'una densitat molt baixa, especialment si es compara amb la densitat del poliestirè que és 1,04 g/cm³. D'acord amb aquestes dades, la porositat del material obtingut seria 91,9%, el que vol dir que la major part del volum dels materials porosos de PS-DVB està ocupat pels porus. Aquesta elevada porositat s'ha observat en altres materials porosos obtinguts utilitzant emulsions altament concentrades com a plantilla (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009), (Alam, et al., 2013).

La possible presència de mesoporus (2-50 nm) es va avaluar mitjançant experiments de sorció de nitrogen. La **Figura 62** mostra les isoterms de nitrogen per materials porosos de PS-DVB, per a dos replicats obtinguts de lots diferents de preparació, anomenats PS1 i PS2. El petit cicle d'histeresi que s'observa entre les isoterms d'adsorció i desorció de nitrogen és degut a la mesoporositat de la mostra. La presència de mesoporus (2-50 nm) provoca una condensació capil·lar de l'adsorbat que produeix una diferència entre les pressions d'adsorció i de desorció. Mitjançant aquesta histèresi és possible caracteritzar la porositat que presenta la mostra. A més, els forts augments de gas adsorbit a pressions altes és una característica típica de la presència de macroporus (mida superior a 50 nm). La tècnica d'adsorció i desorció de nitrogen no permet tenir informació de mides de porus superiors a 300 nm, però la macroporositat s'observa fàcilment per microscòpia electrònica de rastreig (SEM), tal com s'ha mostrat a les **Figures 58 i 59**.

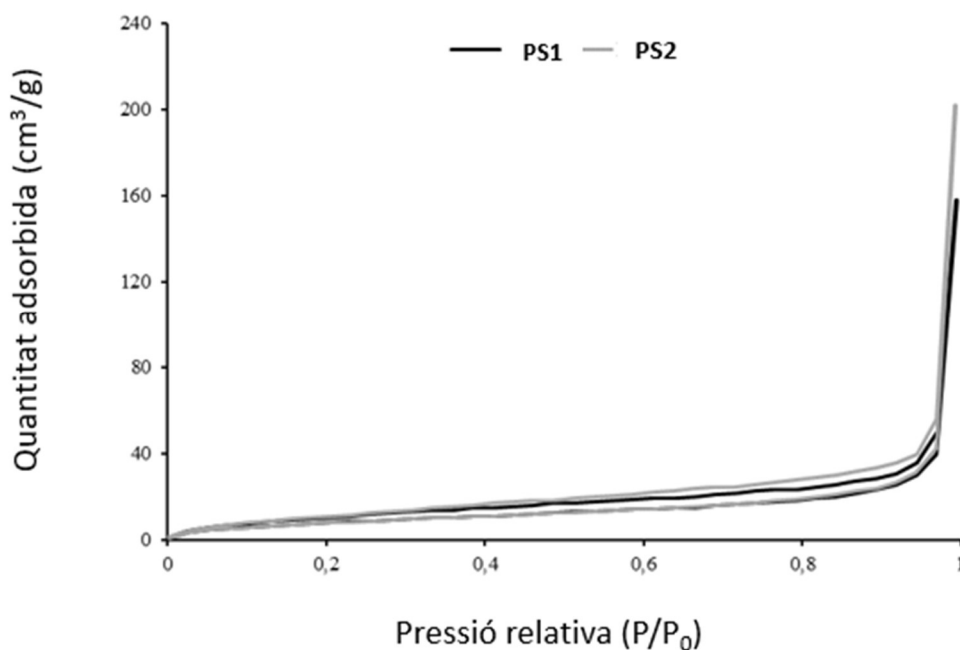


Figura 62. Isotermes d'adsorció i desorció de nitrogen (a 77K) per a materials porosos de PS-DVB, corresponents a dos lots diferents de fabricació PS1 i PS2.

El volum i l'àrea superficial es van determinar pel mètode del *single point* i des de la isoterma d'absorció aplicant l'equació BET, respectivament. El valor del volum total de porus es va obtenir de treballs prèviament realitzats per membres del grup amb aquests materials (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009). Es va observar un volum relativament baix de mesoporus, de l'ordre de 0,25 cm³/g, molt inferior al volum total de macroporus, aproximadament 20 cm³/g, amb diferències significatives segons el mètode de preparació. La superfície específica es va calcular ajustant l'equació BET a la corba d'adsorció. Es van obtenir valors de superfície específica entre 30 i 80 m²/g, depenent del mètode de preparació. Quan menor es la mida de gota de l'emulsió de partida, major és el valor de la superfície específica obtinguda. La micronització dels discs per obtenir pols va suposar una dràstica reducció de l'àrea superficial.

Els resultats de porosimetria mostren com és possible modificar les característiques dels materials porosos, mida de por i superfície específica, mitjançant canvis en la mida de gota de l'emulsió de partida.

3.2. Preparació i caracterització de materials de Poliacrilamida (PAM)

Es van preparar materials de PAM utilitzant la HIPRE3, de fase externa aquosa, ja que tant l'acrilamida com la bisacrilamida són solubles en aigua. L'emulsió que conté els monòmers (acrilamida i bisacrilamida) i l'iniciador de la reacció de polimerització (persulfat potàssic) s'ha denominat PoliHIPRE3. A la **taula 11** s'indiquen les composicions.

Taula 11. Composicions de les emulsions altament concentrades (O/W) per a l'obtenció d'escumes sòlides de PAM.

HIPRE 3 (O/W)	% p/p		PoliHIPRE 3 (O/W)	% p/p
Aigua	18	⇒	Aigua	5.98
Pluronic F127	2		Persulfat potàssic	0.02
Decà	80		Pluronic F127	2
			Acrilamida	10
			Bisacrilamida	2
			Decà	80

La PoliHIPRE3 es va preparar pel mètode de les adicions successives, que va consistir en afegir lentament la fase oliosa (decà) a la mescla de tots els altres components, a temperatura ambient i en constant agitació amb un homogeneïtzador Ultraturax. La incorporació de la fase oliosa sobre l'aquosa es va dur a terme durant 600 minuts. L'emulsió preparada es va mantenir a 60°C durant 48 hores perquè tingués lloc la reacció de polimerització.

Es van preparar 10g d'emulsió cada vegada, a l'interior de recipients de plàstic. Els recipients es van trencar amb molta cura per extreure el material polimèric, el qual tenia forma de monòlit cilíndric, amb les dimensions del recipient que l'havia contingut. Els monòlits de PAM són molt fràgils en aquesta etapa. Es van assecar a temperatura ambient i es van tallar amb un bisturí d'acer inoxidable en forma de discs, de 25 mm de diàmetre i 15-20 mm de gruix (**Figura 62**). Es van rentar amb aigua i posteriorment amb

etanol, a 60°C, amb un volum de solvent aproximadament 10 vegades superior al volum de la mostra. Es van dipositar en un extractor Soxhlet en reflux i en continu per tal d'assegurar l'eliminació dels productes residuals i impureses, de forma que només quedi el material polimèric porós de PS-DVB. Es va refredar en un bany que contenia una mescla de gel i acetona durant 10 minuts. Finalment les mostres es van liofilitzar per eliminar l'aigua residual.



Figura 62. Aspecte d'un monòlit de PAM. La mostra correspon al fragment de l'extrem de l'ependorf on s'ha preparat.

Com es pot observar, el monòlit obtingut conserva la forma del recipient que ha contingut l'emulsió. El material de PAM és més tou i fràgil que el de PS-DVB.

Caracterització de materials porosos de PAM

Els materials de PAM es van caracteritzar per microscòpia. A la Figura 63 es mostren les imatges de l'emulsió PoliHIPRE3 preparada pel mètode d'adicions successives i observada per microscòpia òptica i dels materials obtinguts, després dels processos d'assecat, purificació i liofilització, observats per SEM.

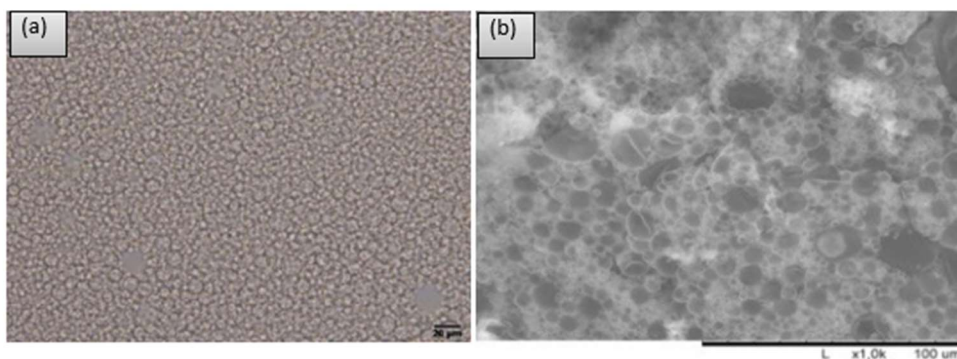


Figura 63. Micrografies de: (a) emulsió PoliHIIPRE3 preparada pel mètode d'addicions successives i (b) del material porós de PAM obtingut a partir de l'emulsió. Micrografia (a) obtinguda per microscòpia òptica i (b) obtinguda per SEM.

Tal com s'observa a la **Figura 63**, l'emulsió PoliHIIPRE3 presenta l'aspecte característic d'una emulsió altament concentrada, amb gotes polièdriques i polidisperses, al voltant dels 5,5 μm de diàmetre. Igual com es va observar amb els materials de PS-DVB, la mida dels porus dels materials és lleugerament superior a la mida de l'emulsió, el que es pot atribuir a fenòmens de coalescència durant el procés de polimerització. No obstant, l'emulsió PoliHIIPRE 3 mostra una mida més homogènia que l'emulsió PoliHIIPRE2 o PoliHIIPRE1 preparades pel mètode d'addicions successives, així com una menor polidispersitat. Aquest fet es podria atribuir al tipus d'agitació, que en la PoliHIIPRE3 va ser amb homogeneïtzador Ultraturrax, mentre que a les altres emulsions es va fer amb vòrtex. Una agitació més intensa i una major cisalla pot donar lloc a gotes més petites.

Els materials de PAM també es van caracteritzar per tècniques de porosimetria, i es va determinar la porositat i la superfície específica. Es va mesurar la mida dels porus (definites com espais buits) i la mida de les connexions entre porus (definites com a finestres que connecten els porus més grans) mitjançant el programa ImageJ aplicat a imatges de microscòpia. A títol comparatiu es va calcular la mida de materials de PS-DVB i de PAM, preparats a partir d'emulsions formades pel mètode d'addicions successives. A la **Taula 12** es mostren els resultats i a la **Figura 64** es mostren les micrografies dels materials que s'han comparat.

Taula 12. Diàmetre mitjà i desviació estàndard dels porus i les interconnexions de materials de PS-DVB i PAM a partir d'emulsions preparades pel mètode d'adicions successives.

	Porus		Connexions	
	Diàmetre (µm)	SD	Diàmetre (µm)	SD
PS-DVB	12,1	21,9	3,6	1,8
PAM	5,8	6,6	2,0	0,8

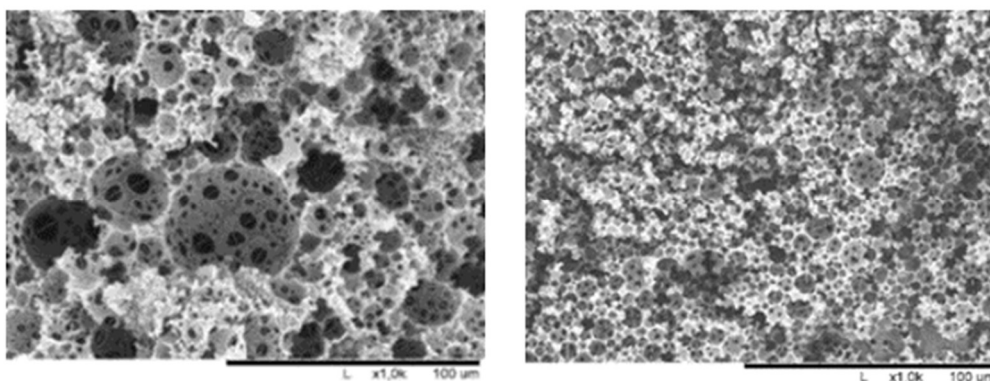


Figura 64. Micrografies dels materials porosos de PS-DVB (esquerra) i PAM (dreta).

Igual com es va fer amb els materials de PS-DVB, es va calcular la porositat dels materials de PAM. Es van preparar tres mostres de disc de monòlit de la mateixa mida: 2,5 cm de diàmetre i 1 cm de gruix, amb un volum de 4,9 cm³. El pes de les tres rèpliques era 0,34, 0,43 i 0,65g. La densitat aparent mitjana calculada, ρ_b , va resultar ser 0,096 g/cm³ amb una desviació estàndard de 0,0324. Suposant que la densitat real de la poliacrilamida, ρ_s , és 1,11 g/cm³ (MERCK, 2020) i aplicant l'equació de la porositat:

$$P = 100 (1 - \rho_b / \rho_s)$$

la porositat del material obtingut seria 91,4 %, el que vol dir que la major part del volum dels materials porosos de PAM està ocupat pels porus. Com s'ha indicat per al PS-DVB, aquesta elevada porositat s'ha observat també en altres materials porosos obtinguts utilitzant emulsions altament concentrades com a plantilla (Canal, Gaboriau, Vílchez, & Erra, 2009), (Alam, et al., 2013). Si es considera el volum que ocupa la fase interna (gotes) de l'emulsió O/W que ha fet de plantilla, que és el 80% i es compara amb el valor

de porositat dels materials obtinguts, s'observa que tant per als materials de PS-DVB com per als de PAM, la porositat és considerablement superior (91,9% per al PS-DVB i 91,4% per al PAM). Aquest fet suggereix que els porus no només estan produïts per les gotes de l'emulsió sinó que algun dels components de l'emulsió pot actuar com a porògen, tal com s'ha descrit anteriorment a la bibliografia (Alam, et al., 2013).

La possible presència de mesoporus (2-50 nm) es va avaluar mitjançant experiments de sorció de nitrogen. La **Figura 65** mostra les isoterms de nitrogen per materials porosos de PAM, per a dos replicats obtinguts de lots diferents de preparació, anomenats PAM1 i PAM2. El petit cicle d'histeresi que s'observa entre les isoterms d'adsorció i desorció de nitrogen és degut a la mesoporositat de la mostra. La presència de mesoporus (2-50 nm) provoca una condensació capil·lar de l'adsorbat que produeix una diferència entre les pressions d'adsorció i de desorció. Mitjançant aquesta histeresi és possible caracteritzar la porositat que presenta la mostra. A més, els forts augments de gas adsorbit a pressions altes és una característica típica de la presència de macroporus (mida superior a 50 nm). La tècnica d'adsorció i desorció de nitrogen no permet tenir informació de mides de porus superiors a 300 nm, però la macroporositat s'observa fàcilment per microscòpia electrònica de rastreig (SEM), tal com s'ha mostrat a les **Figures 63 i 64**.

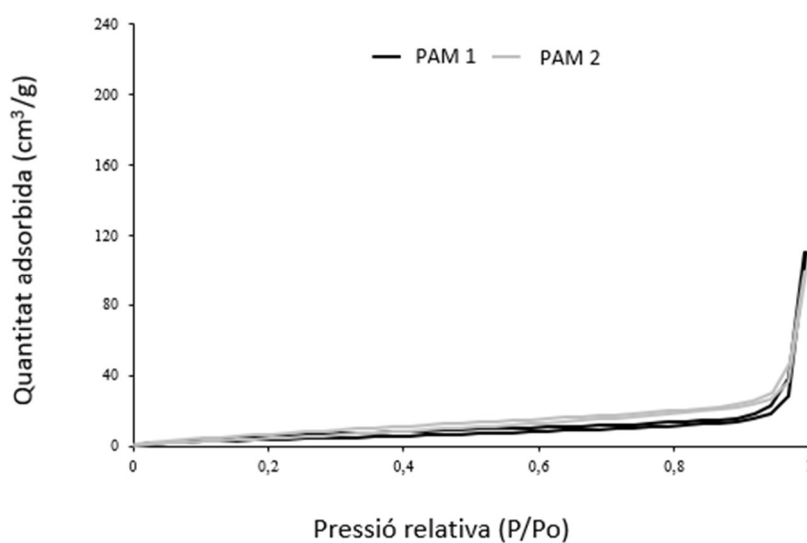


Figura 65. Isothermes d'adsorció i desorció de nitrogen (a 77K) per a materials porosos de PAM, corresponents a dos lots diferents de fabricació PAM1 i PAM2.

S'han observat molt poques diferències en les dues mostres de materials de PAM analitzades per adsorció i desorció de nitrògen, la qual cosa suggereix que l'estructura porosa de les mostres analitzades és molt similar.

L'àrea superficial de les escumes sòlides de PAM es va determinar ajustant l'equació BET a la isoterma d'absorció, el volum de porus (per porus més petits de 367,3 nm) es va calcular a partir del punt més alt de les corbes i el percentatge de porositat es va calcular amb l'equació de la porositat, tal com s'ha indicat anteriorment. Es va observar un volum molt baix de microporus, pràcticament indetectable. Es van obtenir valors de superfície específica de 23,54 m²/g i un volum total de porus de 0,1cm³/g, per tant, es pot considerar que els materials de PAM són majoritàriament macroporosos.

Igual com s'ha observat amb els materials de PS-DVB, també els resultats de porosimetria dels materials de PAM mostren com és possible modificar les característiques dels materials porosos, mida de por i superfície específica, mitjançant canvis en la mida de gota de l'emulsió de partida.

3.3. Preparació i caracterització de materials de Quitosan (QS)

Preparació de materials porosos de QS

Es van preparar materials de QS utilitzant la HIPRE4, de fase externa aquosa, ja que el QS és soluble en aigua. En quant a la composició, aquesta emulsió té les mateixes proporcions d'aigua, oli i tensioactiu que la HIPRE3, però el component oliós és més adequat per ús farmacèutic, ja que s'ha substituït un hidrocarbur com el decà pel Miglyol 812, que és una mescla de triglicèrids de cadena mitjana. En aquest cas no es va partir de monòmers com amb els materials de PS-DVB i PAM, sinó que es va incorporar a l'emulsió un polímer preformat, el quitosan, soluble a la fase externa de l'emulsió i es va procedir al seu entrecreuament amb un agent reticulat. L'emulsió que conté el polímer (QS) i el reticulant (genipina) s'ha denominat PoliHIPRE4. A la **taula 13** s'indiquen les composicions.

Taula 13. Composicions de les emulsions altament concentrades O/W per a l'obtenció d'escumes sòlides de QS.

HIPRE 4 (O/W)	% p/p		PoliHIPRE 4 (O/W)	% p/p
Aigua	18	⇒	Sol. aquosa de QS (2%) en àc acètic (1%)	9
Cremophor RH40	2		Sol. de genipina (0.5%) en PBS pH 7.4	9
Miglyol 812	80		Cremophor RH40	2
			Miglyol 812	80

Per preparar la PoliHIPRE4, en primer lloc es preparen les solucions aquoses de QS i de genipina. El QS (2%) es dissol en una solució d'àcid acètic a l'1% amb agitació contínua mitjançant un nucli magnètic. La solució de QS es prepara el dia abans de l'elaboració de l'emulsió, ja que presenta una viscositat elevada i requereix agitació durant un període llarg de temps. La genipina (0,5%) es dissol en una solució de PBS pH7,4. La solució presenta el color blau característic de la genipina. La PoliHIPRE4 es va preparar a 25°C pel mètode de les adicions successives (Miras, Vílchez, Solans, & Esquena, 2013). Va consistir en afegir lentament la fase oliosa (Miglyol 812) a la mescla de tensioactiu (Cremophor RH40) i solució aquosa de QS, amb agitació contínua. Un cop incorporada tota la fase oliosa, es procedeix a afegir lentament i amb agitació intensa la solució aquosa de genipina. La reacció d'entrecruament es realitza a 40°C. Inicialment l'emulsió presenta un aspecte blanc però després de 72 hores, quan ja ha finalitzat la reacció d'entrecruament del QS amb la genipina a la fase externa de l'emulsió, s'observa una coloració blava característica, tal com es mostra a la **Figura 66**. La tonalitat blava indica la reacció de la genipina amb els grups amino del quitosà.

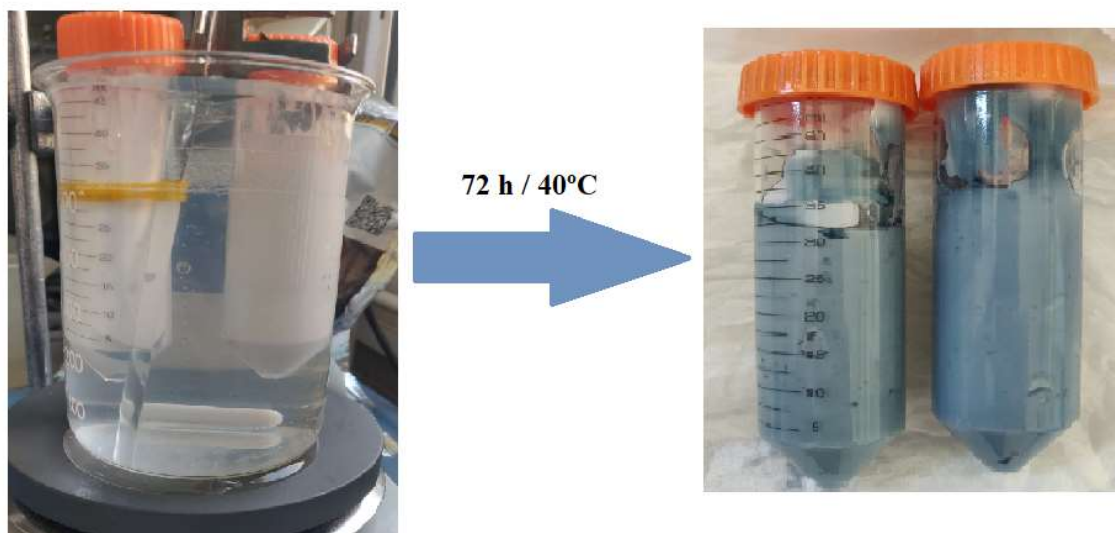


Figura 66. Canvi d'aspecte de la PoliHIPRE4 després de 72 hores de reticulació amb genipina.

