



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi de la formació de nano-emulsions per mètodes de baixa energia

Maria Homs

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

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

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



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER MÈTODES DE BAIXA ENERGIA

Maria Homs

Barcelona, Maig 2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

PROGRAMA DE DOCTORAT: NANOCIÈNCIES

ESTUDI DE LA FORMACIÓ DE NANO-EMULSIONS PER MÈTODES DE BAIXA ENERGIA

Memòria presentada per Maria Homs per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Directors:

Dra. Conxita Solans
Consell Superior
d'Investigacions Científiques
(CSIC)
Institut de Química Avançada
de Catalunya

Dr. Daniel Morales
Consell Superior
d'Investigacions Científiques
(CSIC)
Institut de Química Avançada
de Catalunya

Doctorand: Maria Homs

Tutora: Dra. M^aJosé García-Celma
Universitat de Barcelona
Departament de Farmàcia i Tecnologia farmacèutica i Físicoquímica

TAULA DE CONTINGUTS

| | |
|---|-----------|
| 3.3.3. Formació de nano-emulsions..... | 67 |
| 3.3.3.1. Emulsificació a temperatura constant per addició d'aigua..... | 67 |
| 3.3.3.2. Emulsificació a temperatura constant per addició d'un tensioactiu..... | 67 |
| 3.3.4. Preparació de nanopartícules..... | 68 |
| 3.3.5. Incorporació del principi actiu..... | 68 |
| 3.3.6. Determinació de l'eficiència d'encapsulació..... | 68 |
| 3.3.7. Estudis de difusió..... | 69 |
| 3.3.8. Quantificació del principi actiu per HPLC..... | 70 |
| 3.3.9. Anàlisi in vitro de viabilitat de les cèl·lules..... | 71 |
| 3.3.10. Difusió d'un colorant..... | 72 |
| 3.3.11. Estimació dels coeficients de difusió per Ressonància Magnètica Nuclear (RMN)..... | 73 |
| 3.3.12. Caracterització de la mida i forma de les gotes per dispersió dinàmica i estàtica de la llum làser..... | 73 |
| 3.3.13. Estabilitat de les emulsions i de les dispersions de nanopartícules..... | 74 |
| 4. RESULTATS I DISCUSSIÓ..... | 75 |
| 4.1. Selecció dels components i estudis preliminars..... | 77 |
| 4.1.1. Temperatures d'inversió de fase..... | 78 |
| 4.1.2. Comportament fàsic..... | 82 |
| 4.2. Comportament fàsic de sistemes aigua/tensioactiu/oli i caracterització de fases de microemulsió..... | 86 |
| 4.2.1. Determinació de la corba de la T_{HLB} | 86 |
| 4.2.2. Comportament fàsic proper a la corba de la T_{HLB} | 87 |
| 4.2.3. Caracterització de fases de microemulsió del sistema aigua/Brij30/hexadecà..... | 89 |
| 4.2.3.1. Estudi de difusió d'un colorant..... | 89 |
| 4.2.3.2. Determinació dels coeficients de difusió dels components de les microemulsions per RMN..... | 91 |
| 4.2.3.3. Determinació de la mida de gota de les microemulsions per dispersió dinàmica de la llum làser (DLS)..... | 97 |
| 4.2.3.4. Determinació de la forma de les gotes de les microemulsions per dispersió estàtica de la llum làser (SLS)..... | 100 |

TAULA DE CONTINGUTS

| | |
|--|------------|
| 4.3. Formació de nano-emulsions per addició d'un segon tensioactiu a microemulsions O/W i caracterització per dispersió de llum..... | 103 |
| 4.3.1. Selecció dels tensioactius..... | 103 |
| 4.3.2. Formació de nano-emulsions a partir de microemulsions amb una Ros=0.67..... | 104 |
| 4.3.2.1. Caracterització de les microemulsions i nano-emulsions per dispersió dinàmica de la llum làser..... | 106 |
| 4.3.2.2. Evolució de la mida de gota..... | 111 |
| 4.3.3. Formació de nano-emulsions a partir de microemulsions O/W amb una Row=0.2..... | 117 |
| 4.3.3.1. Caracterització de les microemulsions i nano-emulsions per dispersió dinàmica de la llum làser..... | 118 |
| 4.3.3.2. Evolució de la mida de gota..... | 120 |
| | |
| 4.4. Formació de nano-emulsions per addició d'aigua a mesclres binàries oli/tensioactiu, microemulsions W/O i O/W..... | 123 |
| 4.4.1. Sistemes aigua / tensioactiu no iònic etoxilat/propioxietilenat (PPO-PEO-5) / oli..... | 126 |
| 4.4.2. Sistemes aigua / tensioactiu no iònic etoxilat/propioxietilenat (PPO-PEO-5 ó PPO-PEO-3)/propioxietilenats/ MI:PL (1:1)..... | 134 |
| 4.4.3. Sistemes aigua / tensioactius no iònics etoxilats/propioxietilenats (PPO-PEO-3 : PPO-PEO-5) / oli..... | 138 |
| | |
| 4.5. Nano-emulsions polimèriques utilitzades com a plantilla per a la formació de nanopartícules polimèriques per aplicació en biomedicina..... | 145 |
| 4.5.1. Estudi del comportament fàsic del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil)..... | 145 |
| 4.5.2. Formació i caracterització de nano-emulsions polimèriques..... | 147 |
| 4.5.3. Formació de nanopartícules polimèriques..... | 150 |
| 4.5.4. Estabilitat de les nano-emulsions i de les dispersions de nanopartícules..... | 153 |
| 4.5.5. Eficiència d'encapsulació..... | 155 |
| 4.5.6. Estudis d'alliberació <i>in vitro</i> d'un principi actiu desde la dispersió de nanopartícules a una solució receptora..... | 156 |
| 4.5.7. Assajos de citotoxicitat <i>in vitro</i> de les nanopartícules polimèriques..... | 165 |

TAULA DE CONTINGUTS

| | |
|-----------------------------|------------|
| 5. CONCLUSIONS..... | 169 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 175 |
| 7. GLOSSARI..... | 189 |

Resum

Les nano-emulsions són emulsions, dispersions de dos líquids immiscibles, amb una mida de gota en el rang nanomètric, en general, entre 20-200 nm. Degut a la mida de gota, presenten estabilitat en front a la sedimentació o cremat, una elevada àrea interfacial i són transparents o translúcides. Totes aquestes propietats fan que les nano-emulsions tinguin aplicacions en sectors industrials molt diversos (farmacèutic, agroquímic, cosmètic i alimentari). Les nano-emulsions són termodinàmicament inestables, per tant, no es formen espontàniament i és necessari aportar energia al sistema per a la seva formació. Aquesta energia es pot obtenir d'una font externa (p.ex. equips mecànics) en els anomenats mètodes d'alta energia o de l'energia interna química dels components del sistema en els anomenats mètodes de baixa energia. Entre els mètodes de baixa energia cal destacar els mètodes d'inversió de fases, ja sigui per un canvi de composició a temperatura constant (PIC) ó bé per un canvi de temperatura a composició constant (PIT). En aquests mètodes durant el procés d'emulsificació es produeixen transicions de fases que determinen la mida de gota mínima de les nano-emulsions. Així, el coneixement del comportament fàsic és un factor clau en l'estudi dels mecanismes de formació de nano-emulsions per mètodes d'inversió de fases.

El principal objectiu de la tesi ha estat el d'estudiar la formació de nano-emulsions oli-en-aigua (O/W) per mètodes de baixa energia per tal d'aprofundir en els mecanismes de la seva formació. Per això es van seleccionar tensioactius no iònics etoxilats que permetessin la formació de nano-emulsions per diferents mètodes de baixa energia. Així mateix en la selecció dels components es va tenir en compte que fossin aptes per possibles aplicacions en el camp farmacèutic o cosmètic. Per aconseguir que el procés d'emulsificació fos més eficient es va considerar la formulació de nano-emulsions a temperatures pròximes a la temperatura d'inversió de fases del sistema. Es van realitzar estudis preliminars amb els sistemes aigua/Brij30/component oliós (dodecà, decà, hexadecà) que van consistir en la determinació de les temperatures d'inversió de fases mitjançant mesures de conductivitat en funció de la temperatura i en l'estudi del comportament fàsic a temperatures properes a aquesta temperatura. Els resultats preliminars obtinguts van evidenciar la presència de fases de microemulsió d'estructura O/W properes a la corba de temperatures d'inversió de fases en el sistema aigua/Brij30/hexadecà.

En el sistema aigua/Brij30/hexadecà es va realitzar un estudi sistemàtic del comportament fàsic en funció de la relació oli-tensioactiu per tal de detectar les fases presents. Aquest estudi va fer palès que no era possible la preparació de nano-emulsions per addició d'aigua a temperatura constant (mètode PIC) atès que la fase de microemulsió O/W es trobava present en tot el interval de composicions d'interès. En conseqüència es van estudiar altres estratègies per obtenir nano-emulsions O/W a partir de microemulsions O/W per aquest sistema. Així, es va aconseguir formar nano-emulsions O/W a temperatura constant per un procediment no descrit amb anterioritat que va consistir en l'addició d'un segon tensioactiu més hidròfil. Aquest segon tensioactiu indueix un

augment de la curvatura del film interfacial que forma les gotes de microemulsió provocant una desestabilització del sistema i en conseqüència la formació nano-emulsions sense inversió de fases. D'aquesta manera es van formar nano-emulsions O/W en el sistema aigua/Brij30/hexadecà per addició d'un segon tensioactiu a microemulsions O/W amb un contingut d'aigua del 85% i sense inversió de fases a la temperatura constant de 24°C. Els radis hidrodinàmics de les nano-emulsions van ser similars al de les microemulsions inicials (15-20nm).

Així mateix es va estudiar quines eren les fases clau determinants de les propietats de les nano-emulsions O/W obtingudes mitjançant mètodes de baixa energia per addició d'aigua a temperatura constant. Per a realitzar aquest estudi es van seleccionar sistemes dels quals es tenia un coneixement previ del comportament fàsic. Es va assolir la formació de nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua superior al 85% a la temperatura constant de 25°C, per a relacions oli-tensioactiu ($Ros=0.3-0.7$) depenent del sistema, i amb uns valors de radi hidrodinàmic de 25-40nm. En aquests sistemes el mètode òptim per a la formació de les nano-emulsions va ser la incorporació d'aigua en una única addició. S'ha de mencionar que l'estabilitat d'aquestes nano-emulsions era inferior a una hora, tot i que la incorporació d'esqualà a la fase dispersa atenuava la velocitat a la que es desestabilitzaven per maduració d'Ostwald. Amb aquest estudi es va posar de manifest que la formació de nano-emulsions es produeix mitjançant tres possibles mecanismes: (a) per inversió de fases seguit de dilució de microemulsions O/W, (b) per inversió de fases (PIC), i (c) per dilució de microemulsions O/W, sense inversió de fases. L'estudi també va evidenciar que per a la formació de nano-emulsions un factor clau es la coexistència en una sola fase de tots els components de l'emulsió.