Es van preparar 10 g d'emulsió cada vegada, a l'interior de recipients de plàstic. Els recipients es van trencar amb molta cura per extreure el material polimèric, el qual tenia forma de monòlit cilíndric, amb les dimensions del recipient que l'havia contingut. Es van dipositar en un extractor Soxhlet en reflux i en continu, 12 hores amb etanol i 12 hores amb aigua, per tal d'assegurar l'eliminació dels productes residuals i impureses, de forma que només quedi el material polimèric porós de QS. Es va refredar en un bany que contenia una mescla de gel i acetona durant 10 minuts. Finalment les mostres es van liofilitzar per eliminar l'aigua residual. L'aspecte del material, després de l'extracció del component oliós i el tensioactiu amb el Soxhlet i la liofilització, és la d'un monòlit col·lapsat, d'estructura laminada i de color blau fosc, tal com s'observa a la **Figura 67**. És un material molt fràgil que té una densitat molt baixa. Cal tenir en compte que per cada 10 g d'emulsió, només hi ha 0,018 g de QS (0,9 g de solució de QS al 2%) i 0,0045 g de genipina (0,9 g de solució de genipina al 0,5%).



Figura 67. Monòlits de QS obtinguts després de liofilitzar la mostra.

Els monòlits obtinguts es tallen amb un bisturí d'acer inoxidable per obtenir fragments més petits i procedir a la seva caracterització i incorporació de fàrmac.

Caracterització de materials porosos de QS

Els materials de QS es van caracteritzar per microscòpia. A la **Figura 68** es mostren les imatges de l'emulsió PoliHIPRE4 preparada pel mètode d'addicions successives i observada per microscòpia òptica i dels materials obtinguts, després dels processos d'extracció, purificació i liofilització, observats per SEM.

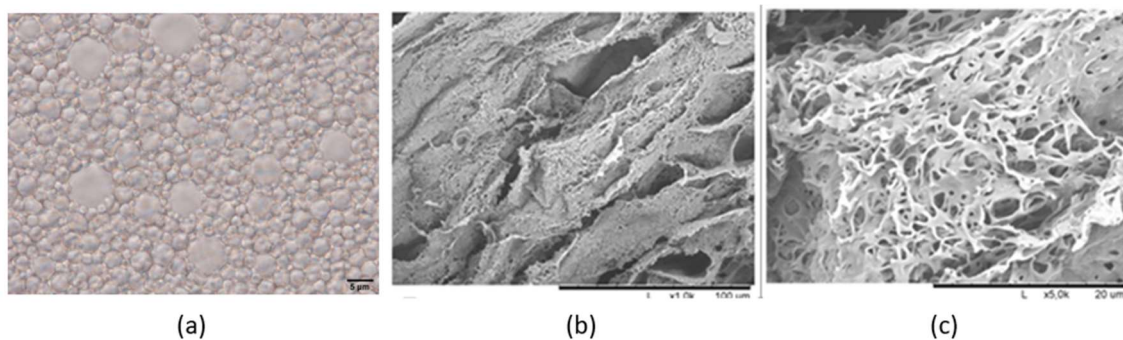


Figura 68. Micrografies de: (a) emulsió PoliHIPRE4 preparada pel mètode d'addicions successives, (b) i (c) del material porós de QS obtingut a partir de l'emulsió. Micrografia (a) obtinguda per microscòpia òptica; micrografies (b) i (c) obtingudes per SEM a x1,0k i x5,0k, respectivament.

Tal com s'observa a la **Figura 68**, l'emulsió PoliHIPRE4 presenta l'aspecte característic d'una emulsió altament concentrada, amb gotes polièdriques i polidisperses, al voltant dels 5 µm de diàmetre. Si es compara l'aspecte microscòpic de les emulsions PoliHIPRE1, PoliHIPRE2 i PoliHIPRE3 (**Figures 58 i 63**) es pot veure com la polidispersitat en la mida de les gotes varia molt segons el mètode de preparació utilitzat. En quant als materials porosos de QS, s'han requerit més augments per poder observar clarament els porus de l'escuma sòlida, en comparació amb els materials de PS-DVB i PAM (**Figures 59 i 64**). L'aspecte és laminar, es poden observar diverses capes, amb porus molt oberts i de parets fràgils, probablement degut a la baixa concentració de QS a l'emulsió. Igualment destaca una elevada porositat i una baixa densitat. Els resultats de l'assaig de porositat es descriuran a continuació, conjuntament amb els dels materials de HA.

3.4. Preparació i caracterització de materials d'Àcid Hialurònic (HA)

Preparació de materials porosos de HA

Es van preparar materials de HA utilitzant la HIPRE5, de fase externa aquosa, ja que el HA és soluble en aigua. Aquesta emulsió és igual que la HIPRE4 en quant als excipients utilitzats, però s'han variat les proporcions: la relació tensioactiu/component aquós ha passat de ser 10:90 p/p a 30:70 p/p i s'ha disminuït lleugerament el percentatge de fase interna oliosa, de 80% a 75%. El canvi en la composició quantitativa s'ha realitzat perquè es considera que la relació 30:70 està més llunyana del límit de la zona de formació d'emulsions altament concentrades, tal com es va definir en estudis realitzats prèviament (Roig, Hidrogels i materials porosos d'àcid hialurònic entrecreuat com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs (Tesi doctoral), 2016). En aquest cas no es va partir de monòmers com amb els materials de PS-DVB i PAM, sinó que, igual com amb els materials de QS, es va incorporar a l'emulsió un polímer preformat, l'àcid hialurònic, soluble a la fase externa de l'emulsió i es va procedir al seu entrecreuament amb un agent reticulant. L'emulsió que conté el polímer (HA) i el reticulant (butandiol diglicidil èter, BDDE) s'ha denominat PoliHIPRE5. A la **taula 14** s'indiquen les composicions.

Taula 14. Composicions de les emulsions altament concentrades O/W per a l'obtenció d'escumes sòlides de HA.

HIPRE 5 (O/W)	% p/p		PoliHIPRE 5 (O/W)	% p/p
Aigua	17.5	→	Sol. aquosa de HA (5%)	17.5
Cremophor RH40	7.5		Sol. de BDDE (26.6%) en NaOH 1.66M	q.s.
Miglyol 812	75		Cremophor RH40	7.5
			Miglyol 812	75

La solució de l'agent reticulant (BDDE) s'afegeix en molt poca quantitat (inferior a 1 mL), per això no s'ha indicat de forma quantitativa en la formulació PoliHIPRE5. S'addicionen 1000 µL de BDDE per cada gram d'HA, que correspon a una relació molar entre el BDDE i el monòmer de disacàrid d'HA de 1,7, que és la relació a la que l'HA està completament entrecreuat. Les proporcions de HA i BDDE es van establir en estudis previs (Roig-Roig, Solans, Esquena, & García-Celma, 2013). La solució de BDDE es prepara al 26,6% de BDDE en hidròxid sòdic 1,66 M.

Per preparar la PoliHIPRE5, en primer lloc es preparen les solucions aquoses d'HA i de BDDE. La PoliHIPRE5 es va preparar a 25°C pel mètode de les addicions successives (Roig, Blanzat, Solans, Esquena, & García-Celma, 2018), Va consistir en afegir lentament la fase oliosa (Miglyol 812) a la mescla de tensioactiu (Cremophor RH40) i solució aquosa d'HA, amb agitació contínua. Un cop incorporada tota la fase oliosa, es procedeix a afegir la solució de BDDE. La reacció d'entrecreament es realitza a 40°C durant 8 hores.

Es van preparar 10g d'emulsió cada vegada, a l'interior de recipients de plàstic. Els recipients es van trencar amb molta cura per extreure el material polimèric, el qual tenia forma de monòlit cilíndric, amb les dimensions del recipient que l'havia contingut. Es van dipositar en un extractor Soxhlet en reflux i en continu, 12 hores amb etanol i 12 hores amb aigua, per tal d'assegurar l'eliminació dels productes residuals i impureses, de forma que només quedi el material polimèric porós d'HA. Es va refredar en un bany que contenia una mescla de gel i acetona durant 10 minuts. Finalment les mostres es van liofilitzar per eliminar l'aigua residual. L'aspecte del material, després de l'extracció

del component oliós i el tensioactiu amb el Soxhlet i la liofilització, és la d'un monòlit blanc, lleugerament col·lapsat i d'estructura laminada, amb una consistència que recorda les fibres de cotó, tal com s'observa a la **Figura 69**. És un material fràgil que té una densitat molt baixa.



Figura 69. Aspecte macroscòpic de les escumes sòlides d'HA després de la liofilització.

Caracterització de materials porosos d'HA

Els materials d'HA es van caracteritzar per microscòpia. A la **Figura 70** es mostren les imatges de l'emulsió PoliHIPRE5 preparada pel mètode d'addicions successives i observada per microscòpia òptica i dels materials obtinguts, després dels processos d'extracció, purificació i liofilització, observats per SEM.

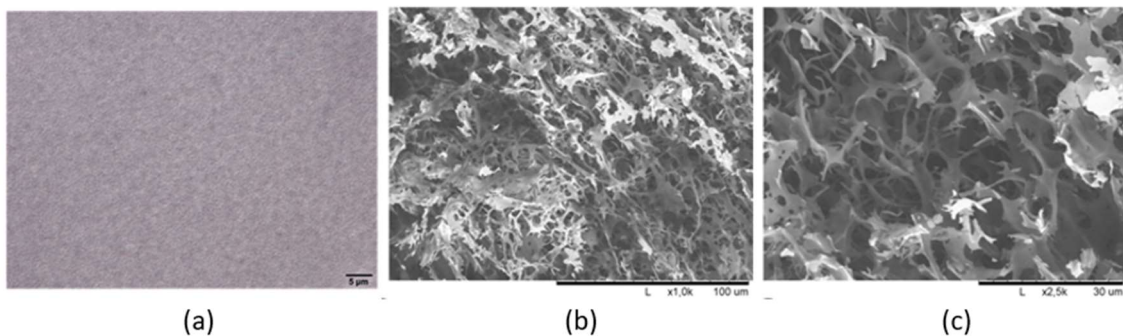


Figura 70. Micrografies de: (a) emulsió PoliHIPRE5 preparada pel mètode d'addicions successives, (b) i (c) del material porós d'HA obtingut a partir de l'emulsió. Micrografia (a)

obtinguda per microscòpia òptica; micrografies (b) i (c) obtingudes per SEM a x1,0k i x2,5k, respectivament.

Tal com s'observa a la **Figura 70**, l'emulsió PoliHIPRE5 presenta l'aspecte característic d'una emulsió altament concentrada, amb gotes polièdriques i polidisperses, però resulta molt difícil determinar la mida per microscòpia òptica perquè les gotes són molt petites. Aquesta disminució de la mida de gota en relació a l'emulsió PoliHIPRE4 es pot atribuir a l'augment en la concentració de tensioactiu, que ha passat d'un 2% a un 7,5%. En quant als materials porosos d'HA, es poden observar clarament amb menys augments que les escumes sòlides de QS (**Figura 68**), però igual que succeïa amb els materials de QS tenen un aspecte laminar, amb porus molt oberts i parets fràgils, probablement degut a la baixa concentració d'HA a l'emulsió, encara que la concentració de polímer és més elevada que als materials de QS. Igualment destaca una elevada porositat i una baixa densitat. A continuació es descriuran els resultats de l'assaig de porositat conjuntament amb els dels materials de HA.

Els materials de QS i HA també es van caracteritzar per tècniques de porosimetria, i es va determinar la porositat i la superfície específica. Tots dos materials tenen una densitat molt baixa, que fa difícil la caracterització. La possible presència de mesoporus (2-50 nm) es va avaluar mitjançant experiments de sorció de nitrogen. La **Figura 71** mostra les isoterms de nitrogen per materials porosos de QS i d'HA. Es pot apreciar un cicle d'histèresi entre les isoterms d'adsorció i desorció de nitrogen, que és degut a la mesoporositat de la mostra. La presència de mesoporus (2-50 nm) provoca una condensació capil·lar de l'adsorbat que produeix una diferència entre les pressions d'adsorció i de desorció. Mitjançant aquesta histèresi és possible caracteritzar la porositat que presenta la mostra. A més, els forts augments de gas adsorbit a pressions altes és una característica típica de la presència de macroporus (mida superior a 50 nm). La tècnica d'adsorció i desorció de nitrogen no permet tenir informació de mides de porus superiors a 300 nm, però la macroporositat es pot observar per microscòpia electrònica de rastreig (SEM), tal com s'ha mostrat a la **Figura 70**.

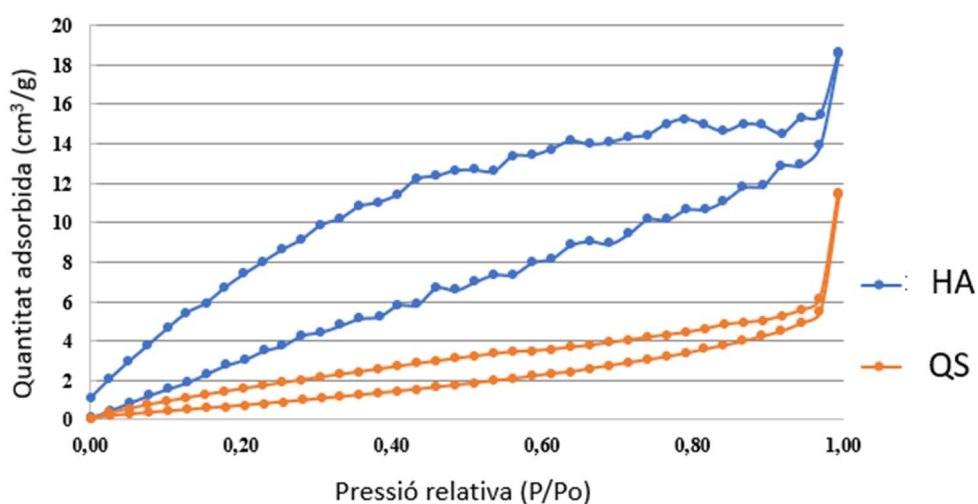


Figura 71. Isothermes d'adsorció i desorció de nitrogen (a 77K) per a materials porosos de QS i HA.

Igual com s'ha observat amb els materials de PS-DVB i PAM, també les escumes sòlides de QS i HA són majoritàriament macroporoses, amb una escassa presència de mesoporus, tal com es dedueix dels cicles d'histeresi. Quan es compara els materials de QS i HA, es podria dir que als d'HA hi ha més mesoporus, però cal tenir en compte que les diferències són petites, malgrat l'eix d'ordenades està molt ampliat. De totes maneres, hi ha hagut un cert error experimental a les mesures, ja que el cicle d'histeresi per la mostra d'HA no es tanca completament a l'origen. Aquest fet es pot atribuir a la dificultat per manipular les mostres, la poca quantitat de mostra que es pot introduir a les cel·les de mesura i a la baixa densitat. Els valors més baixos obtinguts amb les mostres de QS indiquen una menor superfície específica en comparació a les escumes d'HA.

A la **Taula 15** es mostren els valors del volum dels porus i la superfície específica, obtinguts a partir de l'ajust de l'equació BET a les isoterms d'adsorció per les escumes sòlides de QS i HA, utilitzant els punts a pressió més baixa. El volum de porus (per porus més petits de 350,9 nm) es va calcular a partir del punt més alt de les corbes i el percentatge de porositat es va calcular amb l'equació de la porositat, tal com s'ha indicat anteriorment.

Taula 15. Paràmetres obtinguts amb l'assaig de sorció de nitrogen per a les escumes sòlides de QS i d'HA. Es mostra el volum dels porus inferiors a de 350,9 nm (V_{porus}), el volum de microporus i la superfície específica.

Paràmetre (unitats)	Monòlit QS	Monòlit HA
V_{porus} (cm^3/g)	0,104	0,02
$V_{\text{microporus}}$ (cm^3/g)	0,001	0,028
Sup. específica (m^2/g)	4,1	18,3

Es va observar un volum molt baix de microporus, pràcticament indetectable i lleugerament superior per a l'HA. Es van obtenir valors de superfície específica molt baixos, de 4,1 i 18,3 m^2/g pel QS i HA, respectivament. El volum total de porus va ser de 0,104 cm^3/g pel QS i 0,02 cm^3/g per a l'HA, per tant, es pot considerar que els materials de QS i HA són majoritàriament macroporosos. Els materials obtinguts, tant els de PS-DVB, PAM, QS i HA, es poden definir com a escumes macroporoses de molt baixa densitat.

Igual com s'ha observat amb els materials de PS-DVB i de PAM, també els resultats de porosimetria dels materials de QS i HA mostren com és possible modificar les característiques dels materials porosos, mida de por i superfície específica, mitjançant canvis en la mida de gota de l'emulsió de partida, modificant la composició i el mètode de preparació.

Comparant l'estructura dels materials obtinguts i la composició de les emulsions es podria concloure que les escumes sòlides que s'han format per polimerització de monòmers a la fase continua de l'emulsió altament concentrada, materials de PS-DVB i PAM, tenen una estructura més compacta i els porus són més ordenats i interconnectats (**Figura 64**). En canvi, les escumes sòlides que s'han format per incorporació d'un polímer a la fase contínua d'una emulsió altament concentrada i el posterior entrecreuament de les cadenes polimèriques, com és el cas dels materials de QS i HA, són més fràgils, estratificats o filamentosos i els porus són més oberts i irregulars (**Figures 68 i 70**). Aquest fet es pot atribuir a la dificultat d'incorporar quantitats elevades de polímer a

l'emulsió. Les solucions polimèriques concentrades presenten una elevada viscositat, fet que dificulta l'agitació en el procés de formació de l'emulsió altament concentrada, que ja és viscosa sense polímer. En els dos casos, polimerització o incorporació de polímer preformat, els materials porosos obtinguts conserven la morfologia de l'emulsió altament concentrada, però quan es produeix la polimerització en un sistema col·loidal compartimentat, la reacció té lloc d'una manera més ordenada i les estructures que es formen tenen un grau d'ordenació més elevat.

4. INCORPORACIÓ DE FÀRMACS ALS MATERIALS POROSOS

Els materials de PS-DVB, PAM, QS i HA s'han preparat per estudiar la seva potencial aplicació com a sistemes d'alliberament controlat de principis actius. Per això, una vegada preparats els monòlits, es van fraccionar i es va procedir a la incorporació de diferents fàrmacs en solució. Inicialment es va estudiar quin era el millor mètode per incorporar els fàrmacs, en quan a facilitat d'incorporació, uniformitat de contingut i reproductibilitat. Cal recordar que alguns materials com els de PS-DVB són molt hidròfobs, en canvi, altres materials com els d'HA són molt fràgils, i altres com els de QS o PAM tenen formes irregulars i els són difícils de tallar en fragments uniformes. No es va contemplar la introducció de fàrmacs a l'emulsió de partida, ja que els tractaments de purificació dels materials obtinguts podrien produir degradacions o pèrdua dels principis actius incorporats.

Per seleccionar el millor mètode d'incorporació de fàrmac als monòlits, es van addicionar solucions de fàrmac a fragments de material porós, es van assecar en estufa a 50°C durant 24 hores fins a pes constant, es va calcular la quantitat de fàrmac incorporat per diferència de pes i es va determinar l'alliberament del fàrmac a una solució receptora a les 24 hores.

Es van escollir els materials de PS-DVB (PoliHIPRE1, mètode PIT) per fer les proves d'incorporació perquè eren els materials més resistents i que permeten tenir discs de mides més uniformes (**Figura 57**). Els porus d'aquest materials estan interconnectats (Esquena, Sankar, & Solans, Highly Concentrated W/O Emulsions Prepared by the PIT Method as Templates for Solid Foams, 2003) i permeten el flux de les solucions cap a estructures internes dels monòlits. Els discs de PS-DVB també es van micronitzar per estudiar la possibilitat d'incorporar solucions de fàrmac a pols de monòlit, però finalment aquest mètode es va rebutjar per la dificultat en la manipulació i l'avaluació quantitativa de la pols, a més, tal com s'ha descrit a l'apartat 3.1. de Resultats, la micronització fa perdre gran part de l'estructura porosa.

Es van fer estudis preliminars d'incorporació de principis actius es amb solucions de colorants (solució aquosa de blau de metilè i solució orgànica de Sudan III), perquè permetien observar visualment la distribució del colorant a la superfície i a l'interior del monòlit (**Figura 72**).



Figura 72. Aspecte de monòlits de PS-DVB: (a) sense colorant, (b) amb solució de blau de metilè i (c) amb solució de Sudan III.

Per veure la distribució del colorant a l'interior del monòlit es van preparar materials amb un gruix de 3 cm i després de la impregnació es van seccionar per comprovar la coloració de l'interior. També es va estudiar amb colorants la impregnació dels monòlits de PS-DVB amb etanol, glicerina, propilenglicol i polietilenglicol 400 (**Figura 73**).

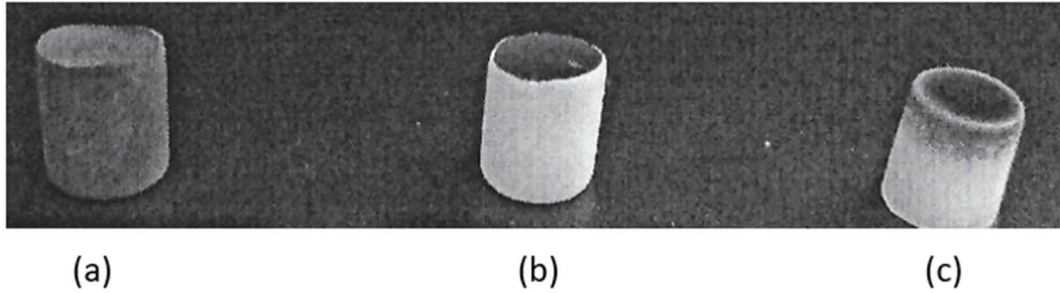


Figura 73. Aspecte de monòlits de PS-DVB amb blau de metilè: (a) en etanol, (b) en glicerina i (c) en propilenglicol.

Es va observar que l'etanol era el millor solvent per realitzar la impregnació, ja que amb els altres solvents només s'aconseguia impregnar la superfície, en canvi, l'etanol i les mescles hidroalcohòliques permetien que el colorant arribés a tot l'interior del monòlit. La impregnació dels monòlits amb una solució aquosa de laurilsulfat sòdic al 0,6% tampoc va aconseguir millorar la incorporació del colorant a l'interior del material.