Entre les aplicacions de les nano-emulsions són de gran interès la seva utilització com a plantilla per a l'obtenció de nanopartícules. En aquesta investigació s'ha estudiat la formació de nano-emulsions i nanopartícules polimèriques d'àcid poli(làctic-co-glicòlic) (PLGA) aptes per l'aplicació en el camp de la biomedicina. A la literatura es poden trobar treballs en els que han investigat l'efecte de la relació àcid làctic: àcid glicòlic del PLGA, així com la influència del pes molecular del PLGA en les característiques de les nanopartícules que s'obtenen, no obstant, no s'ha trobat cap publicació en relació a la influència de la concentració del polímer PLGA en les propietats de les nano-emulsions i de les nanopartícules polimèriques. Així un altre objectiu de la tesi ha estat investigar la influència de la concentració de polímer en la formació i propietats de nano-emulsions i nanopartícules polimèriques en medi aquós, principalment la mida i l'estabilitat. També es va estudiar la influència de la concentració de polímer en l'encapsulació i alliberació *in vitro* d'un principi actiu model, la dexametasona, i es va avaluar la citotoxicitat *in vitro* de les nanopartícules polimèriques sense i amb principi actiu.

Per aquest estudi es va seleccionar el sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil). Es van formar nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua a partir del 45% i fins a concentracions superiors al 90% i en un ampli interval de relacions oli-tensioactiu ($Ros=0.2-0.8$) en funció del contingut de polímer. L'estudi del comportament fàsic va posar de manifest la presència de fases de microemulsió inversa (W/O) i de cristall líquid laminar, demostrant així que es pot produir inversió de fases durant el procés d'emulsificació. La regió de formació de nano-emulsions i la mida de gota augmentava lleugerament amb el contingut de polímer. Les nano-emulsions obtingudes presentaven uns valors de radi hidrodinàmic en el rang de 7-75nm que augmentava amb el contingut de polímer en el interval de relacions oli-tensioactiu ($Ros=0.55-0.70$) estudiat. Així mateix la mida de gota de les nano-emulsions augmentava lleugerament amb la relació Ros per a cada concentració de PLGA estudiada.

Es van preparar les nanopartícules polimèriques, a partir de les nano-emulsions formulades amb una relació oli-tensioactiu ($Ros=0.6$) i 90% d'aigua, pel mètode de l'evaporació del solvent. El radi hidrodinàmic de les dispersions de nanopartícules polimèriques sense principi actiu encapsulat augmentava amb el contingut de polímer i estava en el interval de 7-55nm. L'encapsulació del principi actiu produïa una disminució de la transparència de la dispersió de nanopartícules però no modificava significativament la mida de les nanopartícules. El percentatge d'encapsulació del principi actiu va ser elevat, al voltant del 90%, i no variava amb el contingut de polímer. L'estudi d'alliberació del principi actiu de les dispersions de nanopartícules a una solució receptora a la temperatura de 25°C va mostrar que era més sostinguda que a partir de la solució aquosa, i que l'eficiència d'alliberació del principi actiu disminuïa al augmentar la concentració de polímer. Així mateix, l'ajust dels perfils d'alliberació experimentals a tres models matemàtics teòrics va confirmar que el mecanisme pel qual el principi actiu s'alliberava de la dispersió de nanopartícules era per difusió de Fick. Els estudis de citotoxicitat *in vitro* van posar de manifest que les dispersions de nanopartícules amb i sense principi actiu encapsulat presentaven percentatges de viabilitat superiors al 70%. Els resultats obtinguts per aquestes nanopartícules polimèriques formulades amb un polímer biocompatible i biodegradable preparades a partir de nano-emulsions amb un solvent de baixa toxicitat indiquen que podrien ser d'interès per aplicacions biomèdiques.

Capítol 1

Introducció

1.1. Nano-emulsions

1.1.1. Aspectes generals

Les nano-emulsions són emulsions amb una mida de gota molt petita, en general entre els 20 i els 200 nm (**Tadros, 2004**), (**Solans, 2005**). A la literatura el terme nano-emulsió també es pot trobar designat com "emulsions submicromètriques" (**Benita, 1993**), miniemulsions (**El-Aasser, 1984**), emulsions ultrafines (**Nakajima, 1993**), (**Nakajima, 1997**), microemulsions inestables (**Nakajima, 1997**) i nanoemulsions (**Nakajima, 1993**). Tots aquests termes indiquen que es tracten d'emulsions de mida molt petita. En general les nano-emulsions presenten un aspecte visual (Figura 1.1) transparent ó translúcid amb lleugera tonalitat blavosa i tenen baixa viscositat.

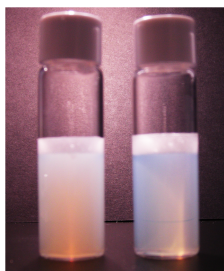


Figura 1.1. Aspecte visual de les nano-emulsions

Les nano-emulsions en tant que emulsions són dispersions col·loïdals formades per dos líquids immiscibles entre sí en el que un dels líquids (fase interna, dispersa o discontinua) es troba dispers en l'altre líquid (fase externa, dispersant o continua) en forma de gotes molt petites i estabilitzades per un o més compostos tensioactius (**Becher, 1972**), (**Solans, 2003**), (**Solans, 2005**). En funció del tipus de fase interna i externa les nano-emulsions poden ser de tipus oli-en-aigua (O/W), (fase externa aquosa, fase interna oliosa) o tipus aigua-en-oli (W/O), (fase externa oliosa, fase interna aquosa) (Figura 1.2).

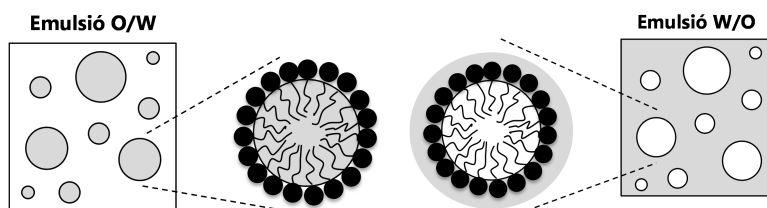


Figura 1.2. Representació esquemàtica d'una emulsió tipus oli-en-aigua (O/W) i d'una emulsió tipus aigua-en-oli (W/O).

INTRODUCCIÓ

Les nano-emulsions són sistemes termodinàmicament inestables. Això és degut a l'elevada energia lliure ($\gamma\Delta A$) associada a la formació de la interfície aigua-oli. L'energia lliure (ΔG) de formació d'una emulsió es pot expressar mitjançant l'equació de Gibbs:

$$\Delta G = \gamma\Delta A - T\Delta S \quad (\text{Equació 1.1})$$

on γ és la tensió interfacial entre les dues fases, ΔA és l'increment de l'àrea interfacial, T és la temperatura i ΔS és l'increment de l'entropia (**Tadros, 1983**), (**Tadros, 2004**).

Atès que en les emulsions el terme de l'entropia ΔS és positiu i negligible, el terme $T\Delta S$ no pot ser compensat pel terme $\gamma\Delta A$ el qual és gran degut a l'elevada àrea interfacial generada en la formació d'un gran nombre de gotes. En conseqüència, l'energia lliure de Gibbs ΔG és positiva i per tant és necessari un suministre d'energia per a la formació d'emulsions (**Walstra, 1993**).

Les nano-emulsions que presenten un aspecte transparent sovint es confonen amb les microemulsions. Les microemulsions són sistemes que presenten un valor de tensió interfacial γ entre les fases oliosa i aquosa tan baix que l'energia lliure de Gibbs ΔG és negativa i en conseqüència són termodinàmicament estables, a diferència de les nano-emulsions que no ho són (**Danielsson, 1981**), (**Solans, 1997**), (**Tadros, 2004**). Malgrat que les nano-emulsions són sistemes termodinàmicament inestables, poden presentar una elevada estabilitat cinètica si s'optimitzen les propietats del sistema, principalment si es selecciona el tensioactiu(s) adequat(s).

1.1.2. Sistemes Tensioactius

Els tensioactius són molècules amfifíliques que consten d'una part hidròfila i una part lipòfila (**Winsor, 1948**) (Figura 1.3). La part lipòfila consisteix, en general, en una cadena alquílica lineal o ramificada i té afinitat amb la fase oliosa mentre que la part hidròfila presenta afinitat amb la fase aquosa. En funció de la dissociació en medi aquós els tensioactius es classifiquen en iònics, no iònics i amfòters (Taula 1.1).

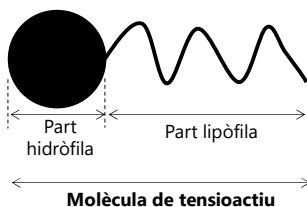


Figura 1.3. Representació esquemàtica d'una molècula de tensioactiu.

Taula 1.1. Classificació dels tensioactius.

| Tipus de tensioactiu | Descripció | Exemple |
|----------------------|---|---|
| Iònic | La part hidròfila es dissocia en medi aquós en un anió (ó catió) portador de les propietats de superfície i en un contraió catiònic (aniònic) | Dodecil sulfat de sodi, ... |
| No iònic | No es dissocia en medi aquós | Monolaurats de sorbitans, èters d'alcohols grassos polietoxilats, ... |
| Amfòter | La part hidròfila està carregada positivament o negativament depenent del pH del medi. | Alquil betaines, amfòlits, ... |

Els tensioactius s'adsorbeixen de manera espontània a les interfícies aigua-oli i s'orienten amb la finalitat d'evitar interaccions desfavorables, és a dir, la part hidròfila en el medi hidròfil i la part lipòfila en el medi lipòfil. Les molècules de tensioactiu disminueixen la tensió interfacial i en conseqüència l'energia necessària per al procés d'emulsificació, i augmenten l'estabilitat de les gotes de la fase dispersa.

En la present tesi es van utilitzar principalment tensioactius no iònics ja que són menys irritants que els tensioactius iònics.

- Nombre HLB

El nombre HLB (N_{HLB}) és un dels paràmetres importants en l'elecció del tensioactiu adequat. Es defineix com el balanç hidròfil-lipòfil, que relaciona de manera quantitativa la part hidròfila i lipòfila del tensioactiu. Aquest terme va ser introduït per Griffin (Griffin, 1949), (**Griffin, 1954**). En el cas dels tensioactius no iònics el N_{HLB} es calcula mitjançant la següent equació:

$$N_{HLB} = \frac{H}{H+L} \times 20 \quad (\text{Equació 1.2})$$

on H i L són els percentatges en pes de la part hidròfila i lipòfila del tensioactiu, respectivament, i el número 20 és una escala arbitrària.

Posteriorment el mateix autor va desenvolupar l'equació 1.3 per a calcular aquest paràmetre en tensioactius no iònics etoxilats:

$$N_{HLB} = \frac{E}{5} \quad (\text{Equació 1.3})$$

on E correspon a la fracció en pes de la cadena etoxilada del tensioactiu.

Els tensioactius amb un N_{HLB} superior a 10 tenen un comportament hidròfil mentre que els tensioactius amb un N_{HLB} inferior a 10 presenten un comportament lipòfil. El N_{HLB} és un paràmetre molt utilitzat per predir l'activitat interfacial així com una eina útil per propòsits de formulació. La Taula 1.2 relaciona els intervals de N_{HLB} i les propietats del tensioactiu.

Taula 1.2. Propietats dels tensioactius en funció del N_{HLB} .

| N_{HLB} | Aplicació |
|-----------|-----------------------------|
| 4-8 | Antiespumant |
| 7-11 | Emulsionant W/O |
| 11-14 | Agent humectant |
| 12-16 | Emulsionant O/W (detergent) |
| 16-20 | Solubilitzant |

No obstant, s'ha de mencionar que l'equació 1.2 i l'equació 1.3 només tenen en compte el tensioactiu però no altres paràmetres com la temperatura, la pressió, la salinitat, la utilització de co-tensioactius, la interacció entre els components del sistema i el volum de la fracció de la fase dispersa. Així, en sistemes aigua/tensioactiu no iònic etoxilat/oli quan la temperatura augmenta les cadenes etoxilades de la part lipòfila del tensioactiu es deshidraten i les propietats del tensioactiu canvien de hidròfiles a lipòfiles. Aquest canvi en la solubilitat del tensioactiu indueix una inversió de fases del tipus oli-en-aigua O/W al tipus aigua-en-oli W/O. Es per això que Shinoda va proposar un nou concepte pels tensioactius no iònics de tipus etoxilat anomenat la temperatura d'inversió de fases (T_{HLB}) ó PIT (**Shinoda, 1968**), (**Kunieda, 1982**) que té en compte tots els components del sistema i la temperatura. Per aquest motiu la T_{HLB} és un paràmetre utilitzat en aquest tipus de sistemes per a predir el tipus d'emulsió a una temperatura determinada.

- Paràmetre crític d'empaquetament

El paràmetre crític d'empaquetament (CPP) "critical packing parameter" permet predir l'estructura que adoptarà un tensioactiu a partir de la seva estructura química (**Israelachvili, 1976**). Aquest paràmetre es calcula a partir de l'equació 1.4:

$$CPP = \frac{V_L}{a_s \cdot l_c} \quad (\text{Equació 1.4})$$

on V_L és el volum ocupat per la part hidrocarbonada del tensioactiu, a_s és l'àrea per molècula de tensioactiu i l_c és la longitud màxima de la cadena hidrocarbonada de tensioactiu.

1.1.3. Comportament fàsic de sistemes tensioactius

L'estudi del comportament fàsic d'un sistema tensioactiu permet obtenir informació global i sistemàtica de les fases que estan en equilibri, i del tipus d'agregats supramoleculars que es formen en funció de la temperatura. Els resultats del comportament fàsic es representen mitjançant diagrames de fases.

La regla de fases de Gibbs determina el nombre de fases en equilibri possibles del sistema en unes condicions determinades (Equació 1.5).

$$F = C + 2 - P \quad (\text{Equació 1.5})$$

Així el nombre de fases (P) que poden coexistir en un sistema depèn del nombre de components del sistema (C) i del nombre de graus de llibertat (F), que són la temperatura, la pressió i la composició. D'aquesta manera, en un sistema aigua/tensioactiu/oli amb una fase, es poden tenir un màxim de quatre graus de llibertat.

En un sistema aigua/tensioactiu/oli el comportament fàsic es representa generalment mitjançant un triangle equilàter (Figura 1.4). Cada vèrtex (p. ex. S) representa 100% d'un dels components, mentre que una aresta (p.ex. W-O) representa composicions binàries amb un 0% del component del vèrtex oposat. Les composicions de l'interior del triangle estan formades pels tres components del sistema.

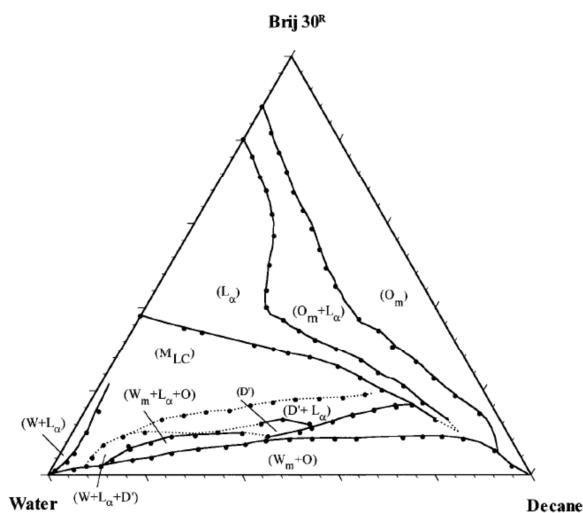


Figura 1.4. Representació gràfica mitjançant un triangle equilàter d'un diagrama de fases ternari a temperatura constant de 25°C del sistema aigua/Brij30/decà. (O_m: fase líquida isòtropa, L_α: fase de cristall líquid laminar, D': fase líquida birrefringent al moviment, W_m: microemulsió O/W, W: fase líquida aquosa, O: fase líquida oliosa, M_{LC}: multifàsic amb cristall líquid laminar) (Forgiarini, 2001).

INTRODUCCIÓ

La representació de diversos diagrames de fases ternaris mitjançant un triangle equilàter a diferents temperatures donen lloc a un prisma triangular o prisma de fases. En l'estudi del comportament fàsic en general es solen determinar seccions del prisma de fases. Una de les seccions més estudiades és la variació de la temperatura en funció de la concentració d'aigua mantenint la relació oli-tensioactiu (Ros) constant, o la variació de la temperatura en funció de la concentració de tensioactiu mantenint la relació oli-aigua (Row) constant.

- Tipus de fases dels sistemes tensioactius

El tipus de fases que es poden formar en un sistema tensioactiu depenen del tipus de tensioactiu, de la seva concentració, de la temperatura i de la presència d'altres components. La Taula 1.3 mostra les principals fases líquides i de cristall líquid dels sistemes tensioactius.

Taula 1.3. Nomenclatura i descripció de les principals fases d'un sistema tensioactiu.

| Nomenclatura | Descripció |
|--------------|---|
| L_1, D_1 | Fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W. |
| L_2, D_2 | Fase líquida isòtropa i transparent de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura W/O. |
| L_3 | Fase líquida transparent, estructura tipus esponja. |
| D'_1 | Fase líquida birefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'oli (curvatura cònca o positiva). |
| D'_2 | Fase líquida birefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'aigua (curvatura convexa o negativa). |
| $L\alpha$ | Fase anisòtropa i lleugerament viscosa que correspon a una fase de cristall líquid laminar. |
| H_1 | Fase anisòtropa, transparent i molt viscosa que correspon a una fase de cristall líquid hexagonal directe. |
| H_2 | Fase anisòtropa, transparent i molt viscosa que correspon a una fase de cristall líquid hexagonal invers. |
| I_1 | Fase isòtropa, transparent i molt viscosa que correspon a un cristall líquid cúbic (estructura micel·lar directa). |
| I_2 | Fase isòtropa, transparent i molt viscosa que correspon a un cristall líquid cúbic (estructura micel·lar inversa). |
| V_1 | Fase isòtropa, transparent i molt viscosa, que correspon a un cristall líquid cúbic (estructura bicontínua directa). |
| V_2 | Fase isòtropa transparent i molt viscosa, que correspon a un cristall líquid cúbic (estructura bicontínua inversa). |

- Microemulsions

Les microemulsions són sistemes col·loïdals diferents de les nano-emulsions tot i que poden presentar aspectes visuals i mides de gota semblants. Es defineixen com solucions col·loïdals isòtropes termodinàmicament estables on dos líquids immiscibles formen una sola fase macroscòpica. La interfície aigua-oli està estabilitzada per un tensioactiu amb propietats hidròfiles-lipòfiles equilibrades. Degut a la transparència òptica que presenten tenen una mida característica de 100 nm. Les microemulsions poden ser directes (O/W), en el que l'oli forma els microglòbuls o inverses (W/O) en el que és l'aigua que forma els microglòbuls (**Danielsson, 1981**), o bé bicontínues, on tant l'aigua com l'oli són fases contínues, presenten una major viscositat que les microemulsions directes i inverses i poden ser birefringents al moviment al ser observades mitjançant polaritzadors creuats (**Scriven, 1976**).

Està descrit que la presència de fases de cristalls líquids laminars i/o fases de microemulsió bicontínua (**Forgiarini, 2001**), (**Morales, 2003**), (**Sadurní, 2005**), durant el procés d'emulsificació afavoreixen la formació de nano-emulsions de mida de gota petita i uniforme. En conseqüència és necessari el coneixement del comportament fàsic dels sistemes aigua/tensioactiu(s)/oli(s) objectes d'estudi.

1.1.4. Estabilitat de nano-emulsions

Les emulsions (així com les nano-emulsions) degut a la seva inestabilitat termodinàmica tendeixen a la separació en dues o més fases. Aquest procés anomenat separació de fases pot esdevenir a través de varis mecanismes de desestabilització que inclouen la sedimentació ó cremat, la floculació, la coalescència i la maduració d'Ostwald (Figura 1.5). Aquests mecanismes es poden produir simultàniament o consecutivament. El mecanisme predominant depèn del tipus d'emulsió, de la mida de gota, del components de l'emulsió, i del mètode de preparació de l'emulsió.