Es va comprovar com la impregnació dels materials de PS-DVB era més eficaç amb una solució d'aigua i etanol (1:1, p/p), que una solució aquosa. La tensió superficial de l'aigua és 72,8 mN/m i, en canvi, la de la solució hidroalcohòlica és 28,8 mN/m (Canal, Aparicio, Vílchez, Esquena, & García-Celma, Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams, 2012). La solució aquosa no mullava correctament la superfície del monòlit i, en canvi, la solució hidroalcohòlica permetia incorporar tant el fàrmac hidrosolubles (clorhidrat de clindamicina) com els liposolubles (ketoprofèn). A més, la solubilitat en aigua del KP és inferior al 0,1% i en solució aquosa la incorporació d'aquest fàrmac estaria molt limitada; en canvi, amb la solució aigua/etanol (1:1, p/p) permetia dissoldre fins al 17% de KP, que és el principi actiu més insoluble dels que s'han estudiat en aquest treball d'investigació. Tenint en compte la mida relativament petita de la molècula de ketoprofèn i suposant una conformació estesa, la seva longitud màxima seria aproximadament 1,48 nm i seria capaç de penetrar fins i tot als mesoporus presents a la mostra, encara que els materials preparats en aquest treball de recerca són principalment macroporosos, per tant, les molècules més grans hi podrien penetrar.

Alguns discs monòlits de PS-DVB es van tractar amb plasma atmosfèric per tal de modificar les seves propietats superficials, tal com s'ha indicat a l'apartat 3.1.5. de Mètodes. Està descrit que el tractament amb plasma pot modificar les propietats físiques i químiques dels materials a la part més superficial (uns 10 nm), augmentant la hidrofília i millorant les propietats d'humectació, sense afectar les altres propietats del material ni la seva resistència mecànica. Es van impregnar els discs tractats amb plasma amb solucions de KP. No es van observar visualment variacions significatives en quant a la incorporació de colorants.

La impregnació és el punt crític del procés d'incorporació de fàrmacs als materials porosos. En quant als mètodes per fer la impregnació, es van estudiar dos mètodes: a) el mètode de degoteig o addició gota a gota d'una solució de principi actiu i b) el mètode d'immersió en una solució que conté el fàrmac, que estan descrits a l'apartat de Mètodes. A la **Taula 16** es mostren els resultats obtinguts en la impregnació d'escumes sòlides de PS-DVB en forma de discs amb una solució hidroalcohòlica etanol: aigua (1:1, p/p) de ketoprofèn (KP) al 2% i el corresponent assaig d'alliberament a una solució receptora de PBS a les 24 hores.

Taula 16. Incorporació de KP a discs de PS-DVB des d'una solució EtOH/H₂O al 2% en KP i alliberament a una solució receptora de PBS.

Forma del material	Mètode d'impregnació	% KP incorporat (p/p)	% KP alliberat a les 24 h
Disc	Degoteig	25 ± 10	70 ± 17
	Immersion	26 ± 1	79 ± 4

Es va observar que malgrat la quantitat total de fàrmac incorporada als materials porosos no presentava diferències importants, el mètode d'immersió donava uns resultats de percentatge de KP incorporat i alliberat més homogenis que el mètode de degoteig, per la qual cosa es va seleccionar com a mètode més adient per incorporar els fàrmacs. Es va fer una excepció amb els materials d'HA, amb els que es va utilitzar el mètode de degoteig donada la fragilitat dels mateixos.

També es va estudiar la captació de KP i CLIN per part dels materials porosos PS-DVB i QS en funció de la concentració de fàrmac a la solució d'impregnació. Els resultats es mostren a la **Figura 74**. En quant a la captació del KP per les escumes sòlides de PS-DVB es va observar una captació de fàrmac més elevada quan la concentració de KP a la solució d'impregnació és del 10%, amb un increment de pes del monòlit del 76%; en canvi, quan la concentració de KP a la solució hidroalcohòlica era del 2%, l'increment de pes del monòlit va ser del 26%. La capacitat d'absorbir solució hidroalcohòlica és limitada; per tant, si la solució està més concentrada es pot incorporar més principi actiu per a un mateix volum de solució d'impregnació. Aquest efecte també es va observar en la incorporació de KP als materials de QS, encara que l'increment de la captació de KP no va ser tant notable, passant d'un 68% d'increment de pes del monòlit per a una impregnació amb solució del 5% a un 79% quan la solució d'impregnació era del 10%.

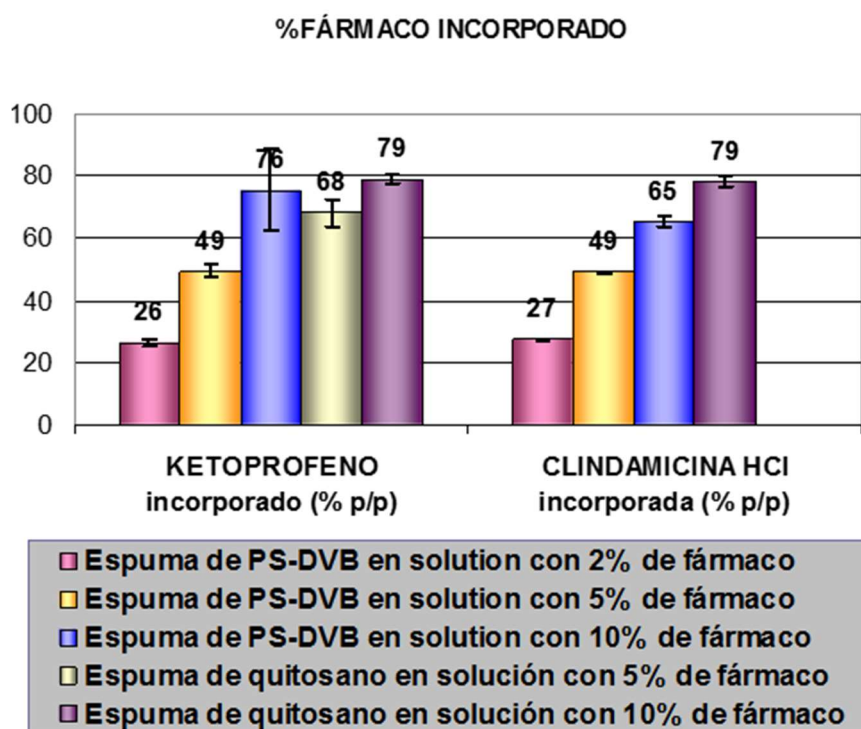


Figura 74. Captació de KP i CLIN pels discs de monòlit de PS-DVB i de QS (en % en pes) en funció de la concentració de KP i CLIN a la solució hidroalcohòlica d'impregnació, pel mètode d'immersió. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard.

La quantitat total de KP incorporada als monòlits en solucions del 2% i del 10% de principi actiu està entre 30 i 60 mg, respectivament. Tenint en compte que les formes farmacèutiques de KP comercialitzades solen contenir entre 50 i 200 mg de KP, es pot considerar que els nous materials estudiats permeten incorporar una dosi suficient de principi actiu.

En relació a la CLIN s'observa un efecte similar al KP. La incorporació de CLIN a materials de PS-DVB és del 27% a partir d'una solució d'impregnació del 2%, del 49% a partir d'una solució del 5% i del 65% quan la solució d'impregnació és del 10%. Malgrat el KP és lipòfil i té un pes molecular de 254 g/mol i la CLIN és hidròfila i té un pes molecular de 461 g/mol, el percentatge de fàrmac incorporat als monòlits és similar, fet que suggereix que és la solució hidroalcohòlica d'impregnació la que té un efecte més important en la incorporació dels principis actius als materials porosos. La incorporació de KP i CLIN a materials de PS-DVB i QS a partir de solucions d'impregnació del 10% ha donat resultats similars, en tots dos casos del 79%.

Els resultats obtinguts en l'estudi dels mètodes d'incorporació de principis actius als monòlits van permetre comprovar que es podia realitzar una impregnació eficient, uniforme i en profunditat dels monòlits hidròfobs de PS-DVB i QS pel mètode d'immersió en una solució hidroalcohòlica d'aigua/etanol (1:1, p/p). El mètode de degoteig es va reservar pels materials d'HA degut a la seva fragilitat. També es va comprovar com les solucions més concentrades en principi actiu permetien la incorporació de quantitats més elevades de fàrmac.

5. ESTUDIS D'ALLIBERAMENT DE FÀRMACS DES DELS MATERIALS POROSOS

En la present tesi doctoral s'han preparat emulsions altament concentrades, W/O i O/W, basades en poliestirè-divinilbenzè, poliacrilamida, quitosan-genipina i àcid hialurònic-BDDE; a partir d'aquestes emulsions altament concentrades s'han preparat materials

porosos, com a sistemes d'alliberament de fàrmacs hidròfils i lipòfils. La caracterització d'aquests nous materials i l'estudi de la incorporació de fàrmacs i la cinètica d'alliberament és fonamental pel desenvolupament de formes farmacèutiques segures i eficaces. És per això que s'ha desenvolupat un sistema de control senzill basat en l'aparell de dissolució que ens ha permès comparar les característiques dels diferents materials sense haver de recórrer a tècniques complexes. Entre els objectius de la tesi s'ha contemplat la selecció dels dispositius més adequats per efectuar els estudis d'alliberament des dels materials porosos polimèrics, així com dels medis receptors i l'estudi dels perfils d'alliberament de fàrmacs des dels materials a una solució receptora. Igualment s'han aplicat models matemàtics per explicar el comportament dels nous materials en quant a l'alliberament de principis actius a medis receptors. A continuació s'exposaran els estudis sistemàtics que s'han realitzat, els resultats obtinguts i la seva interpretació.

5.1. Estudis preliminars

S'han estudiat les escumes sòlides polimèriques com a possibles formes de dosificació de fàrmacs i com es tractaria d'unes noves formes farmacèutiques, el seu control de qualitat no està descrit. Com a formes sòlides que són, s'ha intentat adaptar l'assaig de dissolució per avaluar el seu comportament en comparació a altres formes sòlides com els comprimits i les càpsules i també s'han proposat diferents dispositius perquè l'assaig de dissolució pugui donar la millor informació que permeti comparar els diferents materials polimèrics porosos preparats. També s'han seleccionat fàrmacs model, amb diferents propietats fisicoquímiques, per avaluar el comportament de cessió: KP, CLIN i SB.

En un primer moment es van utilitzar vasos de vidre topazi, termostatats on es van introduir bosses de diàlisi que contenien els materials porosos amb fàrmac i es va estudiar el seu perfil d'alliberament a una solució receptora que era PBS pH 7,4. Prèviament es va assegurar que qualsevol dels fàrmacs estudiats complia condicions *sink* en aquest medi, per poder fer l'assaig de dissolució (**Figura 75**). Per tant, els primers

assaigs es van fer amb bosses de diàlisi en vasos de vidre amb agitació i a una temperatura de 37°C.

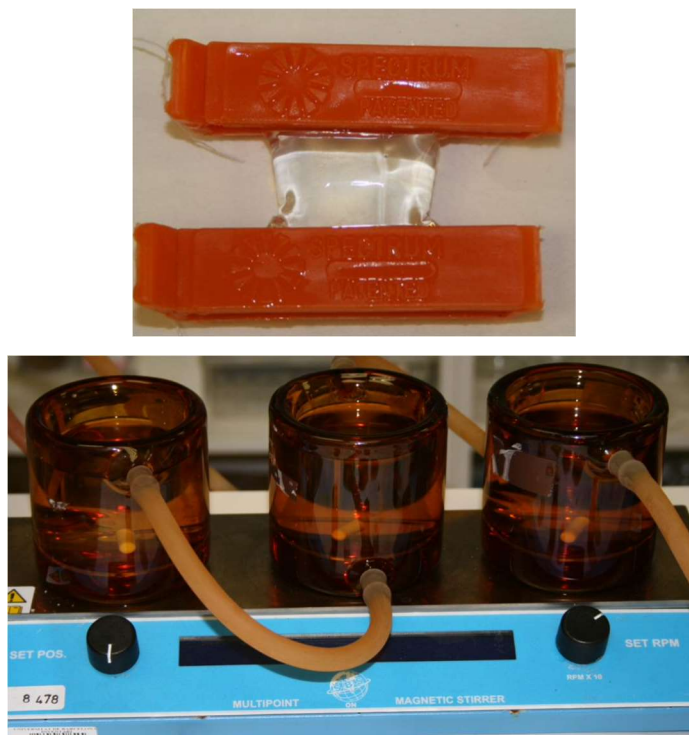


Figura 75. Bossa de diàlisi on s'introdueix la mostra de material porós i cel·les termostatades utilitzades per a l'assaig de cessió.

Es van preparar monòlits de PS-DVB, es van impregnar amb una solució de KP al 10%, es van introduir en bosses de diàlisi i es va fer l'estudi de cessió durant 24 hores, en cel·les termostatades a 37°C. La solució receptora es va mantenir amb agitació mitjançant nuclis magnètics i les cel·les es van cobrir amb parafilm per evitar les pèrdues del medi receptor per evaporació. La solució receptora va consistir en 150 mL de PBS pH 7,4. Es van obtenir els perfils d'alliberació que es mostren a la **Figura 76**.

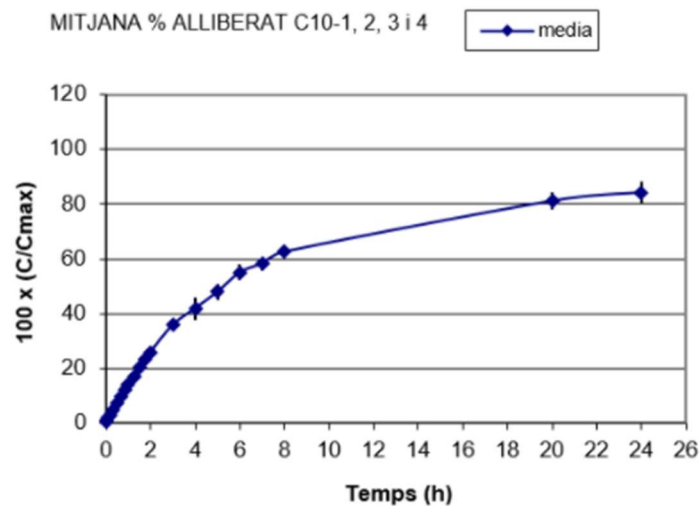


Figura 76. Perfil d'alliberació de KP incorporat a tres monòlits de PS-DVB a 37°C. Solució d'impregnació: KP (10%). Dispositiu utilitzat: cel·les de vidre topazi i bosses de diàlisi.

S'observa l'alliberament del KP a la solució receptora, d'una manera lenta i sostinguda, assolint una cèssió del 80% del KP a les 24 hores de l'inici de l'assaig. Una vegada es va comprovar l'adequació del mètode, es van fer estudis de cèssió a l'equip de dissolució automatitzat, que es va posar a punt i es van estudiar diferents dispositius per introduir les mostres. A continuació es descriu la posada a punt de l'equip de dissolució automatitzat i els diferents estudis realitzats.

5.2. Posada a punt de l'aparell de dissolució automatitzat pels assaigs de cèssió

Els estudis preliminars de cèssió o alliberament de fàrmacs es van realitzar amb bosses de diàlisi submergides en cel·les de vidre topazi amb camisa calefactora. Aquest sistema permetia connectar en sèrie tres o sis cel·les i realitzar assaig simultàniament en les mateixes condicions. No obstant, la presa de mostra manual, especialment a temps curts es feia molt difícil i per això es va optar per utilitzar un equip semiautomàtic amb sondes d'automostreig i reposició de solució receptora, que permetia analitzar simultàniament vuit cel·les a temps prefixats. L'automatització de l'equip ha permès assajar diverses mostres simultàniament i obtenir resultats més fiables. La quantificació del principi actiu mitjançant lector de microplaques ha reduït considerablement el

temps necessari per obtenir resultats. L'equip de dissolució que es va utilitzar va ser el *Vision Elite 8TM* (Hanson Research, USA), disponible al nostre laboratori. Prèviament a la seva utilització es va posar a punt una metodologia de mostreig i es va fer una validació del mètode, per tal d'optimitzar el sistema de presa de mostres automàtic i conèixer els valors dels diferents paràmetres que s'han de definir per portar a terme l'assaig en les condicions òptimes. Aquest objectiu va incloure la redacció del Procediment Normalitzat de Treball per garantir la correcta utilització del sistema *Autoplus*, de manera que qualsevol persona del laboratori pugui fer un assaig de dissolució amb presa de mostres automatitzada correctament.

L'equip de dissolució *Vision Elite 8TM* (**Figura 77**) consta de les següents parts:

1. Cap mòbil que es pot fer baixar i pujar manualment accionant una palanca d'alliberament.
2. Pantalla de control tàctil que permet seleccionar els paràmetres de l'assaig (temperatura del bany, velocitat de gir dels eixos)
3. Bany termostatat i vuit vasos de dissolució. Cada vas disposa d'una tapa.
4. Eixos: dispositiu on van enroscades les pales o els cistells.
5. Pales o cistells: s'utilitzarà un dispositiu o un altre en funció de l'assaig que es porti a terme. En la validació que es descriu en aquest treball es van utilitzar les pales (tipus II).

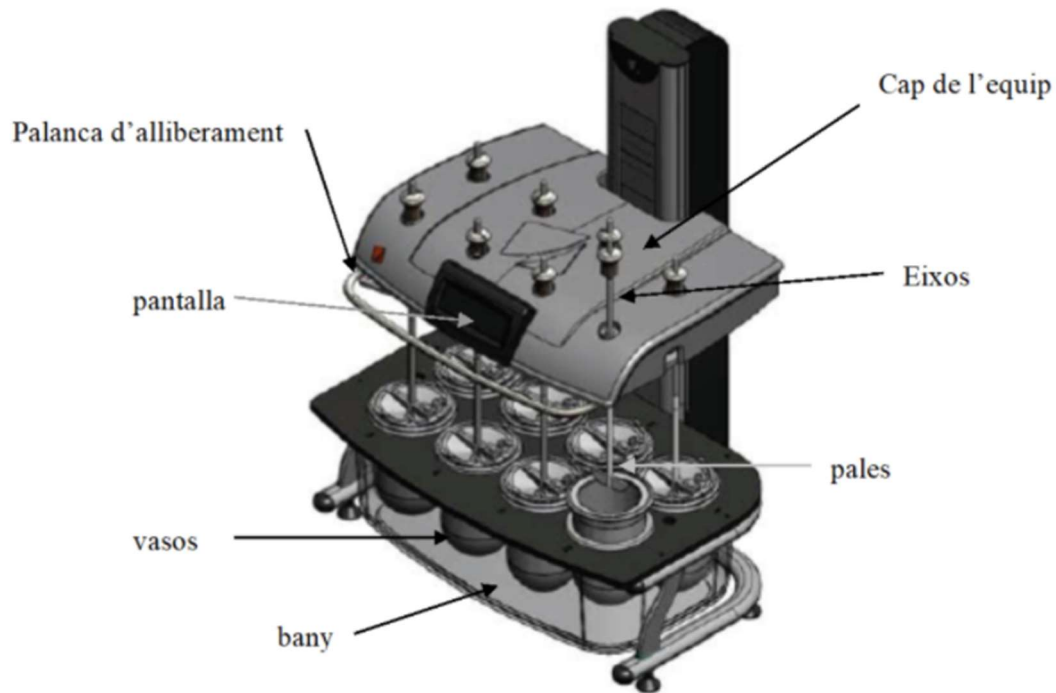


Figura 77. Equip de dissolució Vision Elite 8TM (Hanson Research).

L'equip de presa de mostres automàtica objecte de la validació d'aquest treball és el *Hanson Research AutoPlus MaximizerTM*: recol·lector de mostres automàtic amb xeringues controlades amb un motor i equipades amb un sistema de quatre vàlvules amb dues sortides cada una. Les mostres es recullen mitjançant el mòdul *MultifillTM*. El sistema *AutoPlus* està format per diferents mòduls i té les següents parts (**Figura 78**):



Figura 78. Sistema *AutoPlus* de l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM* (Hanson Research).

1. Bomba per escalfar el bany i de circulació d'aigua.
2. Equip de dissolució *Hanson Vision Elite 8TM*.
3. *Rack* col·lector de fraccions (*MultiFillTM*): la seva funció és prendre mostres i dipositar-les en vials mitjançant les agulles. La numeració dels vials serveix per saber a quin vas correspon cada mostra i quin número de mostra és respecte el temps. La part de davant està numerada i cada número correspon a un vas. Del *MultiFill* surten els tubs del *rinse*, és a dir, del volum de líquid que es fa servir per netejar els canals just abans de recollir la mostra i posar-la als vials. Aquest volum de líquid de neteja, com que no s'ha de recollir, va a parar a un recipient (vas de rebuig).
4. Controlador *autosampler* (*AutoPlusTM*): el controlador és el mòdul principal del sistema *AutoPlus*, permet crear, posar en marxa i controlar tots els assaigs. El mòdul disposa de tres indicadors lluminosos i una pantalla/panell de control:
 - *Power*: s'encén un llum verd quan l'aparell es posa en marxa
 - *Diagnostics*: s'encén en vermell quan detecta algun problema
 - *Time alert*: s'encén en llum taronja quan s'activa una alarma
 - El controlador té un panell de control amb els botons numèrics i les tecles amb una funció concreta.
5. Vas de reposició de medi: pot ser un vas de precipitats qualsevol, en el qual s'ha d'introduir medi i les sondes del canal C, a través de les quals s'agafa la quantitat e medi que s'ha de reposar.
6. Vas de rebuig: és un vas de precipitats en el qual desemboca el canal D. Hi van a parar les solucions que s'extreuen amb el *rinse* i el *prime*.
7. Mòdul amb els canals per recollir la mostra i amb sensors de temperatura: aquest mòdul se sosté al cap de l'equip de dissolució i puja i baixa a cada presa de mostra. És el suport del canal A de presa de mostra i el sensor de temperatura de cada vas.

Definicions de les accions que porta a terme l'*AutoPlus*:

- *Prime*: omplir els tubs buits amb la solució seleccionada. Es fa en posar en marxa l'aparell perquè no quedi aire o l'aigua que s'ha utilitzat en l'últim assaig per rentar dins els tubs.
- *Rinse*: buidar de medi romanent als tubs omplint-los amb el medi que hi ha en aquell moment als vasos. Aquesta funció s'utilitza per assegurar que la mostra que es pren és la d'aquell temps i no la del temps d'abans.
- *Wash*: buidar de medi romanent els tubs amb solució de neteja. S'utilitza quan es volen netejar els tubs una vegada s'ha acabat de fer servir el sistema.
- *Transfer*: moure el líquid d'un tub a un altre. És una funció que es pot fer en diferents direccions, l'aparell permet triar el canal pel qual es vol agafar el medi i el canal pel qual es vol fer sortir.

El següent esquema (**Figura 79**) mostra els circuits de l'aparell i posteriorment es detalla la utilitat i les funcions que es poden portar a terme per cada canal.

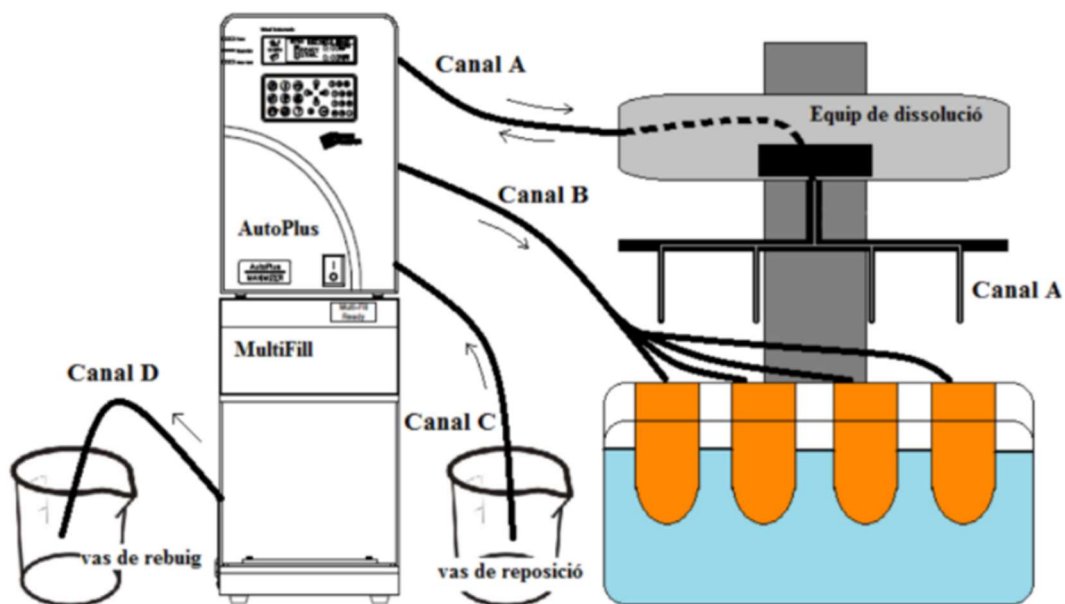


Figura 79. Esquema dels canals de l'Autoplus (Hanson Research) i les direccions del flux.

- Canal A: és el canal per prendre mostra dels vasos i també es pot utilitzar per reposar medi. Tenen una llargada d'uns 130 cm.
- Canal B: surt de les xeringues del controlador i va als vasos de l'aparell de dissolució. S'utilitza únicament per reposar medi i el flux només pot anar en un sentit, de l'*AutoPlus* als vasos.
- Canal C: és el canal per on s'agafa el medi que s'ha de reposar als vasos. Aquest canal va del vas de reposició a les xeringues de l'*AutoPlus*. Per fer la neteja, s'omple el vas de reposició amb aigua *Milli-Q* i a través del canal C es fa circular per tots els altres.
- Canal D: surt del *MutiFill* i va al vas de rebuig. S'utilitza per evacuar el líquid que es fa passar pel circuit en fer un *rinse* o un *prime*. De les xeringues, en surt un tub que va fins a les agulles del *MultiFill* que omplen els vials. Si la mostra que porta és rebuig, les agulles no es mouen cap als vials i el líquid va al canal D.

Segons el fabricant de l'equip, els tubs de tefló de l'*AutoPlus* tenen un volum de 0,00496 ml/cm. Cada canal del sistema que s'ha utilitzat per fer aquest assaig té una llargada diferent. El canal A fa uns 130 cm, el B fa uns 140 cm, el C fa un metre aproximadament i el D, uns 80 cm (no és possible mesurar-los exactament ja que hi ha una part del circuit dins els mòduls). Tots els tubs són de tefló, excepte el C que en l'extrem per on agafa el medi de reposició té 40 cm d'acer inoxidable.

Per posar a punt l'*Autoplus*, el sistema automàtic de presa de mostres, de l'equip de dissolució *Hanson Vision* s'han fet cinc assajos, dos dels quals han estat modificacions dels primers en funció dels resultats que es van obtenir.

Amb l'objectiu de conèixer les quantitats necessàries de *prime*, *rinse* i saber si 1 ml de mostra és suficient per portar a terme correctament un assaig amb automatització de presa de mostres i obtenir-ne uns resultats fiables, s'han fixat unes condicions constants pels cinc assajos que es detallen a la **Taula 17**.

Taula 17. Condicions constants als assaigs de dissolució.

Variable		Observacions
Solució als vasos	900 mL	Solució de PBS amb 100 µg/mL de KP
Durada	30 min	
Presa de mostres	Cada 5 min	Temps: 00:05, 00:10; 00:15; 00:20; 00:25; 00:30
Velocitat de gir de les pales	50 rpm	
Temperatura del bany	37 °C	
<i>Sample stroke</i>	80 mm	Nivell fins on baixa el mòdul amb els canals per recollir la mostra amb els sensors de temperatura

Cada temps de presa de mostra de tots els assajos que s'han portat a terme s'han executat en tres passos:

- *Rinse*: treu mostra del vas per omplir el canal A (de presa de mostra) de la solució que hi ha al vas en aquell temps i s'evacua pel canal dels residus (canal D).
- Presa de mostra (*Collect only*): a través del canal A s'extreu el volum de mostra que es vol portar als vials situats al *MultiFillTM*.
- Reposició del volum que s'ha tret dels vasos. En els assajos d'aquest treball s'ha utilitzat l'opció *Transfer* i s'han utilitzat dues solucions diferents i dos canals diferents que es detallen a les condicions de cada assaig.

A la **Taula 18**, es detallen els paràmetres determinats per cadascun dels cinc assaigs proposats.

Taula 18. Paràmetres determinats pels cinc assaigs proposats.

Assaig	Acció	Quantitat	Canals
Primer	<i>Rinse</i>	1 mL	Del canal A al D
	Presa de mostra	1 mL	Del canal A al vial
	<i>Transfer</i>	2 mL de PBS i KP 100 µg/mL (la mateixa solució que hi ha als vasos)	Del canal C a l'A
Segon	<i>Rinse</i>	1 mL	Del canal A al D
	Presa de mostra	1 mL	Del canal A al vial
	<i>Transfer</i>	2 mL PBS	Del canal C a l'A
Tercer	<i>Rinse</i>	1 mL	Del canal A al D
	Presa de mostra	1 mL	Del canal A al vial
	<i>Transfer</i>	2 mL PBS	Del canal C al B
Quart	<i>Rinse</i>	4 mL	Del canal A al D
	Presa de mostra	1 mL	Del canal A al vial
	<i>Transfer</i>	5 mL PBS	Del canal C a l'A
Cinquè	<i>Rinse</i>	4 mL	Del canal A al D
	Presa de mostra	1 mL	Del canal A al vial
	<i>Transfer</i>	5 mL PBS	Del canal C al B

Amb la finalitat d'observar un augment de concentració en les mostres, en el cinquè assaig es van afegir 20 ml de dues solucions més concentrades a diferents temps. Del vas 1 al vas 5, després de la segona presa de mostra s'hi va afegir 20 ml d'una solució de PBS i ketoprofèn 2400 µg/mL per aconseguir una concentració de 150 µg/mL de ketoprofèn a la solució del vas. En els vasos 6, 7 i 8 aquest pas es va fer entre la tercera i quarta presa de mostra. Després de la quarta presa de mostra es va afegir, als vasos 1 a 5, 20 ml de solució de PBS i ketoprofèn 2500 µg/mL, la necessària per assolir una concentració teòrica als vasos de 200 µg/mL. Als vasos 6, 7 i 8 es va afegir la mateixa quantitat després de la cinquena presa de mostra.

Aquests assaigs es van dur a terme en dos dies diferents i com ja s'ha dit anteriorment, el quart i el cinquè es van elaborar en funció dels resultats dels tres primers. Pels tres primers, en posar en marxa l'equip només es va fer un *prime* en el canal de presa de mostres i no es va tenir en compte que també s'havia de fer al canal C, el que agafa el medi de reposició, en el qual hi havia aigua de la neteja però sobretot aire. Tampoc es va fer el *prime* entre assajos.

Per realitzar el quart i el cinquè assaig, com que ja es coneixien els resultats i s'havien pogut interpretar, es va veure la necessitat de fer un *prime* a tots els canals abans de començar i repetir-lo entre un assaig i l'altre. D'altra banda, a diferència dels tres primers, en els dos últims assajos es va reposar els 5 mL de la solució de PBS i ketoprofèn 100 µg/mL que s'havia extret de cada vas per omplir els canals (per fer el *prime*).

Els diferents assajos que es van fer, variant els volums i els canals de les diferents accions que es porten a terme en cada temps de presa de mostra amb l'*AutoPlus*, permeten concloure que:

- És necessari fer una esbandida (*prime*) de com a mínim 5 ml a tots els canals abans de començar qualsevol assaig per assegurar que els tubs es buiden de l'aigua de neteja i de l'aire que hi pugui haver i s'omplin amb la solució o medi de l'assaig. L'opció *prime* no permet fer circular medi per tots els canals i l'esbandida o ompliment s'ha de fer mitjançant un *transfer*.
 - El *rinse*, per buidar els canals de la solució romanent de la presa de mostra anterior i omplir-los amb la solució que hi ha als vasos en aquell temps, ha de ser de com a mínim de 5 ml.
 - És preferible fer la reposició del medi per un canal diferent al de presa de mostra. És a dir, reposar pel canal B la suma dels volums que s'han extret del vas per fer el *rinse* i el de la mostra (canal A).
- Quan els assajos es fan sota les condicions que s'han establert en aquesta posada a punt, els resultats que s'obtenen són fiables.

5.3. Alliberament de ketoprofèn, clorhidrat de clindamicina i sulfat de salbutamol

Es va estudiar l'alliberament de diferents principis actius, amb propietats fisicoquímiques diferents: KP, un fàrmac lipòfil amb pes molecular de 254 g/mol; CLIN, un fàrmac hidròfil amb un pes molecular de 461 g/mol i SB, un fàrmac iònic soluble en aigua amb un pes molecular de 577g/mol. L'estudi es va fer a l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM* amb bosses de diàlisi. Es van incorporar KP i CLIN en una solució d'impregnació amb concentració del 2% a materials porosos de PS-DVB. A efectes comparatius es va estudiar la difusió d'una solució amb la mateixa concentració de KP i CLIN en bosses de diàlisi, per veure l'efecte de retenció que tenia la membrana sobre els principis actius. Les **figures 80 i 81** mostren els perfils d'alliberament dels dos principis actius KP i CLIN des d'una solució i incorporats a materials de PS-DVB.

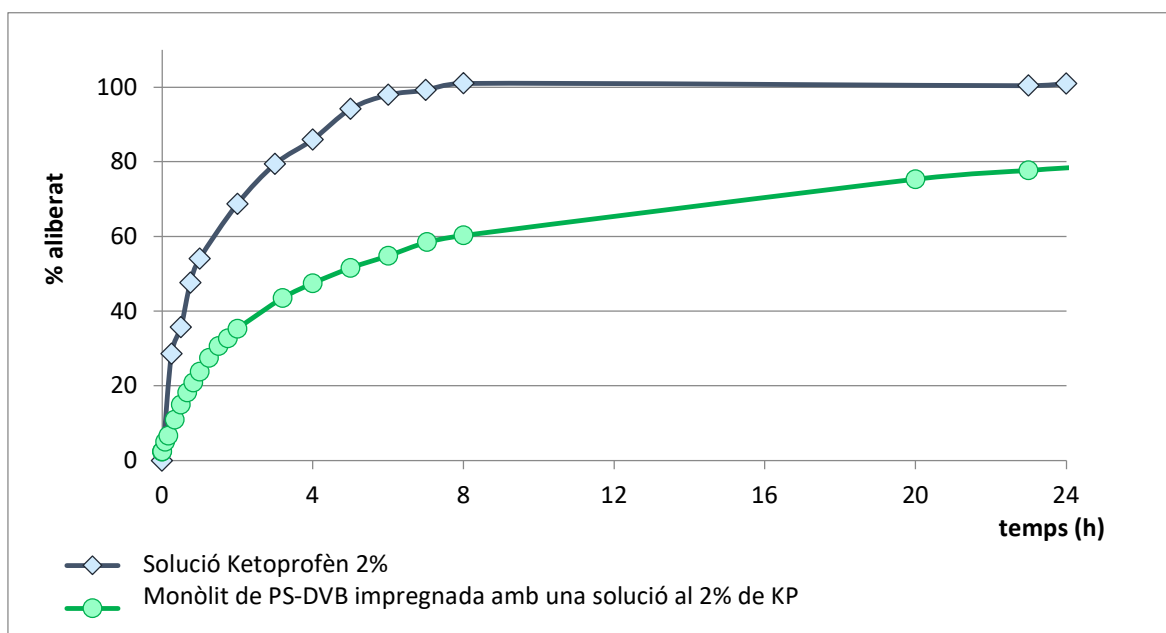


Figura 80. Perfils d'alliberament de KP des de materials porosos de PS-DVB impregnats amb una solució al 2% de fàrmac i des d'una solució utilitzant bosses de diàlisi a l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM*.

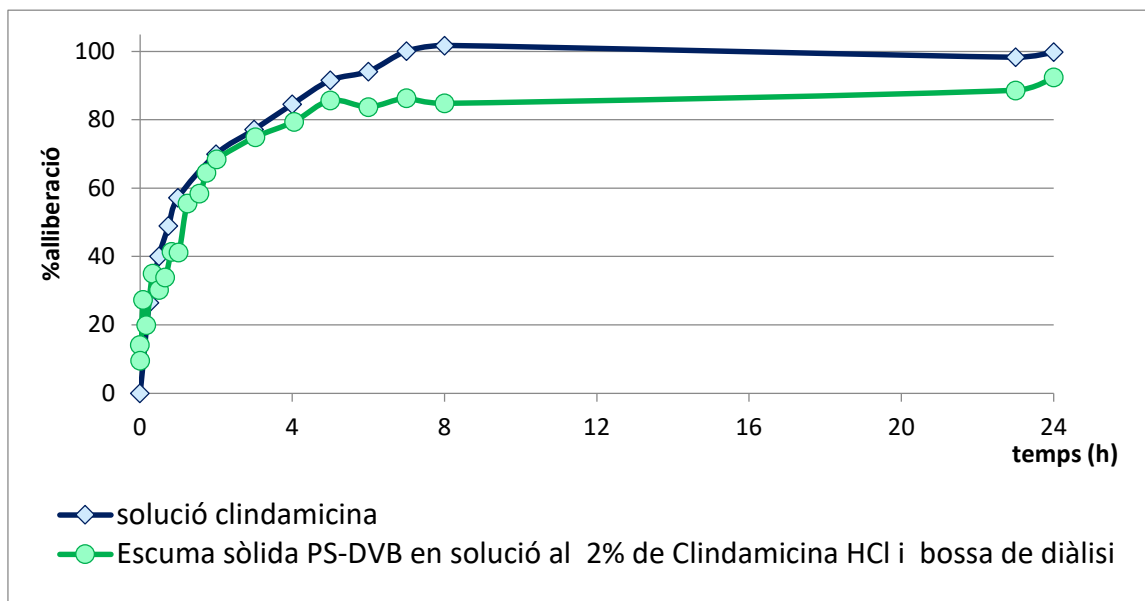


Figura 81. Perfils d'alliberament de CLIN des de materials porosos de PS-DVB impregnats amb una solució al 2% de fàrmac i des d'una solució utilitzant bosses de diàlisi a l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM*.

Comparant els perfils de KP i CLIN es pot observar que els dos fàrmacs difonen ràpidament quan estan en solució aquosa, assolint el 100% a la fase receptora a les 8 hores aproximadament. En canvi, s'observen diferències importants en quan a l'alliberament dels principis actius des dels materials porosos de PS-DVB. El KP queda molt més retingut que la CLIN i la seva cessió és més sostinguda. A les 24 hores l'alliberament de CLIN supera el 90% i, en canvi, el KP no arriba al 80%. Aquest fet no es pot atribuir a la solubilitat dels principis actius en el medi receptor, que és una solució de PBS pH7,4, perquè si fos així, ja s'hauria observat aquest comportament en la difusió des dels materials porosos dels fàrmacs. D'igual manera, tampoc es pot atribuir a la membrana d'acetat de cel·lulosa, perquè la solució de KP i la de CLIN presenten el mateix perfil. La incorporació dels principis actius als materials tampoc presenta diferències significatives, tal com s'ha indicat a l'apartat 4 de Resultats. Es podria especular que l'alliberament del principi actiu incorporat a les escumes sòlides consistiria en una etapa ràpida on difondria el fàrmac adsorbit o dipositat a la superfície del material porós, en una segona etapa s'alliberaria el principi actiu ubicat als macroporus i finalment, en una etapa més lenta, difondria el fàrmac dels mesoporus que és menys accessible a la solució receptora i constituiria un reservori de principi actiu. La interconnexió dels materials

porosos formant una estructura 3D afavoriria la difusió del fàrmac i la penetració de la solució receptora.

Per tant es podria suposar que les diferències vindrien donades perquè l'impregnació de les escumes sòlides hidròfobes de PS-DVB amb KP, un fàrmac lipòfil de baix pes molecular tingués lloc en més profunditat que en el cas de la CLIN, que és un fàrmac hidròfil i de pes molecular més elevat. Si el KP es distribueix a nivell dels mesoporus o en la profunditat del material es podria explicar la diferència en quant al perfil d'alliberament entre KP i CLIN.

També es va estudiar la incorporació de SB als materials porosos de PS-DVB. En aquest cas es van impregnar amb una solució de SB al 5%. La **Figura 82** mostra el perfil de cessió obtingut.

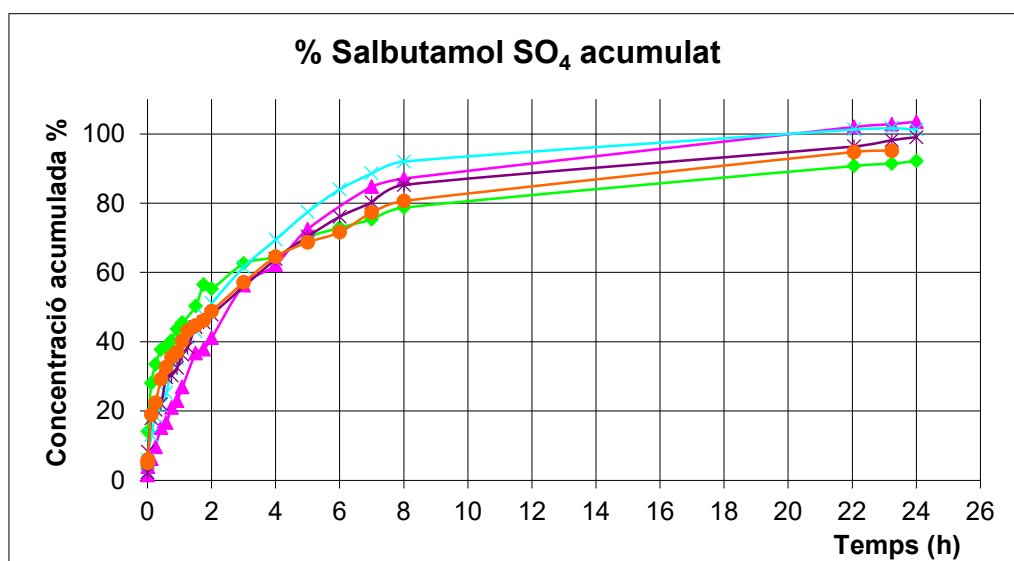


Figura 82. Perfil d'alliberament de SB incorporat a material porosos de PS-DVB. Replicats impregnats amb una solució al 5 % de SB

Els perfils d'alliberament obtinguts per al SB mostren que aquest fàrmac iònic i soluble en aigua s'allibera lleugerament més lentament que la CLIN però més ràpidament que el KP. El seu pes molecular és el més elevat dels tres i la seva ionització no afavoreix la incorporació en solució aquosa als materials hidròfobs de PS-DVB. La incorporació als monòlits ha sigut força homogènia, entre el 53 i 56%, i lleugerament superior a la

incorporació de KP i CLIN que era aproximadament el 49% per als dos principis actius. El 70% del SB, el 80% de CLIN i menys del 50% de KP s'ha alliberat a les 5 hores. El retard en l'alliberament és més acusat amb el KP i per això és el fàrmac que s'ha escollit per a la majoria d'assaigs de cessió comparatius.

5.4. Selecció del dispositiu per introduir les mostres

Es van proposar tres dispositius per introduir les mostres als vasos de l'equip de dissolució: bosses de diàlisi d'acetat de cel·lulosa, cel·la d'immersió (també anomenada pel fabricant *ointment cell*) i cistell perforat (mètode 1 de la Farmacopea). Les bosses de diàlisi (**Figura 75**) contenen material porós es van introduir als vasos de l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM*. Les cel·les d'immersió (**Figura 83**) contenen el material porós al lloc on es diposita la mostra, que quedava separada del medi receptor per una membrana d'acetat de cel·lulosa. Les cel·les d'immersió estan dissenyades per avaluar formes de dosificació semisòlides i s'integren a l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM* dintre de vasos cilíndrics de 150 mL de capacitat. El dispositiu anomenat cistell perforat correspon al mètode 1 de l'aparell de dissolució descrit a la Farmacopea (**Figura 50** de l'apartat 3.5.1 de Mètodes).