Les nano-emulsions són estables en front a la sedimentació ó cremat, i el mecanisme de desestabilització predominant és la maduració d'Ostwald. S'ha de destacar que la sedimentació ó cremat i la floculació són processos reversibles, contràriament als processos de coalescència i maduració d'Ostwald.

A continuació es descriuen breument en que consisteixen cada un dels mecanismes de desestabilització posant especial èmfasi en el principal mecanisme de desestabilització de les nano-emulsions (maduració d'Ostwald) (**Taylor, 1994**), (**Katsumoto, 2000b**), (**Izquierdo, 2002**), (**Tadros, 2004**).

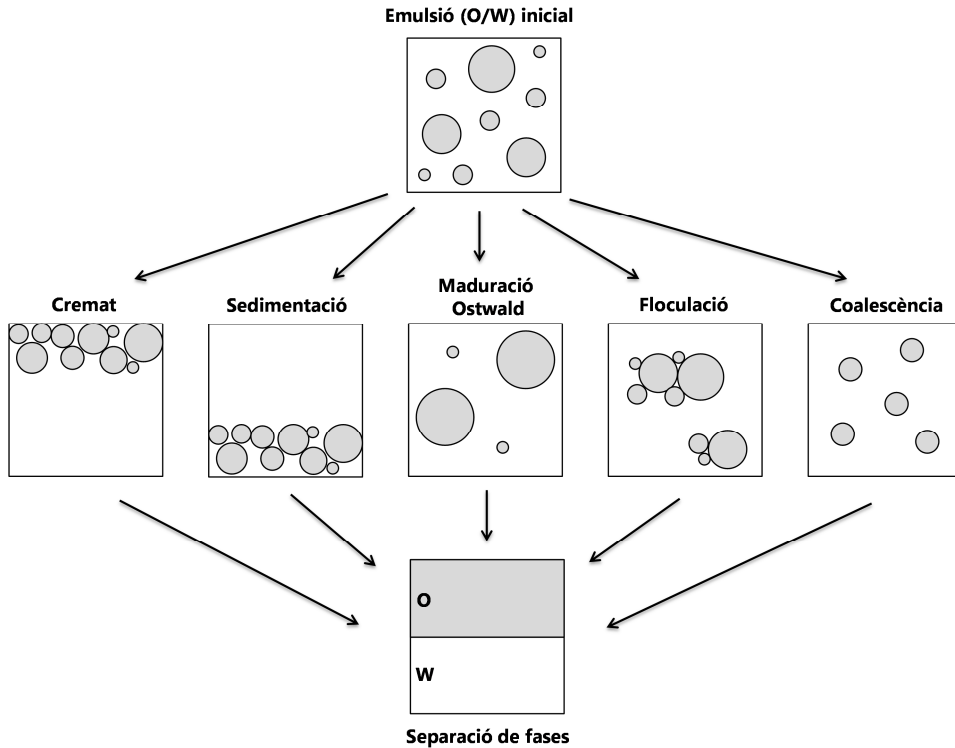


Figura 1.5. Representació esquemàtica dels mecanismes de desestabilització en una emulsió O/W.

- **Sedimentació o cremat**

La sedimentació o cremat es produeixen a conseqüència de la diferència de densitats entre la fase dispersa i la fase continua (Figura 1.5) (Tadros, 1983). Degut a l'efecte de la gravetat les gotes migren cap a la part superior en el cas del cremat i cap a la part inferior en el cas de la sedimentació. La velocitat de migració es pot calcular mitjançant la llei d'Stokes (Equació 1.6):

$$v = \frac{2(\rho_d - \rho_c)gr^2}{9\eta} \quad (\text{Equació 1.6})$$

on ρ_d és la densitat de la fase dispersa, ρ_c és la densitat de la fase continua, g és la gravetat, r és el radi de les gotes i η és la viscositat de la fase continua.

La velocitat de migració es pot reduir si es disminueix la diferència de densitats entre les dues fases, augmentant la viscositat de la fase continua i/o disminuint el radi de la gota. En el cas de les nano-emulsions degut a que la mida de gota és molt petita, la velocitat de migració és baixa i el moviment brownià, que és relativament alt per gotes petites,

supera la velocitat de qualsevol procés de migració. En conseqüència, degut a la seva mida de gota petita, les nano-emulsions són estables en front a la sedimentació o cremat (**Tadros, 2004**), (**Mason, 2006**), (**McClements, 2010**).

- Floculació

La floculació consisteix en l'agregació de les gotes sense que es trenqui la pel·lícula interfacial que les separa (Figura 1.5) (**Tadros, 1983**), (**Binks, 1998**). L'agregació és produïda quan les forces atractives són majors que les forces repulsives. Degut a la mida petita que presenten les nano-emulsions, la curvatura del film interfacial és elevada i per tant la regió de contacte entre les gotes és baixa, en conseqüència, es redueix la probabilitat de que dues gotes s'agreguin. És per aquesta raó que alguns autors consideren que les nano-emulsions són estables en front la floculació (**Tadros, 2004**). Una altra hipòtesi considera que la velocitat de floculació depèn de quantes vegades les gotes es troben i quant de temps romanen en contacte. En el cas de les nano-emulsions en les que les gotes són petites el moviment Brownià és elevat i per tant la probabilitat de col·lisió entre les gotes augmenta. És per aquesta raó que altres autors consideren que les nano-emulsions es poden desestabilitzar mitjançant la floculació (**Wang, 2008**). No obstant, l'addició de tensioactius no iònics (que actuen com a barrera estèrica degut a la voluminositat dels grups hidròfils) o l'addició de tensioactius iònics (els quals augmenten la càrrega superficial de la gota i actuen així com a barrera electrostàtica) poden reduir la floculació (**Solans, 2003**).

- Coalescència

La coalescència és el procés pel qual dues o més gotes col·lisionen, es trenca el film interfacial que les separa i es fusionen formant una gota de volum igual al de les gotes fusionades. En sistemes concentrats la velocitat de coalescència es pot calcular mitjançant la següent expressió (Equació 1.7) (**Deminière, 1998**).

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

on r i r_0 són el radi promig de les gotes a temps t i a temps zero respectivament, ω és la freqüència de ruptura per unitat de superfície de la pel·lícula interfacial. Així, la inversa del quadrat de la mida de les gotes és funció lineal del temps. Hi han estudis que descriuen l'estabilitat de les nano-emulsions en front la coalescència suposant que les gotes es comporten com a esferes rígides el que comportaria que fos impossible el trencament del film interfacial que les separa (**Katsumoto, 2000a**).

- Maduració d'Ostwald

La maduració d'Ostwald és un procés en el qual la mida promig de les gotes augmenta amb el temps degut a la difusió de les molècules de la fase dispersa de les gotes petites a les més grans. Això és degut al augment de la solubilitat de la fase dispersa al disminuir la mida de gota, en conseqüència, el component oliós que forma les gotes tendeix a dissoldre's i es difon a través de la fase continua i recondensa en les gotes més grans, el que implica un augment de la mida de gota promig. Com ja s'ha descrit anteriorment la maduració d'Ostwald és el principal mecanisme de desestabilització de les nano-emulsions. La pressió de Laplace és molt gran en les gotes petites mentre que en les gotes grans és petita. En conseqüència, com més gran és la diferència en les diferències de la pressió de Laplace i la velocitat de difusió major és la polidispersitat de la nano-emulsió.

La Figura 1.6 mostra una representació esquemàtica del procés de desestabilització de la nano-emulsió pel mecanisme de maduració d'Ostwald.

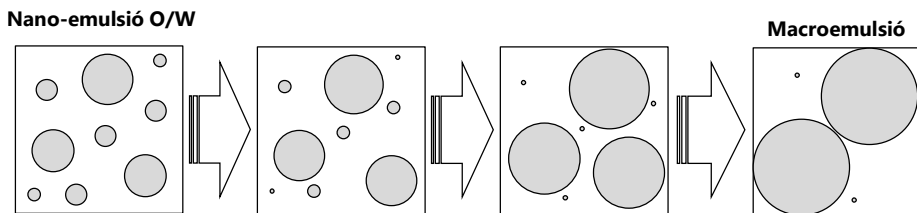


Figura 1.6. Representació esquemàtica del procés de desestabilització d'una nano-emulsió pel mecanisme de maduració d'Ostwald.

La velocitat a la que es produeix la maduració d'Ostwald es pot determinar a partir de l'Equació 1.8 (Lifshitz, 1961) i es coneix com a teoria LSW (Lifshitz-Slyozov-Wagner):

$$\omega = \frac{dr_c^3}{dt} = \frac{8}{9} \cdot \frac{c_{\infty} \cdot \gamma \cdot V_m \cdot D}{\rho \cdot R \cdot T} \quad (\text{Equació 1.8})$$

on r_c és el radi crític del sistema a un temps determinat t (radi que a partir d'un determinat temps es manté constant), ρ és la densitat de la fase dispersa, i D és el coeficient de difusió de la fase dispersa en la fase continua. El radi crític augmenta amb el temps com a conseqüència de la difusió del oli de la fase dispersa de les gotes petites cap a les gotes grans. S'assumeix que les gotes de la fase dispersa són esfèriques, que la distància entre les gotes és més gran que el seu diàmetre, i que la cinètica està controlada per la difusió molecular de la fase dispersa en la fase continua. Segons l'equació 1.8 hi ha una relació lineal entre r^3 i t , i el pendent de la recta indica la velocitat de maduració.

1.1.5. Preparació de nano-emulsions

La formació de gotes de mida nanomètrica per a generar nano-emulsions necessita d'un suministrament d'energia. Aquesta energia es pot obtenir d'una font externa (p.ex. equips mecànics) en els anomenats mètodes d'alta energia o de l'energia interna química dels components del sistema, en els anomenats mètodes de baixa energia.

En els mètodes d'alta energia la mida de gota de les nano-emulsions depèn de la quantitat d'energia suministrada, mentre que en els mètodes de baixa energia la mida de gota depèn de les propietats físico-químiques del sistema. La Figura 1.7 mostra una possible classificació dels mètodes de preparació de les nano-emulsions.