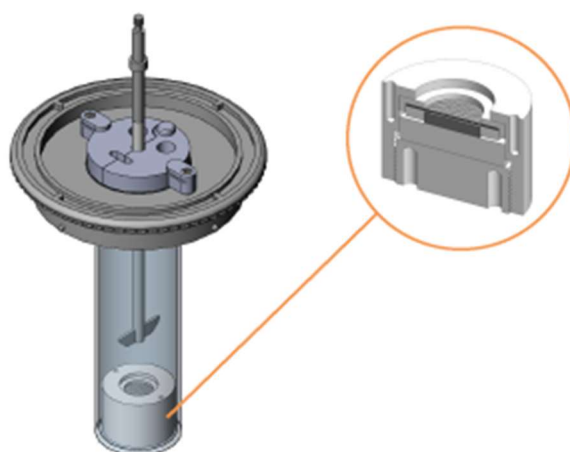


Figura 83. Esquema de la cel·la d'immersió (*ointment cell*, Hanson Research) ubicada al vas de 150 mL de l'equip de dissolució *Vision Elite 8TM*.

Es van fer estudis comparatius amb els diferents dispositius i amb diferents principis actius: KP i CLIN. A la **Figura 84** es mostren els perfils d'alliberament obtinguts amb materials de PS-DVB impregnats amb una solució de KP al 10 % i introduïts a l'equip de dissolució en bosses de diàlisi, cel·les d'immersió i cistells perforats.

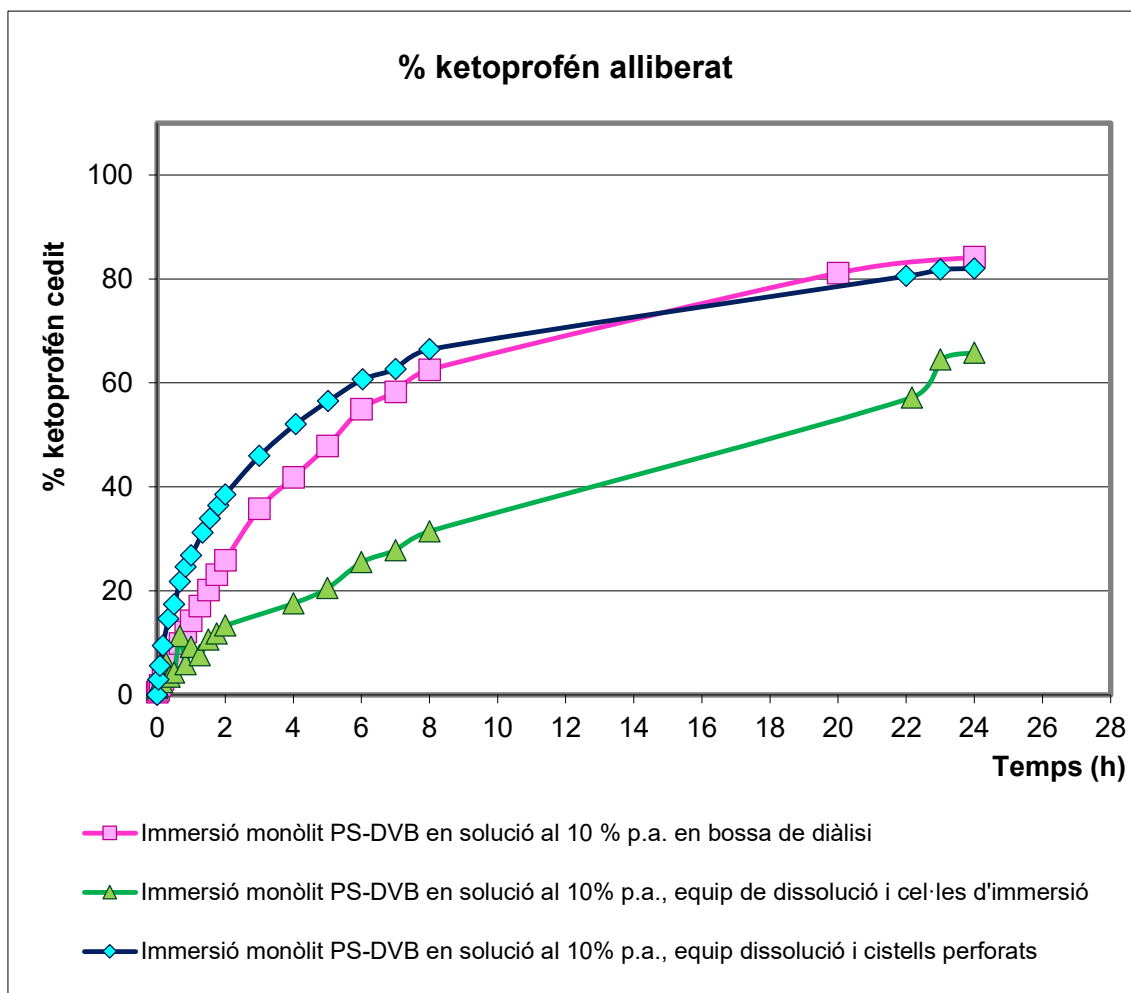


Figura 84. Perfils d'alliberament de KP des de materials porosos de PS-DVB introduïts en bosses de diàlisi, cel·les d'immersió o cistells perforats.

No s'observen diferències significatives en quant als perfils d'alliberació. Els perfils d'alliberació entre les bosses de diàlisi i els cistells perforats; en canvi, la cel·la d'immersió produeix un retard en l'alliberament, probablement causat per una petita superfície de contacte entre el material i la solució receptora. Per tant, no s'utilitzarà la cel·la d'immersió en estudis posteriors.

La **Figura 85** mostra els perfils d'alliberament de CLIN incorporada en diferents concentracions a materials de PS-DVB i introduïts en bosses de diàlisi i en cistells perforats. S'observa un alliberament més ràpid que en el cas del KP, atribuïble a l'elevada solubilitat de CLIN en medi aquós i destaca la rapidesa observada amb el mètode del cistell perforat, on no hi ha cap membrana que separi la mostra del medi receptor i es minimitzen les possibles interaccions que pugui presentar el principi actiu amb la membrana. A efectes comparatius s'ha estudiat el perfil d'alliberament obtingut amb una solució de CLIN en bossa de diàlisi. Es pot observar com es molt similar a l'observat per a l'alliberament des dels materials porosos continguts en bosses de diàlisi, en comparació amb el perfil obtingut quan el material està dipositat en el cistell perforat. Es pot concloure que el retard observat es deu a la interferència amb l'acetat de cel·lulosa i no a la retenció del material porós, ja que la CLIN presenta un alliberament molt ràpid.

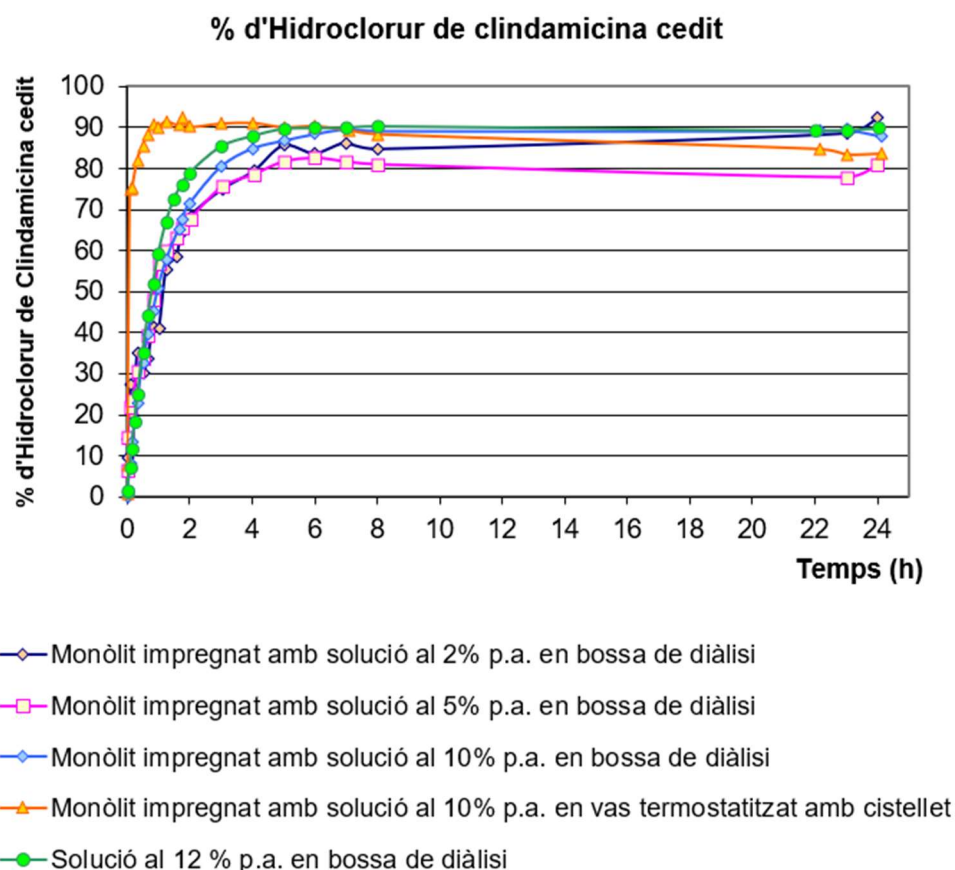


Figura 85. Perfils d'alliberament de CLIN des de materials porosos de PS-DVB introduïts en bosses de diàlisi i cistells perforats. S'ha comparat amb una solució de CLIN al 12% en bossa de diàlisi.

Els resultats obtinguts suggereixen que els tres mètodes assajats: bossa de diàlisi, cel·la d'immersió i cistell perforat són adequats per avaluar la cessió de principis actius des de materials porosos polimèrics fins una solució receptora; no obstant, el mètode del cistell perforat és el més eficaç i reproduïble ja que evita el retard en l'alliberament ocasionat per la membrana de diàlisi i permet un millor contacte de la mostra amb la solució receptora, que és el que succeeix en condicions fisiològiques. Amb el dispositiu del cistell perforat perforat l'alliberament es realitza directament a la solució receptora sense interferència de cap membrana i serà el mètode seleccionat per comparar diferents materials o diferents principis actius.

5.5. Comparació de l'alliberament de KP des de materials porosos amb formes de dosificació comercials

Un dels avantatges que poden presentar les escumes sòlides polimèriques davant de formes farmacèutiques convencionals és la possibilitat de controlar l'alliberament dels fàrmacs i aconseguir una cessió més sostinguda al llarg del temps. Per això es va fer un estudi comparatiu amb formes orals comercialitzades de KP (Orudis®), concretament comprimits de 100 mg i càpsules de 50 mg, que es van sotmetre a l'assaig de dissolució tal com estableix la Farmacopea per a formes sòlides orals. Els perfils de cessió obtinguts es van comparar amb els de materials porosos de PS-DVB. Els resultats es mostren a la **Figura 86**.

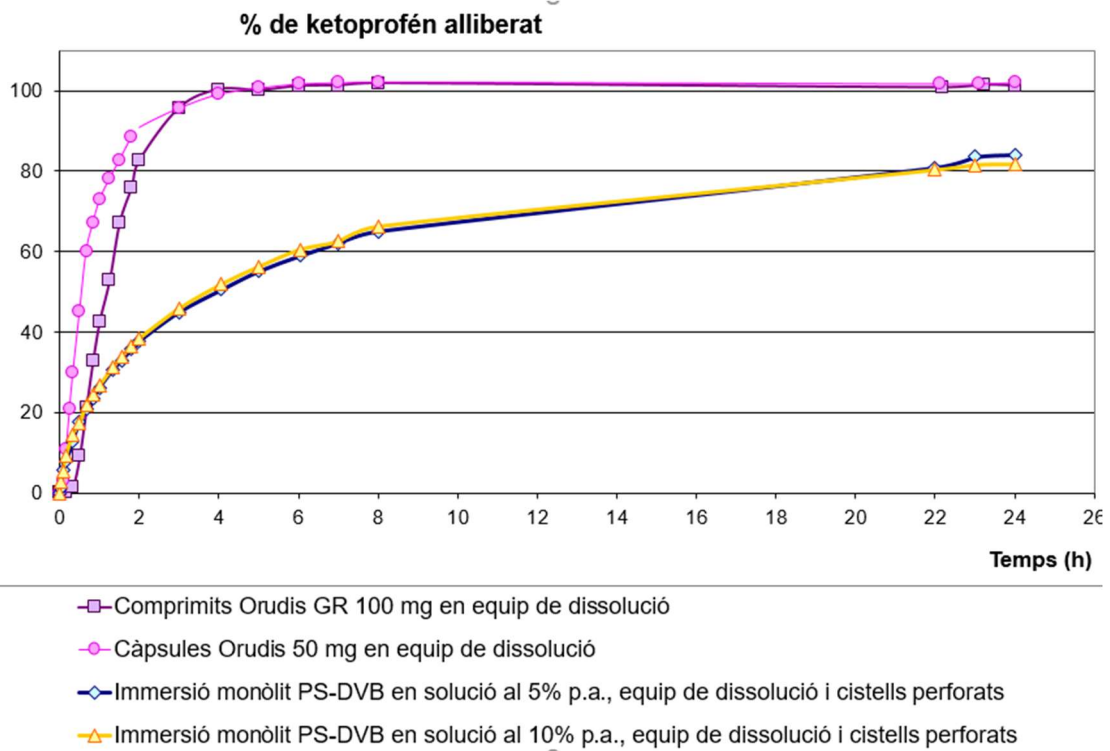


Figura 86. Perfils d'alliberació de comprimits de KP 100 mg, càpsules de KP 50 mg i KP incorporat a monòlits de PS-DVB a 37°C. Solució d'impregnació: KP (5 i 10%). Dispositiu utilitzat: cistell perforat i equip de dissolució.

Els resultats obtinguts mostren com l'alliberament és molt ràpid des dels comprimits i les càpsules assajades: en canvi, el KP alliberat des dels monòlits de PS-DVB mostra una cèssió més lenta i sostinguda, que és un dels objectius que es volen aconseguir amb aquestes noves formes de dosificació. La incorporació del KP en l'estructura porosa del PS-DVB fa que l'alliberament sigui més lent i progressiu i que a les 24 hores no hagi arribat encara a l'estat estacionari.

5.6. Alliberament de ketoprofèn des de diferents materials polimèrics porosos

Es va comparar el comportament dels materials polimèrics porosos preparats prèviament fent servir emulsions altament concentrades com a plantilla. Per això s'han escollit materials de PS-DVB, PAM, QS i HA, tots preparats pel mètode d'addicions successives. Se'ls ha incorporat KP (10%) pel mètode d'immersió i s'ha avaluat el seu

perfil d'alliberament a 150 mL d'una solució receptora de PBS, a 37°C, fent servir l'equip de dissolució automatitzat Vision Elite 8™, situant les mostres dels materials polimèrics porosos als cistells perforats (aparell II de la Farmacopea), sense cap tipus de membrana. Es van preparar sis replicats de cada tipus de material. A continuació es descriuen els perfils d'alliberació obtinguts pels diferents materials.

5.6.1. Alliberament de KP des de materials de PS-DVB

La **Figura 87** mostra els perfils d'alliberament obtinguts amb els sis replicats de monòlits de PS-DVB estudiats. Els sis replicats pertanyien a dos lots de fabricació diferents. Tots es van preparar a partir de l'emulsió PoliHIPRE2. A la llegenda de la figura s'indica el percentatge de KP adsorbit pels monòlits, que pot ser indicatiu de la porositat de la mostra. Com es pot observar, el percentatge de KP absorbit és força homogeni, oscil·lant entre un 49 i un 56%. Els perfils de cessió mostren una tendència creixent i a les 24 hores no s'ha assolit l'estat estacionari. L'alliberació és lenta i sostinguda. Depenent de la mostra assajada, a les 24 hores s'ha alliberat entre un 39 i un 70% del KP que contenia el material porós. Les diferències són considerables entre una mostra i una altra.

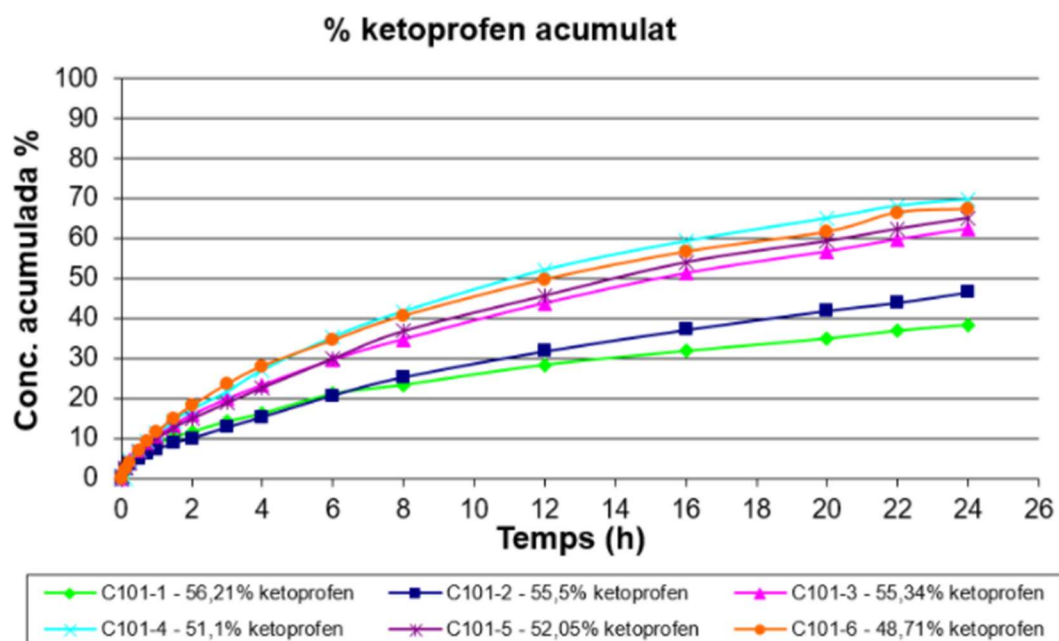


Figura 87. Perfil de cessió de KP des de sis replicats de materials porosos de PS-DVB preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE2, pertanyents a dos lots de fabricació diferents. A la llegenda s'indica el percentatge de KP absorbit per cada monòlit.

Si s'analitzen per separat les mostres que pertanyen als dos lots de fabricació diferents s'obtenen els perfils que es mostren a la **Figura 88** on s'han separat els perfils corresponents al primer (mostres 1, 2 i 3) i al segon lot de fabricació (mostres 4, 5 i 6).

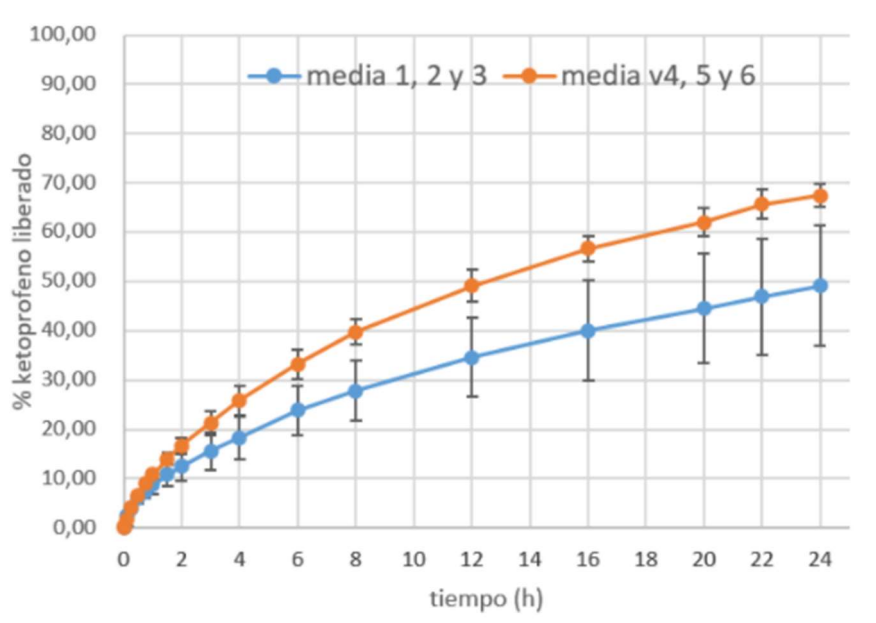


Figura 88. Perfil de cessió de KP des de materials porosos de PS-DVB preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE2, agrupats segons els lots de fabricació.

Es pot observar com els perfils que corresponen a les mostres del primer lot de fabricació (mostres 1, 2 i 3) presenten una variabilitat molt superior als del segon lot de fabricació (mostres 4, 5 i 6). Això es podria atribuir a que les mostres escollides fossin fragments irregulars o que l'agitació de l'emulsió no hagués sigut constant donant lloc a una gran polidispersitat de gotes i l'alliberament fos irregular: és a dir, les molècules de KP retingudes en mesoporus podrien presentar un alliberament més lent que les retingudes en macroporus o a la superfície. En canvi, les mostres del segon lot presenten un comportament molt uniforme. En els dos lots de fabricació, el perfil de la corba és molt similar.

5.6.2. Alliberament de KP des de materials de PAM

La **Figura 89** mostra els perfils d'alliberament obtinguts amb els sis replicats de monòlits de PAM estudiats. Els sis replicats pertanyen a dos lots de fabricació diferents. Tots es van preparar a partir de l'emulsió PoliHIPRE3. A la llegenda de la figura s'indica el percentatge de KP adsorbit pels monòlits, que pot ser indicatiu de la porositat de la mostra. Com es pot observar, el percentatge de KP absorbit és prou homogeni, oscil·lant entre un 42 i un 54% i lleugerament inferior a l'assolit amb els materials de PS-DVB. Els perfils de cessió mostren una tendència creixent i a les 24 hores pràcticament han assolit l'estat estacionari.