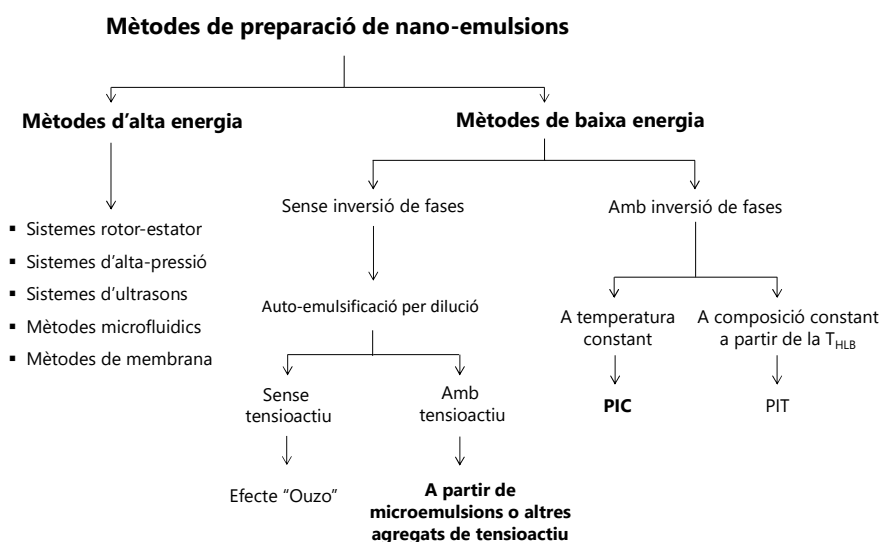


Figura 1.7. Classificació esquemàtica dels mètodes de preparació de nano-emulsions.

A continuació es descriuran ambdós tipus de mètodes amb una explicació més àmplia en els mètodes de baixa energia ja que han estat els mètodes utilitzats en la present tesi.

1.1.5.1. Mètodes d'alta energia

Els mètodes d'alta energia utilitzen equips mecànics per a generar la força necessària per a produir gotes molt petites (Maali, 2013). Els equips mecànics més utilitzats en la preparació de nano-emulsions són els **sistemes "Rotor-Estator"** (p.ex. mescladors, agitadors), els **sistemes d'alta-pressió** (p.ex. homogeneïtzadors), i els **sistemes d'ultrasons** (p.ex. sonda d'ultrasons). Així mateix, hi han altres mètodes d'alta energia que han estat desenvolupats en els darrers anys, com són els **mètodes microfluidics** que

INTRODUCCIÓ

generen gotes monodisperses amb un baix consum d'energia, i els **mètodes de membrana (Joscelyne, 2000), (Koroleva, 2012)**.

Durant el procés d'emulsificació, les gotes es trenquen si la força de deformació causada per l'energia mecànica aplicada al sistema sobrepassa la pressió de Laplace, que és la força interfacial que actua contra la deformació de les gotes. De l'equació 1.9 es dedueix que com més petites siguin les gotes que es vulguin obtenir més energia serà necessària suministrar al sistema.

$$P_L = \frac{2\gamma}{r} \quad (\text{Equació 1.9})$$

on γ és la tensió interfacial i r el radi de la gota esfèrica.

Els **sistemes rotor-estator** són àmpliament utilitzats per emulsionar líquids que presenten una viscositat mitjana-elevada. Al augmentar la intensitat de l'energia suministrada es pot reduir significativament la mida de gota, no obstant, en general no s'obtenen mides de gota inferiors a 200nm.

Els **sistemes d'alta-pressió** poden treballar a una pressió de 50-350 MPa (**Solans, 2005**). Així mateix, es poden utilitzar a baixes i a altes temperatures. Paràmetres del procés d'emulsificació com la temperatura, la pressió, nombre de cicles, així com paràmetres de formulació com el tipus i la concentració dels olis i tensioactius poden afectar les propietats i estabilitat de les nano-emulsions (**Petersen, 2012**). En general, la mida de gota de l'emulsió disminueix al augmentar la pressió i el nombre de cicles (Figura 1.8).

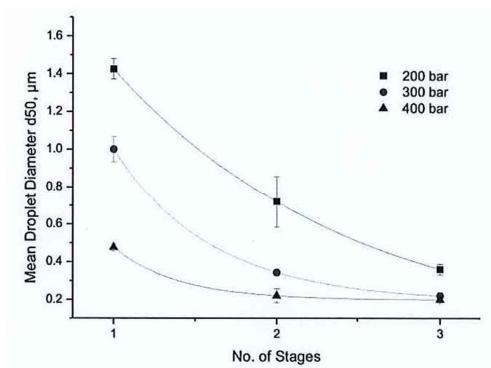


Figura 1.8. Efecte de la pressió en la mida de gota de nano-emulsions en funció del número de cicles per a diferents pressions utilitzant 5% de tensioactiu Tween 40 a 40°C (**Petersen, 2012**).

Els **sistemes d'ultrasons** són molt eficients en la reducció de la mida de gota, no obstant, aquest mètode és més adequat per a ser utilitzat a escala de laboratori ó per a lots petits. El temps de sonicació té un efecte important en la mida de gota. L'augment del temps de sonicació produeix un augment de l'energia suministrada al sistema el que indueix una

disminució de la mida de gota. No obstant, hi ha un límit a partir del qual si s'augmenta el temps de sonicació la mida de gota es manté invariable (**Maali, 2013**).

1.1.5.2. Mètodes de baixa energia

En els mètodes de baixa energia s'utilitza l'energia química continguda en el sistema per a generar gotes petites, de mida nanomètrica. En general, els mètodes de baixa energia produeixen gotes més petites i més uniformes que els mètodes d'alta energia. Contràriament als mètodes d'alta energia, els mètodes de baixa energia tenen un baix consum d'energia degut a que els equips utilitzats són agitadors tipus vòrtex. És per aquesta raó que es prefereix la utilització de mètodes de baixa energia als d'alta energia en la producció de nano-emulsions a gran escala ja que suposa un menor cost econòmic. Així mateix, els mètodes de baixa energia són molt utilitzats en la preparació de nano-emulsions per aplicacions farmacèutiques com en l'encapsulació de principis actius ja que aquests es podrien descomposar per aplicació d'elevada cisalla dels mètodes d'alta energia. Per totes aquestes raons els mètodes de baixa energia han despertat un gran interès en els darrers anys.

Els mètodes de baixa energia es poden classificar en funció de si es produeix inversió de la curvatura del film interfacial o no durant el procés d'emulsificació. Així, els mètodes de baixa energia es divideixen en dues categories: **d'auto-emulsificació** o emulsificació espontània i **d'inversió de fases**. La formació de nano-emulsions per auto-emulsificació s'origina per la ràpida difusió del tensioactiu i/o les molècules de solvent de la fase dispersa a la fase continua, mentre que la formació de nano-emulsions pels mètodes d'inversió de fases es produeix per les transicions de fases que es formen durant el procés d'emulsificació (**Solans, 2012**).

1.1.5.2.1. Mètodes d'auto-emulsificació (o emulsificació espontània)

Els mètodes d'auto-emulsificació o d'emulsificació espontània van ser descrits per primera vegada el 1878 per Miller (**Miller, 1988**). Aquest mètode aprofita l'energia química alliberada degut al procés de dilució en la fase continua, en general a temperatura constant, o mitjançant una suau agitació mecànica per a formar l'emulsió.

Una emulsió O/W es forma quan una solució d'oli en un solvent orgànic soluble en aigua (p.ex. acetona, etanol) es barreja amb aigua; el solvent orgànic polar difon en l'aigua donant lloc a una solució supersaturada d'oli en aigua. El sistema evoluciona formant gotes d'oli en una fase continua aquosa (**Miller, 1988**), (**Landreau, 2009**). La viscositat de l'oli, el N_{HLB} i la miscibilitat del solvent amb aigua són paràmetres importants en la

determinació de la qualitat de la nano-emulsió final obtinguda per aquest mètode (**Bouchemal, 2004**).

Està descrit la preparació de nano-emulsions per emulsificació espontània utilitzant copolímers tipus bloc (caprolactona i òxids d'etilè) i diversos tipus d'olis per aplicacions farmacèutiques. Li et al., han formulat nano-emulsions amb un agent de contrast no tòxic per imatge (x-ray imaging) mitjançant emulsificació espontània, les quals han mostrat una elevada estabilitat, biocompatibilitat i baixa toxicitat (**Li, 2013**). Així mateix, s'han preparat nano-emulsions catióniques mitjançant emulsificació espontània com sistemes d'alliberació (**Fraga, 2011**). La mida de gota d'aquests tipus de nano-emulsions sembla ser que està més afectada per la velocitat de difusió del solvent orgànic en aigua que per la composició de la formulació.

També es poden formar nano-emulsions O/W i W/O per **emulsificació espontània sense tensioactiu**, és l'anomenat efecte Ouzo (**Bouchemal, 2004**), (**Botet, 2012**), (**Bozeya, 2013**). L'Ouzo és un licor d'anís grec. Els principals components de l'Ouzo són el trans-anetol (aprox. 0.2% en volum), etanol (aprox. 45% en volum) i aigua (aprox. 55% en volum). L'anetol es pràcticament insoluble en aigua, però soluble en una mescla d'etanol/aigua. Quan s'afegeix una gran quantitat d'aigua algunes molècules d'alcohol es mouen de la fase orgànica cap a la fase aquosa, provocant la supersaturació de l'oli i la seva nucleació formant gotes petites de manera espontània (**Vitale, 2003**). Vitale i Katz han descrit que la mida de gota promig, la distribució de mida, i el nombre de gotes són controlables (dins d'un rang limitat) si es canvia les proporcions dels tres components, les seves densitats, la solubilitat entre ells, i la temperatura. Altres estudis han descrit que el creixement inicial de les gotes de manera espontània és degut a la difusió molecular, maduració d'Ostwald, el qual està molt influenciat per la concentració d'oli i alcohol presents (**Sitnikova, 2005**). Així mateix, l'estabilitat de les emulsions (uns mesos) sense floculació aparent o coalescència les fa adequades com a sistemes d'alliberació eficients de principis actius. L'efecte Ouzo es pot utilitzar com un mètode d'emulsificació per preparar una gran varietat de dispersions aquoses, com nanocàpsules, nanoesferes, inclòs liposomes o vesícules (**Ganachoud, 2005**).

La formació de nano-emulsions mitjançant auto-emulsificació per dilució de microemulsions O/W amb alcohol com a co-tensioactiu va ser descrit per primera vegada per Taylor i Ottewill (**Taylor, 1994**) en el sistema aigua/SDS/pentanol/dodecà. La dilució de la microemulsió en aigua produeix una disminució de la concentració de tensioactiu, d'aquesta manera les gotes deixen de ser termodinàmicament estables ja que la concentració de tensioactiu no és suficientment elevada per mantenir una tensió interfacial prou baixa necessària per tenir una estabilitat termodinàmica de la microemulsió. Aquest augment de la tensió interfacial fa el sistema inestable i les gotes tendeixen a augmentar formant així la nano-emulsió.