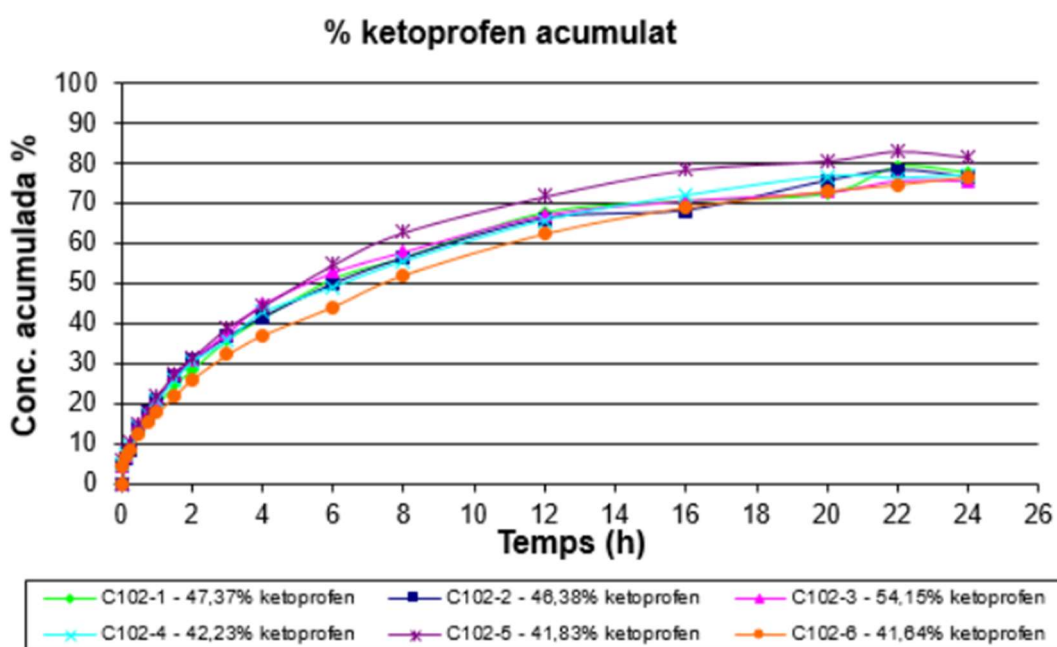


Figura 89. Perfil de cessió de KP des de sis replicats de materials porosos de PAM preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE3, pertanyents a dos lots de fabricació diferents. A la llegenda s'indica el percentatge de KP absorbit per cada monòlit.

L'alliberació no és tant lenta i sostinguda com amb els materials de PS-DVB. A les 24 hores totes les mostres han alliberat aproximadament el 80% del KP que contenia el material porós, un percentatge superior al del PS-DVB. Sembla que el KP queda menys retingut als materials de PAM que als de PS-DVB. A la **Figura 90** es pot veure la comparació entre els dos materials.

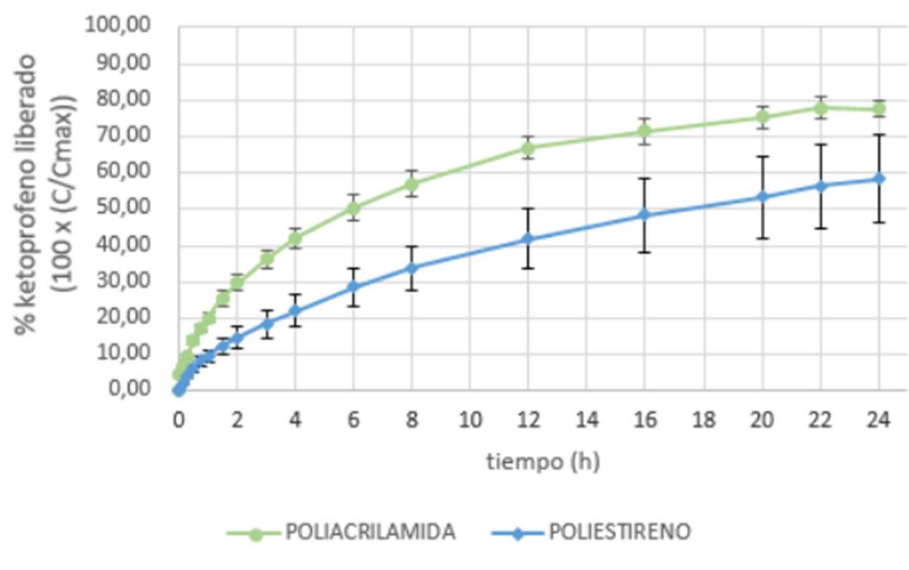


Figura 90. Comparació dels perfils de cessió de KP des de materials porosos de PS-DVB i PAM preparats a partir d'emulsions altament concentrades.

5.6.3. Alliberament de KP des de materials de QS

La **Figura 91** mostra els perfils d'alliberament obtinguts amb els sis replicats de monòlits de QS estudiats. Els sis replicats pertanyien a dos lots de fabricació diferents. Tots es van preparar a partir de l'emulsió PoliHIPRE4. A la llegenda de la figura s'indica el percentatge de KP adsorbit pels monòlits, que pot ser indicatiu de la porositat de la mostra. Com es pot observar, el percentatge de KP adsorbit no és homogeni, oscil·lant entre un 38 i un 80%. Els perfils de cessió mostren una tendència creixent, però més ràpida que amb els materials de PS-DVB i PAM. A les 24 hores sembla que en la majoria de les mostres s'ha assolit l'estat estacionari. Dependent de la mostra assajada, a les 24 hores s'ha alliberat entre un 70 i un 100% del KP que contenia el material porós. Les diferències són considerables entre una mostra i una altra.

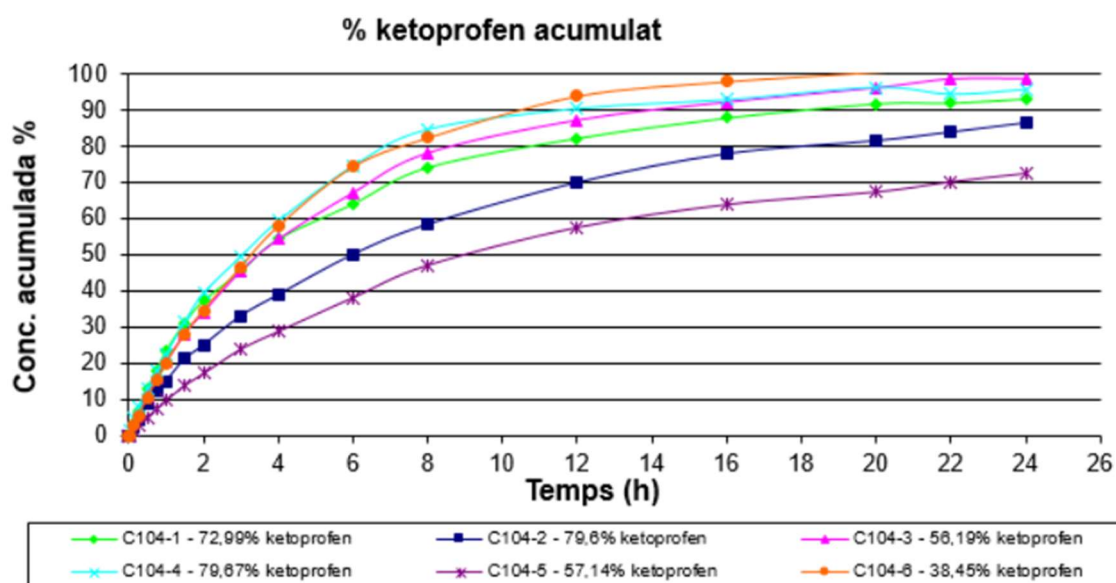


Figura 91. Perfil de cessió de KP des de sis replicats de materials porosos de QS preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE4, pertanyents a dos lots de fabricació diferents. A la llegenda s'indica el percentatge de KP absorbit per cada monòlit.

Malgrat les mostres, igual com amb els materials anteriors, pertanyien a dos lots de fabricació diferents, quan s'han analitzat els perfils d'alliberació en funció del lot de fabricació, no s'han observat diferències i la variabilitat es mantenia als dos lots. No obstant, quan es va fer la impregnació dels materials, es va observar una tonalitat blanca sobre alguns fragments d'escuma sòlida de QS, que és de color blau fosc (**Figura 92**). Aquest fet pot resultar indicatiu de què el KP no penetra suficientment a dintre del material porós i part es queda a la superfície. Això explicaria un alliberament ràpid del fàrmac que ha quedat en superfície i més lent del KP que ha penetrat a l'estructura porós, així com les diferències observades en el percentatge d'incorporació.



Figura 92. Aspecte d'un monòlit de QS després de la immersió en una solució hidroalcohòlica de KP.

5.6.4. Alliberament de KP des de materials de HA

La **Figura 93** mostra els perfils d'alliberament obtinguts amb els sis replicats de monòlits de HA estudiats. Els sis replicats pertanyien a dos lots de fabricació diferents. Tots es van preparar a partir de l'emulsió PoliHIPRE5. A la llegenda de la figura s'indica el percentatge de KP adsorbit pels monòlits, que pot ser indicatiu de la porositat de la mostra. Com es pot observar, el percentatge de KP absorbit no és homogeni, oscil·lant entre un 35 i un 47%. Els perfils de cessió mostren una tendència creixent, però més ràpida que amb els materials de PS-DVB, PAM i QS. A les 10-12 hores en la majoria de les mostres s'ha assolit l'estat estacionari i a les 24 hores s'ha alliberat el 100% del KP que contenia el material porós.

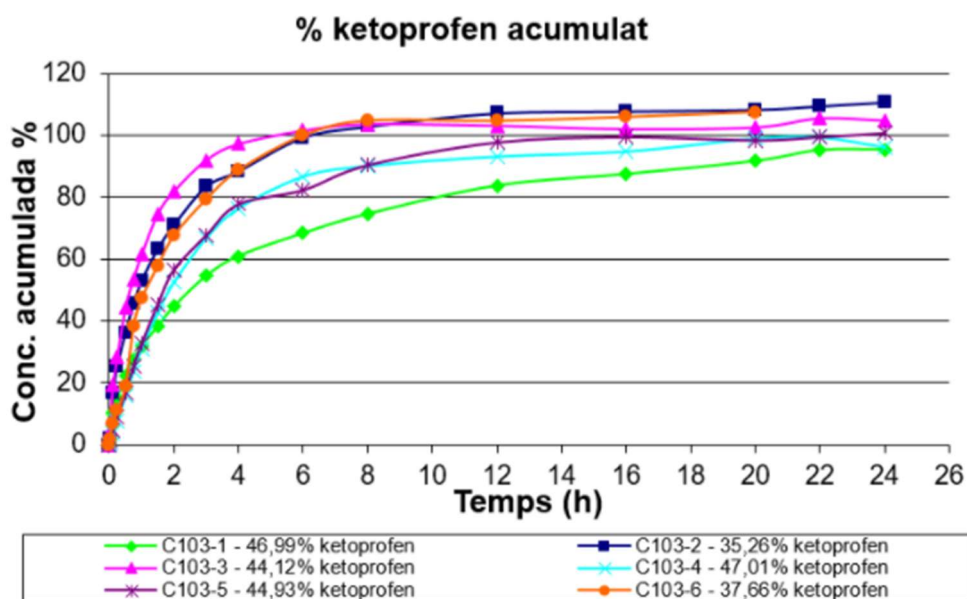


Figura 93. Perfil de cèssió de KP des de sis replicats de materials porosos d'HA preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE5, pertanyents a dos lots de fabricació diferents. A la llegenda s'indica el percentatge de KP absorbit per cada monòlit.

Els resultats obtinguts amb l'HA indiquen una baixa impregnació dels monòlits d'HA amb la solució de KP, en comparació amb els altres materials. Cal indicar que la impregnació d'aquestes escumes sòlides s'ha fet pel mètode de degoteig degut a la fragilitat dels materials que no permetia la immersió, ja que s'hauria trencat l'estructura abans de poder ubicar-los al cistell perforat per realitzar l'assaig de cèssió. Aquesta fragilitat no hauria de ser un obstacle per a la permeació de la solució de KP. No obstant, l'alliberament ha estat molt ràpid, el que indica que el principi actiu no ha quedat gaire retingut a l'estructura porosa de l'HA. Aquestes dades contrasten amb les obtingudes prèviament per Roig (Roig, Hidrogels i materials porosos d'àcid hialurònic entrecreuat com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs (Tesi doctoral), 2016) amb uns materials d'HA similars, amb els que es va aconseguir retenir el principi actiu amb una cinètica d'alliberament d'ordre zero. Les diferències observades es podrien atribuir bé a la manca d'exactitud amb el mètode d'incorporació per degoteig, a les característiques de l'emulsió formada, que estava al límit de les emulsions altament concentrades amb només un 75% de fase interna o a la variabilitat en l'estructura de l'emulsió, que depèn del mètode de preparació. Caldria fer nous estudis que ens permetin corroborar aquests resultats.

5.7. Influència de la funcionalització dels materials de PS-DVB mitjançant tecnologia de plasma

Alguns discs de PS-DVB es van funcionalitzar mitjançant un tractament amb plasma atmosfèric de baixa temperatura. Aquest tractament pot modificar les propietats físiques i químiques de la superfície dels materials, incrementant el seu caràcter hidròfil. Quan aquests materials es van observar per microscòpia electrònica (SEM) es van constatar modificacions en la topografia (**Figura 61** de l'apartat 3.1 de Resultats), però no es van observar variacions en quant a la incorporació de KP en els materials tractats amb plasma (apartat 4 de Resultats). Es van comparar els perfils d'alliberament de materials de PS-DVB, preparats pel mètode PIT a partir de l'emulsió PoliHIPRE1, impregnats amb una solució de KP al 2% amb els dels mateixos materials tractats amb plasma atmosfèric durant diferents intervals de temps (10 s, 1 min, 5 min i 10 min). Per fer aquest estudi, les mostres de monòlit es van introduir en bosses de diàlisi d'acetat de cel·lulosa. La **Figura 95** mostra el perfil de cessió dels monòlits no tractats i dels materials tractats amb plasma atmosfèric a diferents temps.

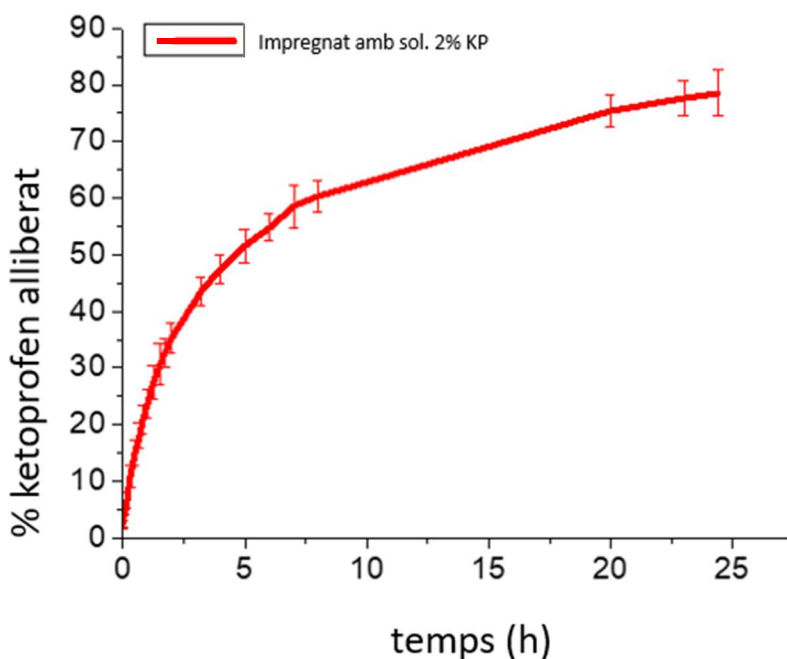


Figura 94

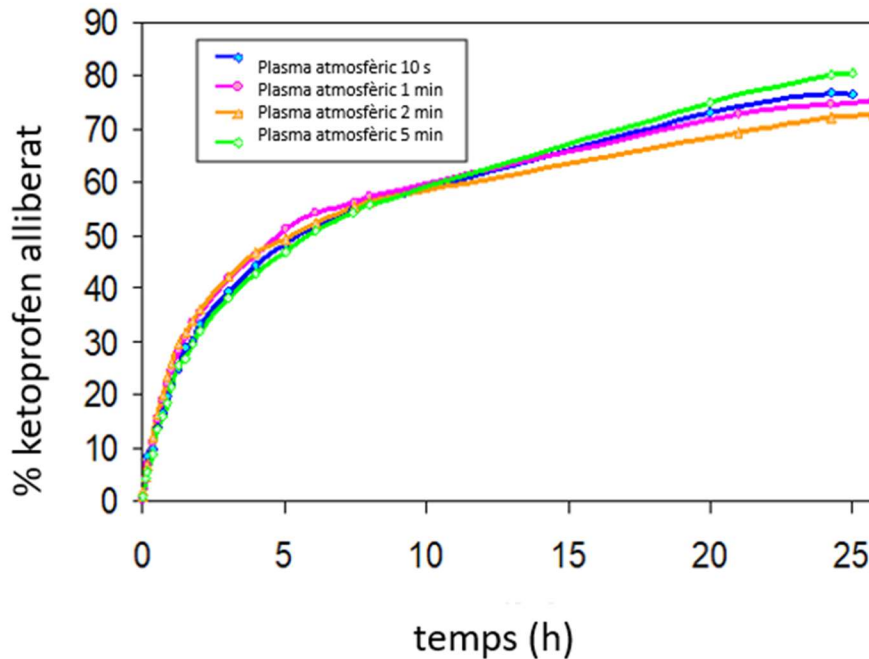


Figura 95. Perfil de cessió de KP des de materials porosos de PS-DVB preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE1 pel mètode PIT, sense cap tractament o tractats amb plasma atmosfèric a diferents temps.

Amb els materials no tractats, s'ha alliberat un 50% del KP a les 5 hores i el 80% a les 24 hores des de l'inici de l'estudi. Amb els materials tractats amb plasma, s'ha assolit el 80% de l'alliberament del KP a les 24 hores, sense que es puguin observar diferències significatives. Per tant, es pot afirmar que el tractament amb plasma, malgrat ha augmentat la hidrofília de la superfície dels materials de PS-DVB no ha afectat significativament a la incorporació i cessió de KP, fet que demostra que la captació i cessió depèn més de l'estructura en profunditat dels materials que de l'augment de la hidrofília en uns quants nanòmetres a la superfície. És possible que si la solució d'impregnació fos aigua en lloc d'una solució hidroalcohòlica es podrien veure diferències més importants, perquè la humectabilitat dels materials es veuria més afectada.

5.8. Influència de la concentració de principi actiu

Es va estudiar la influència de la concentració de principi actiu en la solució d'impregnació dels monòlits en el perfil d'alliberament. Per això es van preparar monòlits de PS-DVB i es van impregnar amb solucions de diferents concentracions de KP i de CLIN (2, 5 i 10%) i es va estudiar l'alliberament des de bosses de diàlisi. La **figura 96** mostra els perfils d'alliberament obtinguts per al KP.

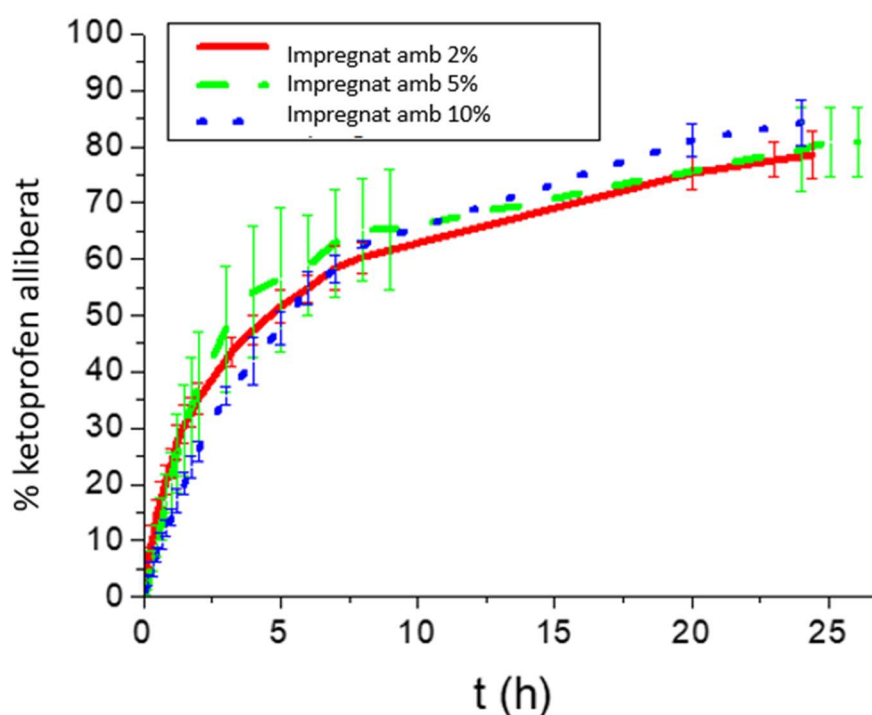


Figura 96. Perfil de cèssió de KP des de materials porosos de PS-DVB preparats a partir de l'emulsió PoliHIPRE1 pel mètode PIT, impregnats amb solucions amb diferents concentracions de KP (2, 5 i 10%).

A l'apartat 4 de Resultats s'ha mostrat la diferent impregnació dels monòlits de PS-DVB quan s'utilitzaven solucions de fàrmac amb diferents concentracions, augmentant considerablement la dosi de fàrmac incorporada als monòlits quan es partia d'una solució d'impregnació més concentrada. No obstant, els resultats de cèssió no sembla que estiguin influenciats per aquest fet, ja que com es pot observar a la **Figura 96** per al KP, els perfils de cèssió pràcticament es superposen i no es veu cap influència de la

concentració inicial. És a dir, els monòlits impregnats amb una solució del 10% de KP contenen més KP però el percentatge cedit no és diferent del percentatge cedit quan hi ha una dosi menor de KP al monòlit. Resultats similars s'han observat amb la CLIN i la **Figura 97** mostra la comparació entre el percentatge de fàrmac cedit a les 24 hores des de monòlits de PS-DVB impregnats amb solucions de KP o de CLIN amb diferents concentracions de fàrmac (2, 5 i 10%).