Solè et al. han estudiat la relació entre el procediment de dilució de l'estructura de la microemulsió inicial (O/W ó W/O) i les propietats de les nano-emulsions resultants, utilitzant sistemes similars als de Taylor i Ottewill. Els estudis han mostrat que es poden obtenir nano-emulsions de la mateixa mida de gota a partir de microemulsions O/W i W/O mitjançant el procediment de dilució adequat i de la composició. Si s'inicia l'emulsificació a partir de microemulsions O/W, s'obtenen sempre nano-emulsions de mida petita, independentment del procediment de dilució i de la composició. S'ha de mencionar que no hi ha inversió del film interfacial de tensioactiu durant el procés d'emulsificació. Contràriament, si s'inicia l'emulsificació a partir de microemulsions W/O els resultats depenen del procediment de dilució i/o de la composició inicial (**Solè, 2012**). Les nano-emulsions també es poden preparar per dilució amb aigua a partir d'altres agregats de tensioactius diferents de les microemulsions. Així, s'ha descrit la formació de nano-emulsions O/W per dilució amb aigua de fases de cristall líquid cúbic (**Solè, 2006**), (**Maestro, 2008**). Els estudis de comportament fàsic van mostrar la presència de fases de cristall líquid cúbic a unes determinades relacions oli-tensioactiu (Ros) i a continguts d'aigua relativament alts. Els estudis mostren que és necessari assolir l'equilibri en les fases de cristall líquid cúbic que es formen durant el procés d'emulsificació per tal d'obtenir mides de gotes petites. A més, també és necessari que la regió de cristall líquid es trobi propera a la zona on la nano-emulsió es forma. La caracterització del sistema va confirmar que la mida de gotes de les micel·les que formen la fase cúbica era el mateix o lleugerament més petit que la mida de gota de les nano-emulsions que es van obtenir.

1.1.5.2.2. Mètodes d'inversió de fases

Aquests mètodes utilitzen l'energia química alliberada en les transicions de fases que es formen en el sistema durant el procés d'emulsificació. El coneixement del comportament fàsic és important quan s'empren aquests mètodes, ja que les fases implicades en el procés d'emulsificació juguen un paper important en l'obtenció de nano-emulsions amb la mínima mida de gota i baixa polidispersitat. No obstant, la cinètica del procés d'emulsificació té també un paper important en les propietats de les nano-emulsions resultants, sobretot si fases que presenten una elevada viscositat (p.ex. fases de cristall líquid cúbic o hexagonal) es formen durant l'emulsificació (**Solans, 2012**). En aquests mètodes es produeix una inversió de la curvatura del film interfacial de positiva a negativa o viceversa a través d'estructures amb curvatura zero. Està descrit que les estructures que presenten una curvatura del film interfacial de tensioactiu nul·la (p.ex. microemulsions bicontínues o fases de cristall líquid laminar) són les que determinen la mida de la nano-emulsió final, (**Forgiarini, 2001**), (**Morales, 2003**), (**Fernandez, 2004**), (**Izquierdo, 2004**), (**Sadurní, 2005**), (**Solans, 2005**), (**Morales, 2006**), (**Wang, 2008**), (**Sonneville-Aubrun, 2009**), (**Roger, 2010**), (**Roger, 2011**).

Aquestes transicions de fases es poden generar mantenint la composició constant i variant la temperatura des de la T_{HLB} en les que les propietats hidròfiles-lipòfiles estan equilibrades, a temperatures més baixes (per obtenir O/W) ó a temperatures més altes (per obtenir W/O), és l'anomenat **mètode d'inversió per canvi de temperatura** "Phase Inversion Temperature" (PIT), o bé mantenint la temperatura constant, l'anomenat **mètode d'inversió per canvi de composició** "Phase Inversion Composition" (PIC).

- Mètode d'inversió de fases per canvi de temperatura (PIT)

El mètode PIT va ser introduït per primera vegada per Shinoda l'any 1968 i es basa en els canvis en la curvatura espontània del film interfacial del tensioactiu a la interfície oli-aigua amb la temperatura (**Shinoda, 1969**). Aquest mètode només pot ser emprat amb tensioactius sensibles a canvis amb la temperatura, p.ex. els tensioactius no iònics de tipus etoxilat en que els canvis de temperatura provoquen un canvi en la hidratació de les cadenes d'òxid d'etilè i això indueix un canvi en la seva curvatura. D'aquesta manera, a baixes temperatures aquests tensioactius són hidròfils donat que les cadenes d'òxid d'etilè estan hidratades i el film interfacial de tensioactiu presenta una curvatura positiva. Al augmentar la temperatura es produeix una deshidratació de les cadenes d'òxid d'etilè i aquests tensioactius es converteixen en lipòfils i la curvatura espontània del film interfacial esdevé negativa. A temperatures intermitges, l'anomenada T_{HLB} , les propietats hidròfiles i lipòfiles del tensioactiu estan equilibrades i la curvatura del film interfacial és zero (**Shinoda, 1968**).

El procediment per obtenir nano-emulsions pel mètode PIT consisteix en la preparació de la mostra a la temperatura d'inversió de fase (PIT) o la temperatura T_{HLB} , on les propietats hidròfiles i lipòfiles estan equilibrades i els valors de tensió interfacial són baixos, i en conseqüència es facilita l'emulsificació. En aquestes condicions es poden obtenir mides de gota molt petites. No obstant, donat que la curvatura del film interfacial de les gotes petites és molt elevada i al voltant de la T_{HLB} la curvatura espontània del film interfacial de tensioactiu és pròxima a zero, els fenòmens que s'oposen a la coalescència són baixos i per tant la velocitat de coalescència de les gotes és molt elevada (**Shinoda, 1969**), (**Kabalnov, 1996**). En conseqüència, a la T_{HLB} tot i que l'emulsificació en gotes molt petites està afavorida, les emulsions són molt inestables. La temperatura ha de ser canviada de manera brusca de la T_{HLB} refredant o escalfant segons es vulgui obtenir emulsions O/W o W/O, respectivament, per tal de generar nano-emulsions cinèticament estables. Si el refredament o l'escalfament no és prou ràpid la coalescència domina el procés i es formen emulsions polidisperses. Kunieda va demostrar la relació lineal entre la T_{HLB} i el N_{HLB} del tensioactiu (**Kunieda, 1985c**):

$$T_{HLB} = K_{oil} (N_{HLB} - N_{oil}) \quad (\text{Equació 1.10})$$

on K_{oil} és una constant que té un valor proper a 17 i és independent del tipus d'oli estudiat. En canvi, el N_{oil} és un paràmetre que varia molt en funció de l'oli (**Kunieda, 1985c**). S'ha de mencionar que l'equació 1.10 és vàlida per a sistemes ternaris purs i que per tant no es pot aplicar en sistemes comercials, atès que en aquests sistemes el PIT depèn de la concentració de tensioactiu a la mescla.

Els estudis de comportament fàsic han mostrat que les nano-emulsions obtingudes pel mètode PIT utilitzant tensioactius no iònics del tipus etoxilat presenten la menor mida de gota quan l'emulsificació s'inicia a partir d'una fase de microemulsió bicontínua o en una fase de microemulsió en equilibri amb una fase aquosa isòtropa o amb una fase de cristall líquid laminar (**Taisne, 1998**), (**Morales, 2003**), (**Izquierdo, 2004**), (**Morales, 2006**). Morales et al han suggerit que la condició necessària per la formació de nano-emulsions amb mida de gota mínima és que els components tensioactius i oliosos es trobin a la mateixa fase, independentment de si la fase inicial és monofàsica o multifàsica. Així mateix es va evidenciar que quan l'emulsificació s'inicia a partir de composicions en que coexisteixen una fase aquosa i una de microemulsió la formació de les gotes de nano-emulsió està principalment controlada per l'estructura de la fase de microemulsió i l'excés d'aigua actua com a medi de dilució (**Morales, 2003**). Per altra banda, altres autors senyalen que la mida de la gota d'una nano-emulsió està determinada per la ràpida difusió de les molècules de tensioactiu de la fase oliosa a la fase aquosa, així aquest desplaçament turbulent indueix la generació de les nano-emulsions, com passa en el cas de l'emulsificació espontània (**Anton, 2009**).

Roger et al. han estudiat recentment el mètode PIT en detall i han proposat una variant del mètode PIT conegut com a mètode sub-PIT (**Roger, 2010**). Les nano-emulsions O/W s'obtenen mitjançant agitació de la mostra a una temperatura una mica per damunt del lílindar anomenat "clearing boundary" en el que hi ha present microemulsió O/W, que presenta la menor terbolesa i està localitzada per sota del PIT, d'aquí el nom de sub-PIT. Llavors, quan es realitza un refredament ràpid de la mostra mentre aquesta està en agitació s'obté una nano-emulsió. La mida de gota és semblant a l'obtinguda pel mètode PIT. No obstant, s'ha de mencionar que a diferència del mètode PIT el mètode sub-PIT no implica inversió del film interfacial de tensioactiu, és per aquesta raó que aquest mètode no es pot considerar com un mètode d'inversió de fases. Tanmateix, s'ha de destacar que Shinoda ja havia estudiat prèviament la formació de nano-emulsions a temperatures per sota de la temperatura PIT (**Shinoda, 1969**). Shinoda va observar que les emulsions amb una mida de gota més petita van ser obtingudes si l'emulsificació es produïa 2-4°C per sota de la temperatura PIT i després refredant. Aquest mètode sub-PIT ha estat utilitzat en la formació de nano-emulsions estabilitzades per mesclades de tensioactius no iònics amb catiònics (**Mei, 2011**).

- Mètode d'inversió de fases per canvi de composició (PIC)

El mètode PIC consisteix en afegir gradualment un dels components (aigua o oli) a la mescla dels altres dos components (oli-tensioactiu o aigua-tensioactiu, respectivament) (**Forgiarini, 2001**), (**Usón, 2004**), (**Sadurní, 2005**), (**Roger, 2011**), (**Ševčíková, 2012**), (**Yu, 2012**), (**Pan, 2014**), Per a producció a gran escala és preferible el mètode PIC al mètode PIT, ja que experimentalment és més fàcil afegir un component als altres dos que canviar la temperatura i és més adequat si es treballa amb components i/o additius sensibles a la temperatura, com p.ex. la majoria del principis actius farmacèutics. Així mateix, el mètode PIC no està limitat a l'ús de tensioactius tipus etoxilats, com el mètode PIT. No obstant, s'ha de tenir en compte que en els mètodes d'emulsificació les condicions han de ser revisades quan altres substàncies són introduïdes, p. ex. quan es realitza l'encapsulació d'un principi actiu (**Koroleva, 2012**).