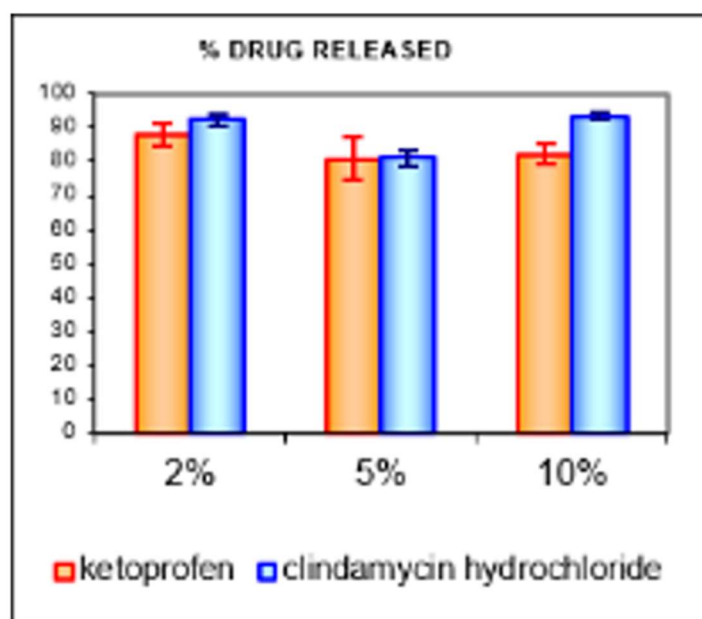


Figura 97. Comparació del percentatge de KP i CLIN cedits a les 24 hores, a partir de monòlits de PS-DVB impregnats amb solucions de KP i de CLIN amb diferents concentracions de fàrmac (2, 5 i 10%).

Com s'observa a la **Figura 97**, les diferències en els resultats són independents de la concentració de KP o de CLIN a la solució d'impregnació o, el que és el mateix, de la dosi de principi actiu present al monòlit.

CONCLUSIONS

S'han preparat materials porosos de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), poliacrilamida (PAM), quitosan (QS) i àcid hialurònic (HA), fent servir emulsions altament concentrades com a plantilla. Els materials porosos obtinguts es poden definir com a escumes macroporoses de molt baixa densitat.

S'han preparat materials porosos de PS-DVB i poliacrilamida (PAM) mitjançant la polimerització de monòmers incorporats a la fase contínua d'emulsions altament concentrades W/O i O/W, respectivament. Els materials obtinguts conserven l'estructura de l'emulsió, són majoritàriament macroporosos, amb més d'un 90% de porositat, i tenen una baixa densitat.

S'han preparat materials porosos de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB), partint d'emulsions altament concentrades W/O preparades pel mètode PIT o pel mètode de les addicions successives. Les diferents característiques de les emulsions i dels materials obtinguts han permès comprovar que les emulsions efectivament han servit de plantilla per a l'estructura porosa dels materials, obtenint-se porus més petits i homogenis quan les emulsions es preparen pel mètode PIT. És possible augmentar la hidrofília de la superfície d'aquests materials hidrofòbics amb un tractament amb plasma atmosfèric a baixa temperatura.

S'han preparat materials porosos de quitosan (QS) i d'àcid hialurònic (HA) mitjançant la incorporació dels polímers preformats a la fase contínua d'emulsions altament concentrades O/W i la posterior reacció d'entrecruament amb genipina i BDDE respectivament. Els materials obtinguts conserven l'estructura de l'emulsió que ha servit de plantilla, són majoritàriament macroporosos i tenen una baixa densitat.

Les escumes sòlides que s'han format per polimerització de monòmers a la fase contínua de l'emulsió altament concentrada, materials de PS-DVB i PAM, tenen una estructura més compacta i els porus són més ordenats i interconnectats. Quan es produeix la polimerització en un sistema col·loidal compartimentat, la reacció té lloc d'una manera més ordenada i les estructures que es formen tenen un grau d'ordenació més elevat.

Els resultats de porosimetria han evidenciat la possibilitat de modificar les característiques dels materials porosos, mida de por i superfície específica, mitjançant canvis en la mida de gota de l'emulsió de partida, per canvis en la composició o en el mètode de preparació.

Els resultats obtinguts en l'estudi dels mètodes d'incorporació de principis actius als monòlits van permetre comprovar que es podia realitzar una impregnació eficient, uniforme i en profunditat dels monòlits hidròfobs de PS-DVB i QS pel mètode d'immersió en una solució hidroalcohòlica d'aigua/etanol (1:1, p/p). El mètode de degoteig es va reservar pels materials d'HA degut a la seva fragilitat. També es va comprovar com les solucions més concentrades en principi actiu permetien la incorporació de quantitats més elevades de fàrmac.

La posada a punt d'una metodologia per a la presa de mostres de manera automàtica amb l'equip de dissolució ha permès establir les condicions per un mostreig fiable i reproduïble, per realitzar els assaigs d'alliberament de fàrmacs des dels materials polimèrics. L'automatització de l'equip ha permès assajar varies mostres simultàniament i obtenir resultats més fiables. Els dispositius basats amb bossa de diàlisi, cel·la d'immersió i cistell perforat (mètode 1 de la Real Farmacopea Española) són adequats per avaluar la cessió de principis actius des de materials porosos polimèrics fins una solució receptora; no obstant, aquest darrer mètode té l'avantatge de que l'alliberament es realitza directament a la solució receptora sense interferència de cap membrana i és el més adient per comparar diferents materials o diferents principis actius.

Les escumes sòlides hidròfobes de PS-DVB produeixen un alliberament retardat de fàrmacs lipòfils com el ketoprofèn i afecten en menor grau a la cessió de fàrmacs hidròfils com el clorhidrat de clindamicina i el sulfat de salbutamol, que queden menys retinguts pel material porós. El retard en l'alliberament de KP des dels materials hidròfobs és molt significatiu en comparació amb formes sòlides orals comercialitzades d'aquest mateix principi actiu.

La retenció dels fàrmacs pels materials porosos estudiats està influenciada per l'estructura de l'emulsió que ha fet de plantilla perquè condiciona la morfologia de l'estructura porosa, per la composició dels materials porosos i la seva afinitat pels principis actius incorporats i per la rigidesa o fragilitat dels materials, que condiciona els mètodes per a la seva impregnació. Considerar aquestes característiques permetrà modular les propietats de les escumes sòlides per adaptar-les als perfils de cessió més adequats per cada principi actiu.

BIBLIOGRAFIA

Bibliografía

- Abbas, S., Schaalán, M., Bahgat, A., & El-Denshary, E. (2014). Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats. *Sci. World Journal*, , 1-9.
- Abbasi, N., Hamlet, S., Love, R., & Nguyen, N.-T. (2020). Porous Scaffolds for Bone Regeneration. *Journal of Science Advanced Materials and Devices* 5 (1), 1-9.
- AEMPS. (2011). *Real Farmacopea Española, 4a ed.* Madrid: Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad.
- AEMPS. (diciembre / 2020). *Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (www.aemps.gob.es)* . Recollit de Centro de información online de medicamentos de la AEMPS - CIMA: <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
- Ahuja, G., & Pathak, K. (2009). Porous Carriers for Controlled/Modulated Drug Delivery . *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 71 (6), 599-607.
- Alam, M., Miras, J., Pérez-Carrillo, L., Vílchez, S., Solans, C., Imae, T., . . . Esquena, J. (2013). Facile synthesis of dual micro/macroporous carbonaceous foams by templating in highly concentrated water-in-oil emulsions. *Microporous and Mesoporous Materials*, 182, 102-108.
- Alexandridis, P., & Hatton, T. (1995). Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling . *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96, 1-46.
- Allen, T., & Curtis, P. (2004). Drug delivery systems: Entering the mainstream. *Science* 303, 1818-1822.
- Alvebratt, C., Cheung, O., Stromme, M., & Bergstrom, C. (2018). A modified in situ method to determine release from a complex drug carrier in particle-rich suspensions. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 19(7), 2859–2865.
- Arvidson, N., Gudbjornsson, B., Elfman, L., Ryden, A., Totterman, T., & Hallgren, R. (1994). Circadian rhythm of serum interleukin-6 in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 53 (8), 521-524.
- Arzhavitina, A., & Steckel, H. (2010). Foams for pharmaceutical and cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics* 394, 1-17.
- Attwood, E. (2018). Disperse systems. A M. Aulton, & K. Taylor, *Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, 5a ed* (p. 60-92). Edinburgh: Elsevier.

- Auriemma, G., Del Gaudio, P., Barba, A., d'Amore, M., & Aquino, R. (2001). A combined technique based on prilling and microwave assisted treatments for the production of ketoprofen controlled release dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 415 (1-2), 196-205.
- Babaie, E., & Bhaduri, S. (2018). Fabrication Aspects of Porous Biomaterials in Orthopedic Applications: A Review. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (1), 1-39.
- Balazs, E., Laurent, T., & Jeanloz, R. (1986). Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochem. J.*, 235, 903.
- Baldrick, P. (2010). The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 56 , 290-299.
- Barby, D., & Haq, Z. (. (1982). *Europa Patent núm. 0060138*.
- Barret, E., Joyner, J., & Halenda, P. (1951). The determination of pore volume and Area distributions in porous substances I. Computations from Nitrogen Isotherms . *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 373-380.
- Bartl, V. (1962). Uber die polymerisation in umgekehrter emulsion. *Macromolecular Chemistry and Physics* 57, 74-95.
- BASF. (2008). Información técnica Poloxamer.
- BASF. (20 / 11 / 2020). *Kolliphor® RH40*. Recollit de <https://pharmaceutical.basf.com/global/en/drug-formulation/products/kolliphor-rh40.html>
- Berg, J. (1993). *Wettability (Surfactant Science Series, Vol. 49)*. New York : Marcel Dekker.
- Bhattarai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 83-99.
- Blin, J., Bleta, R., Ghanbaja, J., & Stébé, M. (2006). Fluorinated emulsions: Templates for the direct preparation of macroporous-mesoporous silica with a highly ordered array of large mesopores. *Microporous and Mesoporous Materials* 94, 74-80.
- Bonilla, P., Arias, E., Solans, C., & García-Celma, M. (2018). Influence of crosslinked alginate on drug release from highly concentrated. *Colloids and Surfaces A* 536, 148-155.
- Brady, J., Dürig, T., Lee, P., & Li, J. (2017). Polymer Properties and Characterization. A Y. C. Y. Qiu, *Developing Solid Oral Dosage Forms (Second Edition)*. *Pharmaceutical Theory and Practice* (p. 181-223). Amsterdam: Elsevier.

- Brandt, F., & Cazzaniga, A. (2008). Hyaluronic acid gel fillers in the management of facial aging. *Clin. Interv. Aging*, 3 (1), 153-159.
- Brunauer, S., Emmett, P., & Teller, E. (1938). Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.*, 60 (2), 309-319.
- Brunner, E. (1904). Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z Phys Chem*, 47, 56-102.
- Calderó, G., Patti, A., Llinàs, M., & García-Celma, M. (2012). Diffusion in highly concentrated emulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 17, 255-260.
- Cameron, N., Krajnc, P., & Silverstein, M. (2011). Colloidal templating. A M. Silverstein, N. Cameron, & M. Hillmyer, *Porous Polymers* (p. 119-172). New York: John Wiley & Sons.
- Canal, C., Aparicio, R., Vílchez, A., Esquena, J., & García-Celma, M. (2012). Drug delivery properties of macroporous polystyrene solid foams. *Journal Pharm Pharmaceutical Sci* 15 (1), 197-207.
- Canal, C., Aparicio, R., Vílchez, A., Esquena, J., Molina, R., Erra, P., & García-Celma, M. (2008). Macroporous solid foams prepared from highly concentrated emulsions: Preliminary studies of drug delivery (Poster Communication). *Nanomedicine 2008 - ESF-UB Conference in Biomedicine*. Girona.
- Canal, C., Gaboriau, F., Vílchez, A., & Erra, P. (2009). Topographical and Wettability Effects of Post-Discharge Plasma Treatments on Macroporous Polystyrene-Divinylbenzene Solid Foams. *Plasma Process. Polym.*, 6, 686–692.
- Carbone, C., Rende, P., Comberiat, P., Carnovale, D., Mammi, M., & De Sarro, G. (2013). The safety of ketoprofen in different ages. *J Pharmacol Pharmacother*. 4(Suppl1), S99-S103.
- Ceglia, G., Merlin, A., Viot, O., Schmitt, V., & Mondain-Monval, O. (2014). Porous materials with tunable mechanical properties. *Journal of Porous Materials* 21, 903-912.
- Cervantes-Martinez, V., Emo, M., García-Celma, M., Stébé, M., & Blin, J. (2019). Morphosynthesis of porous silica from biocompatible templates. *Chemical Engineering Research and Design* 151, 179-189.
- Chang, E., Galvez, M., Glotzbach, J., Hamou, C., El-ftesi, S., Rappleye, C., . . . Gurtner, G. (2011). Vascular anastomosis using controlled phase transitions in poloxamer gels. *Nature Medicine*, 17, 1147–1152.

- Chang, W., C. Y., Lai, P., & Sung, H. (2003). A Genipin-Crosslinked Gelatin Membrane as Wound-Dressing Material: in vitro and in vivo Studies. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.*, *14*, 481-495.
- Chemaxon. (29 / 11 / 2020). *CHEMAXON.COM*. Recollit de CHEMAXON.COM: https://chemaxon.com/products/calculators-and-predictors#logp_logd
- Chen, J., Wang, C., Lu, S., Wu, J., Guo, X., Duan, C., . . . Li, D. (2005). In vivo chondrogenesis of adult bone marrow-derived autologous mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Research* *319*, 429-438.
- Chen, W., & Abatangelo, G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound repair and Regeneration*, *7* (2), 79-89.
- Chen, Y., Gao, Z., & Duan, J. (2017). Dissolution Testing of Solid Products. *Pharmaceutical Theory and Practice*, 2a ed. A Y. Qiu, Y. Chen, G. Zhang, L. Yu, & R. Mantri, *Developing Solid Oral Dosage Forms* (p. 355-380). Amsterdam: Elsevier.
- Cherry, N., & Gautrin, D. (1990). Neurotoxic effects of styrene: further evidence. *British Journal of Industrial Medicine*. *47* (1), 29-37.
- Cheung, R., Ng, T., Wong, J., & Chan, W. (2015). Chitosan: An update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*, *13* (8), 5156-5186.
- Ciesla, U., & Schüth, F. (1999). Ordered mesoporous materials. *Microporous and Mesoporous Materials* *27* (2-3), 131-149.
- Convention, T. U. (2020). *USP 43-NF 38*. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention.
- Couvreur, P. (2013). Nanoparticles in drug delivery: Past, present and future. *Advanced Drug Delivery Reviews* *65*, 21-23.
- D. H. James, W. M. (2005). Styrene. A A. Ullmann, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Willey-VCH.
- Del Gaudio, P., Russo, P., Lauro, M., Colombo, P., & Aquino, R. (2009). Encapsulation of ketoprofen and ketoprofen lisinate by prilling for controlled drug release. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* *10* (4), 1178-1185.
- Diamond, N., Casarella, W., Bachman, D., & Wolff, M. (1979). Microfibrillar collagen hemostat: a new transcatheter embolization agent. *Radiology* *133*, 775-779.
- Doillon, C., Silver, F., & Berg, R. (1987). Fibroblast growth on a porous collagen sponge containing hyaluronic acid and fibronectin. *Biomaterials* *8*, 195-200.

- Domínguez-Gil, A., & Martín, A. (2004). Avances en Tecnología farmacéutica. En C. Avendaño, & J. Tamargo, *Nuevos avances en medicamentos* (págs. 57-121). Madrid: Religraf, S.A.
- Dosio, F., Arpicco, S., Stella, B., & Fattal, E. (2016). Hyaluronic acid for anticancer drug and nucleic acid delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97, 204-236.
- DOW . (2006). *Ficha técnica Tergitol L surfactants*.
- Drugbank. (29 / 11 / 2020). *Drugbank*. Recollit de Drugbank: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT001163>
- EDQM. (2019). *Farmacopea Europea, 10a ed.* Bruselas: Consejo de Europa.
- Elder, D. (2005). Pharmaceutical applications of ion exchange resins. *J Chem Educ* 82, 575-587.
- Entwistle, J., Hall, C., & Turley, E. (1996). HA receptors: Regulators of signalling to the cytoskeleton. *Journal of Cellular Biochemistry*, 61 (4), 569-577.
- Erweka. (13 / 11 / 2020). www.erweka.com. Recollit de <https://www.erweka.com/fully-automated-robodis-ii.html#>
- Esquena, J., & Solans, C. (2006). Highly concentrated emulsions as templates for solid foams. A J. Sjöblom, *Emulsions and Emulsion Stability* (p. 245-262). Boca Raton: Taylor & Francis.
- Esquena, J., Sankar, G., & Solans, C. (2003). Highly concentrated W/O emulsions prepared by the PIT method as templates for solid foams. *Langmuir* 19, 2983-2988.
- Esquena, J., Sankar, R., & Solans, C. (2003). Highly Concentrated W/O Emulsions Prepared by the PIT Method as Templates for Solid Foams. *Langmuir* 19, 2983-2988.
- European Chemicals Bureau. (2002). *EU Risk Assessment – Acrylamide* . Luxemburg: European Commission.
- Fagerlund, G. (1973). Determination of specific surface by the BET method. *Materiaux et Construction* 6 (3), 239-245.
- Ferreira, L., Vidal, M., & Gil, M. (2001). Design of a Drug-Delivery System Based On Polyacrylamide Hydrogels. Evaluation of Structural Properties. *Chem. Educator*, 6, 100-103.
- Fornaguera, C., Dols-Pérez, A., Calderó, G., García-Celma, M., 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.
- Fraser, J., Laurent, T., & Laurent, U. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 242, 27-33.
- Gao, Z., Moore, T., Smith, A., Doub, W., & Westenberger, B. (2007). Studies of variability in dissolution testing with USP apparatus 2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 96 (7), 1794-1801.
- Gawel, M., Librowski, T., & Lipkowska, A. (2013). Influence of zinc hydroaspartate on the antiinflammatory and gastric activity of ketoprofen in rats. *Pharmacol. Rep.*, 65 (1), 214-219.
- Gray, V. (2018). Power of the dissolution test in distinguishing a change in dosage form critical quality attributes. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 19(8), 3328-3332.
- Grenga, T., Zins, J., & Bauer, T. (1989). The rate of vascularization of coralline hydroxyapatite. *Plas Reconstr. Surg.* 84, 245-249.
- Grill, A. (1994). *Cold Plasma in Materials Fabrication, From Fundamentals to Applications*. Piscataway, NJ: Wiley-IEEE Press.
- Guo, X., Chang, R., & Hussain, M. (2009). Ion-exchange resins as drug delivery carriers. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98, 3886-3902.
- Hammad, H., Hammad, M., Abdelhadi, I., & Khalifeh, M. (2011). Effects of topically applied agents on intra-oral wound healing in a rat model: a clinical and histomorphometric study. *International Journal of Dental Hygiene*, 9 (1), 9-16.
- Han, X., Li, Z., Sun, J., Luo, C., Li, L., Liu, Y., . . . He, Z. (2015). Stealth CD44-targeted hyaluronic acid supramolecular nanoassemblies for doxorubicin delivery: Probing the effect of uncovalent pegylation degree on cellular uptake and blood long circulation. *Journal of Controlled Release*, 197, 29-40.
- Hartmann, M. (2005). Ordered Mesoporous Materials for Bioadsorption and Biocatalysis Chem. Mater.,. *Chem. Mater.* 17, 4577-4593.
- Harvey, S., & Osol, A. (1980). *Remington's Pharmaceutical Sciences*. Easton PA: Mack Publishing Company.
- Hedberg, E., Shih, C., Lemoine, J., Timmer, M., Liebschner, M., & J. J. (2005). In vitro degradation of porous poly(propylene fumarate)/poly(DLlactic-coglycolic acid) composite scaffolds. *Biomaterials* 26, 3215-3225.
- Inkson, B. (2016). Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization. A G. Huebschen, I. Altpeter, R.

- Tschuncky, & H. Herrmann, *Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods* (p. 17-43). Cambridge: Elsevier.
- Islam, S., Bhuiyan, M., & Islam, M. (2017). Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J. Polym. Environ.*, 25 (3), 854-866.
- Kaemmerlen, A., Vo, C., Asllanaj, F., Jeandel, G., & Baillis, D. (2010). Radiative properties of extruded polystyrene foams: Predictive model and experimental results. *J. Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 111, 865–877.
- Kamari, Y., & Ghiaci, M. (2016). Preparation and characterization of ibuprofen/modified chitosan/TiO₂ hybrid composite as a controlled drug-delivery system. *Microporous Mesoporous Mater.*, 234, 361-369.
- Kang, M., Jung, R., Kim, H.-S., & Jin, H.-J. (2008). Preparation of Superhydrophobic Polystyrene Membranes by Electrospinning. *Colloids Surf. A*, 313-314, 411-414.
- Kantor, T. (1986). Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties. *Pharmacotherapy* 6(3), 93-103.
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 26, 5474–5491.
- Kashirina, A., Yao, Y., Liu, Y., & Leng, J. (2019). Biopolymers as bone substitutes: a review. *Biomaterials Science UK* 7 (10), 3961-3983.
- Kim, H., Knowles, J., & Kim, H. (2004). Hydroxyapatite/poly([epsilon]-caprolactone) composite coatings on hydroxyapatite porous bone scaffold for drug delivery. *Biomaterials* 25, 1279–1287.
- Kim, S. (2018). Competitive Biological Activities of Chitosan and Its Derivatives: Antimicrobial, Antioxidant, Anticancer, and Anti-Inflammatory Activities. *International Journal of Polymer Science*, 13. doi:1708172
- Klein, S. (2019). Advancements in Dissolution Testing of Oral and Non-oral Formulations. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 20, 266.
- Kogevinas, M., Gwinn, W., Kriebel, D., Phillips, D., Sim, M., Bertke, S., . . . Hemminki, K. (2018). Carcinogenicity of quinoline, styrene, and styrene-7,8-oxide. *The Lancet Oncology*, 19 (6), 728-729.
- Kovács, A., Petró, E., Erős, I., & Csóka, I. (2014). The role of dissolution in quality control. *Periodica Polytechnica*, 58(Sup), 17-20.
- Kretz, J., & Wong-Moon, K. (2013). *Dissolution Technol*, 20(2), 33-37.