En la preparació de nano-emulsions O/W pel mètode PIC en sistemes aigua/tensioactiu no iònic etoxilat/oli, l'estat inicial correspon generalment a una microemulsió W/O, i s'afegeix aigua de manera gradual. Així, al augmentar la fracció en volum d'aigua augmenta progressivament la hidratació de les cadenes d'òxid d'etilè, i la curvatura espontània del film interfacial de tensioactiu canvia de negativa a zero. En aquesta situació, les propietats hidròfiles-lipòfiles del tensioactiu estan equilibrades, i en conseqüència es formen estructures que presenten curvatura zero (p.ex. microemulsions bicontínues o fases de cristall líquid laminar). Al continuar augmentant el contingut d'aigua les estructures amb curvatura zero es separen en gotes (O/W) metaestables i tot seguit es forma la nano-emulsió. La (Figura 1.9) mostra una representació esquemàtica de la formació de la nano-emulsió O/W pel mètode PIC, així com de l'evolució de la macroestructura i de la curvatura espontània del film interfacial durant el procés d'emulsificació.

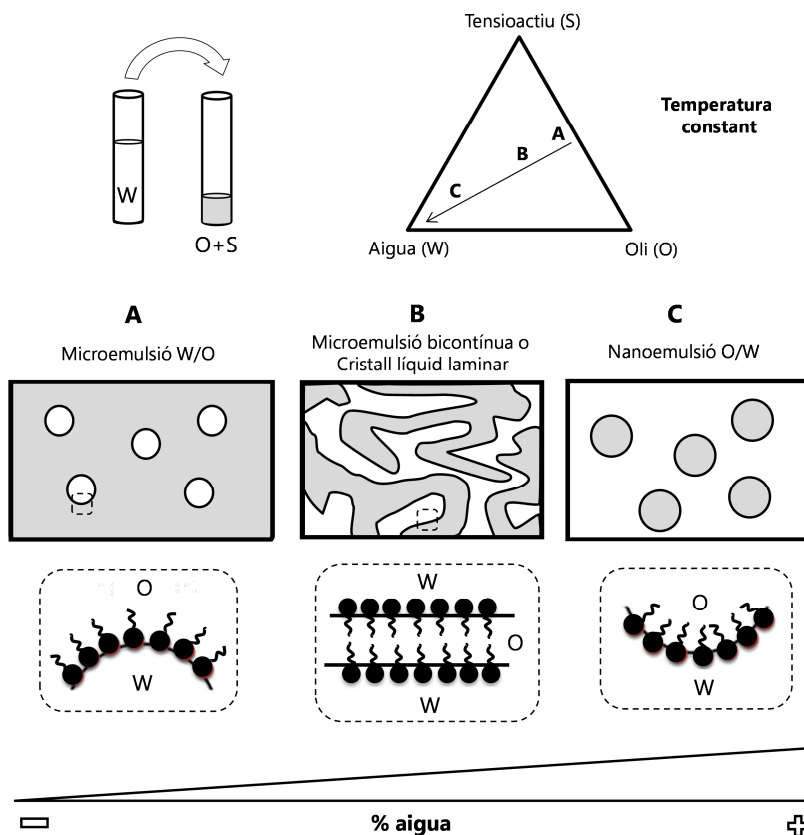


Figura 1.9. Representació esquemàtica de la formació de la nano-emulsió O/W pel mètode PIC en un sistema aigua/tensioactiu no iònic etoxilat/oli.

Estudis sobre la preparació de nano-emulsions en sistemes aigua/Brij30/deca mitjançant l'addició successiva d'aigua a mescles d'oli-tensioactiu van posar de manifest que s'obtenien nano-emulsions quan hi havia un equilibri de tres fases: microemulsions O/W, cristall líquid laminar i fase d'oli (**Forgiarini, 2001**). Els autors d'aquest estudi suggereixen que tot i les propietats de les fases en equilibri, la cinètica en el procés d'emulsificació tindria un paper important en la formació de nano-emulsions. Sadurni et al. han obtingut nano-emulsions O/W pel mètode PIC amb una mida de gota molt petita en el sistema aigua/CremophorEL/Migliol adequat per aplicacions farmacèutiques. Es van estudiar diverses maneres d'incorporar l'aigua. La menor mida de gota i els menors índexs de polidispersitat es van obtenir quan l'aigua va ser afegida per addicions successives a mescles d'oli-tensioactiu a 70°C. L'estudi va mostrar que l'homogeneïtzació del tensioactiu i de l'oli abans de l'addició d'aigua i la presència de fases de cristall líquid laminar presents durant l'emulsificació són factors importants en la formació de nano-emulsions per aquest mètode (**Sadurní, 2005**).

Roger et al. han investigat el mètode PIC i han comparat aquest mètode amb el mètode PIT (**Roger, 2010**), (**Roger, 2011**). Aquests estudis han mostrat que ambdós processos presenten seqüències en els canvis de la curvatura del film interfacial de tensioactiu semblants, no obstant, les estructures dels respectius estats inicials són diferents, per tant, els mecanismes de formació de nano-emulsions pels mètodes PIC i PIT serien diferents. En l'emulsificació pel mètode PIC l'estat inicial és una fase bicontínua tipus esponja. L'emulsificació es produeix a partir de la nucleació de l'oli en la fase en la que la curvatura del film interfacial és menor, i la nano-emulsió final que s'obté mostra una distribució de mides bimodal. Contràriament, en el sistema que ells estudien el mètode PIT presenta una estructura tipus oli-aigua. La mida de gota de la nano-emulsió final s'obté com a resultat del millor compromís geomètric entre el volum de la fase dispersa i l'àrea que pot ser coberta per les molècules de tensioactiu. En conseqüència, els autors d'aquest estudi conclouen que per a una composició donada el mètode PIT és més eficient que el mètode PIC per obtenir nano-emulsions amb mida de gota petita i distribucions de mida estretes.

La distribució de mides bimodal observada per Roger et al. han estat també descrits per Heunemann et al. (**Heunemann, 2011**). Aquests autors van caracteritzar nano-emulsions O/W preparades pel mètode PIC mitjançant les tècniques de "SANS" i "cryo-TEM" i van demostrar que les nano-emulsions obtingudes pel mètode PIC mostraven distribucions de mides de gota bimodal amb una mida de gota promig de 30 i 60-80 nm, respectivament. La mida de gota més petita va estar en concordança amb la mida prevista per gotes de microemulsió. Els autors d'aquest estudi també han demostrat que la proporció relativa de cada població depèn de la quantitat d'aigua afegida, el que comporta un creixement de la mida de gota promig al augmentar la dilució. No obstant, s'ha de destacar que Sadurni et al. ja havien descrit amb anterioritat la formació de nano-emulsions pel mètode PIC amb mides de gota menors a 40nm (**Sadurní, 2005**).

1.1.6. Aplicacions de les nano-emulsions

Les nano-emulsions són sistemes amb diverses aplicacions tecnològiques en el camp cosmètic, farmacèutic, alimentació i en disseny de nanomaterials degut a les propietats que presenten (**Maali, 2013**): petita mida de gota, elevada àrea interfacial, elevada capacitat de solubilització, aspecte transparent-translúcid, baixa viscositat i elevada estabilitat cinètica en front la sedimentació/cremat.

En la indústria alimentària s'han utilitzat les nano-emulsions per a l'encapsulació de compostos funcionals, per l'estabilització d'aromes i sabors o en la conservació d'aliments (**McClements, 2010**), (**McClements, 2013**), (**Komaiko, 2016**). En el camp cosmètic s'han utilitzat en una ampla varietat de productes d'higiene i cura personal com protectors

solars, netejadors facials, xampús, etc (Sonneville-Aubrun, 2004), (Tal-Figiel, 2008). A més, algunes formulacions cosmètiques poden contenir principis actius amb acció hidratant, protector solar, entre d'altres. Depenent de la naturalesa del principi actiu aquest es solubilitza a la fase oliosa o aquosa. Així depenent de l'aplicació s'utilitzen nano-emulsions O/W o W/O. En la indústria farmacèutica s'han utilitzat nano-emulsions com a sistemes d'alliberació de principis actius i vacunes, així com a agents diana per tal que el principi actiu sigui dirigit cap a un òrgan específic del cos (Bhatt, 2011), (Sun, 2012), (Alayoubi, 2013). Degut a les seves propietats fan que puguin ser administrades per diverses vies: parenteral, oral, cutània, transdèrmica, oftàlmica, rectal i nasal (Shakeel, 2012), (Gallarate, 2013). Una altre aplicació de les nano-emulsions és la seva utilització com a plantilla en la preparació de nanopartícules (Anton, 2008), (Lai, 2014), (Fornaguera, 2015a,b). Atès que aquesta és l'aplicació estudiada en la present tesi a continuació es descriu en detall.

1.1.6.1. Nanopartícules polimèriques

Les nanopartícules polimèriques per a ús farmacèutic són partícules sòlides col·loïdals amb una mida en el rang 10-1000 nm ($1\mu\text{m}$) en el que el principi actiu es troba dissolt, atrapat, encapsulat, adsorbit o unit a la matriu polimèrica (Kreuter, 2007), (Lai, 2014). Les nanopartícules polimèriques presenten importants avantatges en front d'altres sistemes col·loïdals d'alliberació de principis actius com els liposomes, les microemulsions, etc. Entre els seus avantatges estan la morfologia rígida que proporciona una estabilitat col·loïdal més elevada i també el fet que les nanopartícules poden ser funcionalitzades. Les nanopartícules es poden dividir en dos grups: nanocàpsules i nanoesferes (Vauthier, 2009).

Les **nanocàpsules** són nanopartícules sòlides amb una carcassa rígida que envolta el nucli. El nucli pot ser semi-sòlid, líquid, i lipòfil o hidròfil. Les **nanoesferes** són matrius homogènies la massa de la qual és sòlida i normalment són esfèriques. Ambdós tipus de nanopartícules poden ser preparats utilitzant nano-emulsions com a plantilla. La Figura 1.10 mostra una representació esquemàtica de l'estructura de nanopartícules polimèriques amb un fàrmac encapsulat o adsorbit.