- Kukura, J., Arratia, P., Szalai, E., & Muzzio, F. (2003). Engineering Tools for Understanding the Hydrodynamics of Dissolution Tests. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29 (2), 231-239.
- Kunieda, H., & Shinoda, K. (1985). Evaluation of the hydrophile-lipophile balance (HLB) of nonionic surfactants. I. Multisurfactant systems. *Journal of Colloid and Interface Science* 107, 107-121.
- Kunieda, H., Fukui, Y., Uchiyama, H., & Solans, C. (1996). Spontaneous formation of highly concentrated water-in-oil emulsions (gel-emulsions). *Langmuir* 12, 2136-2140.
- Kunieda, H., Solans, C., Shida, N., & Parra, J. (1987). The formation of gel-emulsions in a water/Nonionic Surfactant/Oil System. *Colloids and Surfaces* 24, 225-237.
- Kurahashi, M., Kanamori, K., Takeda, K., Kajib, H., & Nakanishia, K. (2012). Role of block copolymersurfactant on the pore formation in methylsilsesquioxane aerogel systems. *RSC Advances*, 2 (18), 7166-7173.
- Laurent, U., & Reed, R. (1991). Turnover of hyaluronan in tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 7 (2), 237-256.
- Li, J., & Mooney, D. (2016). Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater* 1(12), 1-38.
- Li, J., Cai, C., Li, J., Li, J., Li, J., Sun, T., . . . Yu, G. (2018). Chitosan-Based Nanomaterials for Drug Delivery. *Molecules*. 23(10), 2661.
- Liao, S., Cui, F., Zhang, W., & Feng, Q. (2004). Hierarchically biomimetic bone scaffold materials: nano-HA/collagen/PLA composite. *J Biomed Mater Res* 69B, 158-165.
- Liebert, M. (1991). Final Report on the Safety Assessment of Polyacrylamide. *Journal of the American College of Toxicology*, 10 (1), 193-203.
- Liversidge, G. (1981). Ketoprofen. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 10, 443-471.
- Long, C., Tang, K., Chokshi, H., & Fotaki, N. (2019). Surface dissolution UV imaging for investigation of dissolution of poorly soluble drugs and their amorphous formulation. *AAPS PharmSciTech*. *AAPS Pharm Sci Tech.*, 20(3), 113.
- Mann, J., & Pygall, S. (2012). A Formulation Case Study Comparing the Dynamic Gastric Model with Conventional Dissolution Methods. *Dissolution Technologies*, 19 (4), 14-19.
- Manzano, M., Colilla, M., & Vallet-Regí, M. (2009). Drug delivery from ordered mesoporous matrices. *Expert Opin Drug Deliv* 6 (12), 1383-1400.

- Mason, G. (1988). Determination of the pore-size distributions and pore-space interconnectivity of vitor porous glass and adsorption-desorption hysteresis capillary condensation isotherms. *Proceedings of the Royal Society of London, Seies A, Mathematical and Physical Sciences 415 (1849)*, 453-486.
- Masuko, K., Murata, M., Yudoh, K., Kato, T., & Nakamura, H. (2009). Anti.inlammatory effects of hyaluronan in arthritis therapy. Not just for viscosity. *International Journal of General Medicine*, 2, 77-81.
- McAllister, M. (2010). Dynamic Dissolution: A Step Closer to Predictive Dissolution Testing? *Molecular Pharmaceutics*, 7 (5), 1374-1387.
- Medicines Complete © Royal Pharmaceutical Society. (19 / may / 2020). *Medicines Complete*. Recollit de Pharmaceutical Excipients: <https://www-medicinescomplete-com.sire.ub.edu/#/content/excipients/1001941688>
- Memon, J., & Pathan, A. (2008). Efficiency of Cd(II) removal from aqueous media by using chemically modified polystyrene foam. *European Polymer Journal* 44, 1501-1511.
- Merck. (2015). *Ficha de datos de seguridad. Divinilbenceno*.
- Merck. (2017). *Fitxa de dades de seguretat. Estirè*.
- MERCK. (2018). *Ficha de datos de seguridad. Acrilamida*.
- MERCK. (2019). *Ficha de datos de seguridad Poly(ethylene glycol)-block-poly(propyleneglycol)-block-poly(ethylene glycol)*.
- MERCK. (2020). *Ficha de datos de seguridad Pluronic F127*.
- Merck. (2020). *Ficha técnica Genipina*.
- MERCK. (2020). *Fitxa tècnica Polystyrene*.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. (2015). *Real Farmacopea Española: Publicada por el Ministerio de Sanidad y Consumo, por mandato de la Ley 25/1990, de 20 de diciembre, del Medicamento (5a. ed.)*. Madrid: Boletín Oficial del Estado.
- Miras, J., Vílchez, S., Solans, C., & Esquena, J. (2013). Chitosan macroporous foams obtained in highly concentrated emulsions as templates. *J. Colloid Interface Sci.*, 410, 33-42.
- Molina, R., Vílchez, A., Canal, C., & Esquena, J. (2009). Wetting properties of polystyrene/divinylbenzene crosslinked porous polymers obtained using W/O highly concentrated emulsions as templates. *Surf. Interface Anal.*, 41(5), 371-377.

- Montoya, N. (2013). *Síntesis, caracterización y evaluación de una resina de intercambio catiónico con forma de empaque para una columna de destilación reactiva. Tesis doctoral*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia .
- Muzzarelli, R. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9.
- Muzzarelli, R., El Mehtedi, M., Bottegoni, C., Aquili, A., & Gigante, A. (2015). Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone. *Marine Drugs*, 13, 7314-7338.
- Nernst, W. (1904). Theorie der Reaktionsgeschwindigkeit in heterogenen Systemen. *Z Phys Chem*, 47, 52.
- Noyes, A., & Whitney, W. (1897). The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc*, 19, 930-934.
- O'Brien, F., Harley, B., Waller, M., Yannas, I., Gibson, L., & Prendergast, P. (2007). The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technol Health Care* 15 (1), 3-17.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). (2004). *Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*. Paris: OECD.
- Ozawa, K., Solans, C., & Kunieda, H. (1997). Spontaneous formation of Highly Concentrated Water-in-oil emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 188, 275-281.
- Pek, Y., Gao, S., Mohamed Arshad, M., Leck, K.-J., & Ying, J. (2008). Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* 29, 4300–4305.
- Peppas, N. (2013). Historical perspective on advanced drug delivery: How engineering and mathematical modeling helped the field mature. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 5-9.
- Peppas, N., & Hoffman, A. (2013). Hydrogels. A A. H. B.D. Ratner, *Biomaterials Science: An introduction to materials in medicine, 3a ed* (p. 166-178). Oxford: Academic Press.
- Perut, F., Montufar, E., Ciapetti, G., Santin, M., Salvage, J., Traykova, T., . . . Baldini, N. (2011). Novel soybean/gelatine-based bioactive and injectable hydroxyapatite foam: Material properties and cell response. *Acta Biomaterialia* 7, 1780–1787.
- Pitto-Barry, A., & Barry, N. (2014). Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. *Polymer Chemistry*, 5, 3291-3297.

- Pizzoccaro-Zilamy, M., Huiskes, C., Keim, E., Sluijter, S., van Veen, H., Nijmeijer, A., . . . Luiten-Olieman, M. (2019). New Generation of Mesoporous Silica Membranes Prepared by a Stöber-Solution Pore-Growth Approach. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11, 18528–18539.
- Podlogar, F., Rogac, M., & Gasperlin, M. (2005). The effect of internal structure of selected water-Tween 40-Inwitor 308-IPM microemulsions on ketoprofen release. *International Journal of Pharmaceutics*, 302, 68-77.
- Pons. (1993). aaa; bbb; ccc.
- Pons, R., Ravey, J., Sauvage, S., Stébé, M., Erra, P., & Solans, C. (1993). Structural studies on gel emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 76, 171-177.
- Pontificia Universidad Javeriana - Bogotá (www.javeriana.edu.co). (sense data).
Pontificia Universidad Javeriana. Consultat el 2020, a Facultat de Medicina.
Pontificia Universidad Javeriana (<https://medicina.javeriana.edu.co/>):
www.medicina.javeriana.edu.co
- Price, R., & Berry, M. N. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 60 (10), 1110-1119.
- Princen, H. (1983). Rheology of foams and highly concentrated emulsions. Elastic properties and yield stress of a cylindrical model system. *Journal of Colloid and Interface Science* 91, 160-175.
- Qiu, Y., Zhang, N., An, Y., & Wen, X. (2007). Biomaterial strategies to reduce implant-associated infections. *Int J Artif Organs* 30 (9), 828-841.
- Quééré, D. (2002). Fakir droplets. *Nat. Mater.*, 1, 14-15.
- Ramos-de-la-Peña, A., Renard, C., Montañez, J., Reyes-Vega, M., & Contreras-Esquivel, J. (2014). A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, 15, 37-49.
- Rauci, M., D'Antò, V., Guarino, V., Sardella, E., Zeppetelli, S., Favia, P., & Ambrosio, L. B. (2010). Biomineralized porous composite scaffolds prepared by chemical synthesis for bone tissue regeneration. *Acta Biomaterialia* 6 (10), 4090-4099.
- Riachy, P., Roig-Roig, F., García-Celma, M., Stébé, M., Pasc, A., Esquena, J., . . . Blin, J. (2016). Hybrid hierarchical porous silica templated in nano-emulsions for drug release. *European Journal of Inorganic Chemistry* 13-14, 1989-1997.
- Rodríguez, C., Shigeta, K., & Kunieda, H. (2000). Cubic phase-based concentrated emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 223, 197-204.

- Roig, F. (2016). *Hidrogels i materials porosos d'àcid hialurònic entrecreuat com a sistemes d'alliberament controlat de fàrmacs (Tesi doctoral)*. Barcelona: Universitat de Barcelona.
- Roig, F., Blanzat, M., Solans, C., Esquena, J., & García-Celma, M. (2018). Hyaluronan based materials with cationic sugar-derived surfactants as drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 164, 219-223.
- Roig-Roig, F., Solans, C., Esquena, J., & García-Celma, M. (2013). Preparation, Characterization, and Release Properties of Hydrogels Based on Hyaluronan for Pharmaceutical and Biomedical Use. *Journal of Applied Polymer Science*, 130 (2), 1377-1382.
- Rowe, R., Sheskey, P., & Quinn, M. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6a ed.* London: Pharmaceutical Press.
- Ruckenstein, E. (1997). Concentrated emulsion polymerization. *Advanced Polymer Science* 127, 1-58.
- Ruckenstein, E., & Park, J. (1992). Stable Concentrated Emulsions as Precursors for Hydrophilic Hydrophobic Polymer Composites . *Polymer* 33, 405-417.
- Sakeena, M., Elrashid, S., Muthanna, F., Gassan, Z., Kanakal, M., Laila, L., . . . Azmin, M. (2010). Effect of limonene on permeation enhancement of ketoprofen in palm oil esters nano-emulsions. *Journal of Oleo Science*, 59 (7), 395-400.
- Salvagni, E., García, C., Manresa, A., Müller-Sánchez, C., Reina, M., Rodríguez-Abreu, C., . . . Esquena, J. (2020). Short and ultrashort antimicrobial peptides anchored onto soft commercial contact lenses inhibit bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 196, 111283.
- Sangster, J. (1993). *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*. New York: John Wiley and Sons.
- Sanidad, M. (20 / junio / 2020). BOE núm. 172, de 20/06/2020. BOE, p. Referencia: BOE-A-2020-6474.
- Sant, S., Nadeau, V., & Hildgen, P. (2005). Effect of porosity on the release kinetics of propafenone-loaded PEG-g-PLA nanoparticles. *Journal of Controlled Release* 107, 203-214.
- Sarfaraz, K. (2004). *Handbook of Pharmaceuticals Manufacturing Formulations: Compressed Solid* . Boca Raton, FL: CRC Press LLC. Ed.
- Schliephake, H., Neukam, F., & Klosa, D. (1991). Influence of pore dimensions on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone substitutes. A histometric study. *J Oral Maxillofac Surg* 20, 53-58.

- Shah, V. (2001). Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. *Dissolution Technologies*, 8(4), 1-2.
- Shah, V., Siewert, M., Dressman, J., Moeller, H., & Brown, C. (2002). Dissolution/In Vitro Release Testing of Special Dosage Forms. *Dissolution Technologies*, 9(1), 1-5.
- Shariatnia, Z. (2019). Pharmaceutical applications of chitosan, 261. *Advances in Colloid and Interface Science*, 131-194.
- Sharp, P., & Langer, R. (2011). Promoting convergence in biomedical science. *Science*, 333, 521-522.
- Sher, P., Ingavle, G., Ponrathnam, S., & Pawar, A. (2007). Low density porous carrier based conceptual drug delivery system. *Microp. Mesop. Mat.* 102, 290-298.
- Shi, Q., & Yackowsky, G. (1998). One-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. A B. Hames, *Gel electrophoresis of proteins: A practical approach*, 3a ed (p. 1-52). Oxford: Oxford University Press.
- Siewert, M., Dressman, J., Brown, C., & Shah, V. (2003). FIP/AAPS guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech*, 4, 43-52.
- Sing, K., Everett, D., & Hault, R. (1985). Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. *Pure & Applied Chemistry* 57, 603-619.
- Smieja, M. (1998). Current indications for the use of clindamycin: A critical review. *Can J Infect Dis* 9(1), 22-28.
- Solans, C., Comelles, F., Azemar, N., Sánchez Leal, F., & Parra, J. (1986). Emulsiones-gel con elevado contenido en agua: formación y propiedades. *Jor. Com. Esp. Deterg.* 17, , 109-122.
- Solans, C., Esquena, J., & Azemar, N. (2003). Highly concentrated (gel) emulsions, versatile reaction media. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8, 156-163.
- Solans, C., Esquena, J., Azemar, N., Rodríguez, C., & Kunieda, H. (2004). Highly concentrated (gel) emulsions: Formation and properties. A D. Petsev, *Emulsions: Structure, stability and interactions* (p. 511-555). Amsterdam: Elsevier.
- Solans, C., Pons, R., & Kunieda, H. (1998). Gel Emulsions - Relationship between Phase Behaviour and Formation. A B. Binks, *Modern Aspects of Emulsion Science* (p. 367-394). Cambridge, U.K.: Royal Society of Chemistry.

- Son, G.-H., Lee, B.-J., & Cho, C.-W. (2017). Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, *47*, 287-296.
- Song, S., Hidajat, K., & Kawi, S. (2005). Functionalized SBA-15 Materials as Carriers for Controlled Drug Delivery: Influence of Surface Properties on Matrix–Drug Interactions. *Langmuir* *21*, 9568-9575.
- Starkey, E., Mulla, H., Sammons, H., & Pandya, H. (2014). Intravenous salbutamol for childhood asthma: evidence-based medicine? *Arch Dis Child*, *99*, 873-877.
- Steele, D., Thornburg, M., Stanley, J., Miller, R., Brooke, R., Cushman, J., & Cruzan, G. (1994). Determination of styrene in selected foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. *42* (8), 1661–1665.
- Stern, R., & Jedrzejewski, M. (2006). The hyaluronidases: their genomics, structures and mechanisms of action. *Chem. Rev.*, *106* (3), 818-839.
- SUPAC-SS, U. D. (1997). *FDA Guidance for Industry: Nonsterile Semisolid Dosage Forms, Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation*. Rockville, MD, United States: SUPAC-SS,.
- SUPAC-SS, U. D. (1998). *FDA Guidance for Industry: Topical Dermatological Drug Product NDAs and ANDAs – In Vivo Bioavailability, Bioequivalence, In Vitro Release, and Associated Studies*. Rockville, MD, United States: SUPAC-SS.
- Swetman, S. (2011). *Martindale The Complete Drug Reference, 37a edición*. London: Pharmaceutical Press.
- Tancred, D., McCormack, B., & Carr, A. (1998). A synthetic bone implant macroscopically identical to cancellous bone. *Biomaterials* *19*, 2303-2311.
- Tang, L.-J., & Schwartz, J. (1998). Introduction of Dissolution Error as a Result of Different Openings in Vessel Covers. *Pharmaceutical Development and Technology*, *3* (2), 261-267.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food. Chem.*, *50* (17), 4998–5006.
- Tasnim, N., Thakur, V., Chattopadhyay, M., & Joddar, B. A. (2018). The Efficacy of Graphene Foams for Culturing Mesenchymal Stem Cells and Their Differentiation into Dopaminergic Neurons. *Stem Cells International* *2018*, 1-12 Article ID 3410168.

- Tokatlian, T., Cam, C., Siegman, S., Lei, Y., & Segura, T. (2012). Design and Characterization of Micro-Porous Hyaluronic Acid Hydrogels for in vitro Gene Transfer to mMSCs. *Acta Biomater.*, *8(11)*, 3921-3931.
- Torchilin, V. (2012). Multifunctional nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews* *64*, 302-315.
- Ullmann, N., Caggiano, S., & Cutrera, R. (2015). Salbutamol and around. *Italian Journal of Pediatrics* *41(Suppl 2)*, A74.
- Vadia, N., & Rajput, S. (2019). Applications of mesoporous material for drug delivery. A M. eBook, *Importance and Applications of Nanotechnology*. MedDocs Publishers LLC.
- Vallet-Regí, M., Balas, F., & Arcos, D. (2007). Mesoporous materials for drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl* *46 (40)*, 7548-7558.
- Van Wachem, P., Zeeman, R., Dijkstra, P., Feijen, J., Hendriks, M., Cahalan, P., & van Luyn, M. (1999). Characterization and biocompatibility of epoxy-crosslinked dermal sheep collagens. *Journal of Biomedical Materials Research*, *47 (2)*, 270-277.
- Wan, Y., & Zhao, D. (2007). On the Controllable Soft-Templating Approach to Mesoporous Silicates. *Chem. Rev.* *107 (7)*, 2821–2860.
- Wang, B., Prinsen, P., Wang, H., Bai, Z., Wang, H., Luque, R., & Xuan, J. (2017). Macroporous materials: microfluidic fabrication, functionalization and applications. *Chemical Society Reviews* *46*, 855-914.
- Wang, L., Dong, S., Liu, Y., Ma, Y., Zhang, J., Yang, Z., . . . Yuan, Y. (2020). Fabrication of Injectable, Porous Hyaluronic Acid Hydrogel Based on an In-Situ Bubble-Forming Hydrogel Entrapment Process. *Polymers*, *12(5)*, 1138.
- Wang, S. (2009). Ordered mesoporous materials for drug delivery. *Microporous and Mesoporous Materials* *117*, 1-9.
- Wanka, G., Hoffmann, H., & Ulbricht, W. (1994). Phase-Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(Oxyethylene)-Poly(Oxypropylene)-Poly(Oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous-Solutions. *Macromolecules*. *27 (15)*, 4145–4159.
- Ways, T., Lau, W., & Khutoryanskiy, V. (2018). Chitosan and its derivatives for application in mucoadhesive drug delivery systems. *Polymer*, *10 (3)* , 1-37.
- Wen, X., Shao, C., Chen, W., Lei, Y., Ke, Q., & Guo, Y. (2016). Mesoporous carbonated hydroxyapatite/chitosan porous materials for removal of Pb(II) ions under flow conditions. *RSC Adv.*, *6 (115)*, 113940–113950.

- WHO. (2019). *Model List of Essential Medicines, 21th ed.* Ginebra: World Health Organisation.
- Williams, J., & Wroblewski, D. (1988). Spatial distribution of the phases in water-in-oil emulsions. Open and closed microcellular foams from cross-linked polystyrene. *Langmuir* 4, 4062-4067.
- Williams, J., & Wroblewski, D. (1988). Spatial-Distribution of the Phases in Water-in-Oil Emulsions. Open and Closed Microcellular Foams from Cross-Linked Polystyrene. *Langmuir* 4, 656-662.
- Wong, L., Baiz Villafranca, P., Menner, A., & Bismarck, A. (2013). Hierarchical Polymerized High Internal Phase Emulsions Synthesized from Surfactant-Stabilized Emulsion Templates. *Langmuir* 29, 5952-5961.
- Xu, X., Jha, A., Harrington, D., Farach-Carson, M., & Jia, X. (2012). Hyaluronic acid-based hydrogels: from a natural polysaccharide to complex networks. *Soft Matter*, 8 (12), 3280-3294.
- Yalkowsky, S., & Dannenfelser, R. (1992). *Aquasol database of aqueous solubility.* Tucson, AZ: College of Pharmacy, University of Arizona.
- Yalkowsky, S., & Valvani, S. (1980). *J Pharm Sci*, 69, 912-922.
- Yang, W., & Pierstorff, E. (2012). Reservoir-Based Polymer Drug Delivery Systems. *Journal of Laboratory Automation* 17 (1), 50-58.
- Yannas, I., Burke, J., Warpehoski, M., Stasikelis, P., Skrabut, E., Orgill, D., & Giard, D. (1981). Prompt, longterm functional replacement of skin. *Trans Am. Soc Artif Intern Organs* 27, 19-22.
- Yiu, H., & Wright, P. (2005). Enzymes supported on ordered mesoporous solids: a special case of an inorganic-organic hybrid. *J. Mater. Chem.* 15, 3690-3700.
- Yohanala, F., Dewa, R., Quarta, K., Winardi, W., & Winardi, S. (2015). Preparation of Polystyrene Spheres Using Surfactant-Free Emulsion Polymerization. *Modern Applied Science*, 9 (7), 121-126.
- Yoon, J., Kim, J., & Park, T. (2003). Dexamethasone releasing biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method. *Biomaterials* 24, 2323-2329.
- Zamani, E., Shokrzadeh, M., Fallah, M., & Shaki, F. (2017). A review of acrylamide toxicity and its mechanism. *Pharmaceutical and Biomedical Research*, 3(1), 1-7.
- Zatz, J., & Segers, J. (1998). Techniques for Measuring In Vitro Release for Semisolids. *Dissolution Technologies*, 5(1), 3-17 (1998). *Dissolution Technologies*, 5(1), 3-17.

- Zeeman, R., Dijkstra, P. J., van Wachem, P. B., van Luyn, M. J., Hendriks, M., Cahalan, P. T., & Feijen, J. (1999). Cross-linking and modification of dermal sheep collagen using 1,4-butanediol diglycidyl ether. *Journal of biomedical materials research*, 46 (3), 424-433.
- Zhang, T., Sanguramath, R., Israel, S., & Silverstein, M. (2019). Emulsion Templating: Porous Polymers and Beyond. *Macromolecules* 52 (15), 5445-5479.
- Zhang, Y., Fai, H., & Leong, K. (2013). Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. *Advanced Drug Delivery Reviews* 65, 104-129.