Les nanopartícules polimèriques es poden obtenir mitjançant diferents mètodes com la polimerització, nanoprecipitació, utilitzant nano-emulsions com a plantilla, etc. Les nanopartícules polimèriques obtingudes a partir de nano-emulsions O/W com a plantilla es poden preparar a partir de dos mètodes diferents: la polimerització d'un monòmer o utilitzant polímers preformats. La utilització de polímers preformats presenta l'avantatge que no es generen productes residuals com en el cas de la polimerització ja que s'evita la reacció entre el monòmer i el principi actiu (Anton, 2008), (Vauthier, 2009), (Calderó,

2011), (Fornaguera, 2015a). El polímer preformat dissolt en el solvent orgànic forma la fase dispersa de la nano-emulsió O/W. En el cas que l'objectiu sigui encapsular un principi actiu en la nanopartícula aquest ha de ser dissolt en la mescla polímer/solvent abans del procés d'emulsificació. Finalment, mitjançant l'evaporació del solvent de la nano-emulsió es forma la nanopartícula polimèrica.

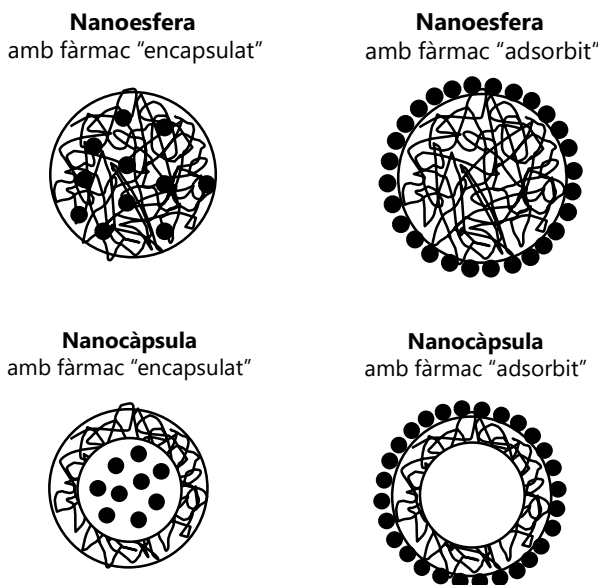


Figura 1.10. Representació esquemàtica de l'estructura dels diferents tipus de nanopartícules polimèriques.

Així, un mètode per a preparar nanopartícules polimèriques per a l'alliberació de principis actius és utilitzant nano-emulsions com a plantilla fent servir polímers pre-formats dissolts en un solvent orgànic en la fase dispersa seguida de l'evaporació del solvent (Soppimath, 2001), (Kumari, 2010).

Les nanopartícules per a ús farmacèutic han de ser formulades amb components biocompatibles i biodegradables per tal d'evitar problemes de toxicitat. Entre els polímers preformats sintètics un dels més utilitzats és l'àcid (poli(D,L-làctic-co-glicòlic) (PLGA) degut a la seva biocompatibilitat i biodegradabilitat, i a més està aprovat per a ús terapèutic en humans per la FDA (Muthu, 2009), (Danhier, 2012).

- Alliberació de principis actius des de dispersions de nanopartícules a solucions receptores

Els estudis d'alliberació *in vitro* són importants en el desenvolupament d'una formulació, per exemple, farmacèutica, ja que és important poder predir els nivells plasmàtics que assolirà el fàrmac una vegada administrat. S'han desenvolupat nombrosos models matemàtics que permeten predir les cinètiques de dissolució-alliberació dels principis actius que es troben en sistemes d'alliberació controlada, i per tant, la seva biodisponibilitat *in vivo*. Aquests models permeten interpretar els resultats quantitius d'un assaig d'alliberació *in vitro* a través d'una equació que relaciona varis paràmetres. Es poden emprar mètodes matemàtics (mètodes model depenent) i mètodes estadístics (mètodes model independent). A continuació es descriuen els models matemàtics que s'han utilitzat en aquest treball.

- Model Higuchi

Higuchi (1961) va desenvolupar varis models matemàtics teòrics per estudiar l'alliberació de fàrmacs solubles i poc solubles incorporats en matrius sòlides o semi-sòlides (**Higuchi, 1963**), (**Costa, 2001**). Aquest model descriu l'alliberació del fàrmac com un procés de difusió a través de la matriu de polímer, sempre i quan es mantinguin les condicions "sink", és a dir, que es garanteixi la solubilitat del fàrmac en tot l'assaig. Aquesta difusió està basada en la llei de Fick, que depèn de l'arrel quadrada del temps. En general, es fa servir el que es coneix com l'equació simplificada d'Higuchi:

$$Q = K_H t^{1/2} \quad (\text{Equació 1.11})$$

on Q és la quantitat de fàrmac alliberat i K_H és la constant de dissolució d'Higuchi.

- Model de Baker-Lonsdale

Aquest model va ser desenvolupat per Baker i Lonsdale (1974) a partir del model d'Higuchi i descriu l'alliberació controlada del principi actiu que es troba en una matriu esfèrica i està representat per la següent expressió (**Costa, 2001**):

$$f_t = \frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = kt \quad (\text{Equació 1.12})$$

on M_t és la quantitat de principi actiu alliberada a temps t , M_∞ és la quantitat de fàrmac que s'alliberaria a temps infinit, així M_t/M_∞ és la fracció de principi actiu alliberat a temps t , i k és la constant d'alliberació i pendent de la recta.

- Model de Korsmeyer-Peppas

Korsmeyer *et al.* (1983) van desenvolupar un model semi-empíric senzill que relaciona l'alliberació de fàrmac amb el temps a través d'una equació exponencial (**Korsmeyer, 1983**), (**Costa, 2001**).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n \quad (\text{Equació 1.13})$$

on **k** és una constant cinètica característica del sistema principi actiu/polímer (que incorpora característiques estructurals i geomètriques de la forma farmacèutica en la que es troba el principi actiu), **n** és l'exponent d'alliberació, que és indicatiu del mecanisme d'alliberació del principi actiu (Taula 1.4). En la determinació de l'exponent **n** només s'ha de considerar la zona de la corba d'alliberació amb una fracció de principi actiu alliberat menor a 0.6.

Taula 1.4. Interpretació dels mecanismes d'alliberació de principis actius que es troben en matrius polimèriques (**Korsmeyer, 1983**), (**Costa, 2001**).

| Exponent d'alliberació (n) | Mecanisme de transport del principi actiu | Velocitat en funció del temps |
|----------------------------|---|-------------------------------|
| 0.5 | Difusió de Fick | $t^{-0.5}$ |
| $0.5 < n < 1.0$ | Transport anòmal | t^{n-1} |
| 1.0 | Transport Cas II | Ordre zero |
| > 1.0 | Transport Super-Cas II | t^{n-1} |

El mecanisme de transport anòmal s'associa a un mecanisme de difusió no Fickià. En aquest cas el procés està dominat per processos de difusió i relaxació de les cadenes polimèriques. El mecanisme de transport Cas-II és un cas límit del transport no Fickià que correspon a una cinètica d'ordre zero. En aquest cas, el transport del principi actiu es realitza a velocitat constant degut a que el front d'inflament del polímer augmenta de manera constant. El mecanisme de transport Super-Cas II, succeeix en general quan els temps d'alliberació són molt elevats.

Els valors de **n < 0.5** s'associen a la presència de porus a la matriu polimèrica i a la consegüent difusió simultània a través de la matriu inflada i a través dels porus plens de medi de dissolució.

En general, aquest model s'utilitza quan es desconeix el mecanisme d'alliberació de les formes polimèriques de dosificació farmacèutica o quan es troben implicats més d'un fenomen d'alliberació.

S'ha de mencionar que a més dels models emprats en el present treball es poden trobar en la literatura altres models matemàtics per ajustar les corbes d'alliberació (Costa, 2001).

1.2. Mètodes de caracterització

1.2.1. Estimació dels coeficients de difusió mitjançant la tècnica d'espectroscopia de ressonància magnètica nuclear (RMN)

El terme difusió és utilitzat per descriure molts processos diferents. En RMN, la difusió es pot referir a difusió de "spin", difusió rotacional o difusió translacional. En aquest treball es fa referència a la difusió molecular, una forma de difusió translacional deguda al moviment Brownià de les molècules en solució. En el moviment degut a la difusió molecular, la translació de les molècules és deguda només a la seva energia cinètica. Al moure's les molècules col·lionen entre sí i canvien la direcció del moviment. Amb el temps, el moviment d'una molècula segueix un camí aleatori que resulta en una propietat coneguda com coeficient de difusió, D . El coeficient de difusió descriu la distància quadràtica que una molècula es mou en un medi específic durant un interval de temps específic. Per això el coeficient de difusió es defineix individualment per a cada molècula en un dissolvent donat i a una temperatura específica. Representa la facilitat amb que la molècula es mou en un dissolvent determinat i depèn bàsicament de la mida i forma de la molècula, de la temperatura i de la viscositat del dissolvent. Així l'augment de la mida de la molècula o de la viscositat del dissolvent dificulta la difusió, mentre que l'augment de la temperatura, en general, l'accelera. Les unitats del S.I. en les que es sol expressar el coeficient de difusió són m^2/s .

La seqüència de pulsos "pulsed-field gradient spin-echo" (PFGSE) és l'experiment bàsic en RMN utilitzat per determinar el valor del coeficient de difusió D (Vold, 1968), (Lindman, 1981), (Price, 1997). No obstant, en els darrers anys s'han desenvolupat noves seqüències de pulsos a partir de la PFGSE per a la determinació de D per tal de millorar la precisió de les mesures. Una de les seqüències utilitzades per estimar els coeficients de difusió D és la que utilitza pulsos bipolars per estimular el "spin-echo", el "bipolar pulse pair stimulated echo" (BPPSTE) (Wu, 1995), (Liu, 2009). Aquest tipus d'experiment permet disminuir les corrents d'eddy (Antalek, 2002), millorar la inhomogeneïtat del camp magnètic B_0 , així com l'efecte de desplaçament químic durant l'aplicació dels gradients.

Per a la determinació experimental del valor de D s'adquireixen una sèrie d'espectres de 1H utilitzant una seqüència basada en PFGSE en la que s'augmenta progressivament la força dels gradients i s'analitza l'atenuació de la intensitat de les senyals o pics en cada espectre (Figura 1.11).

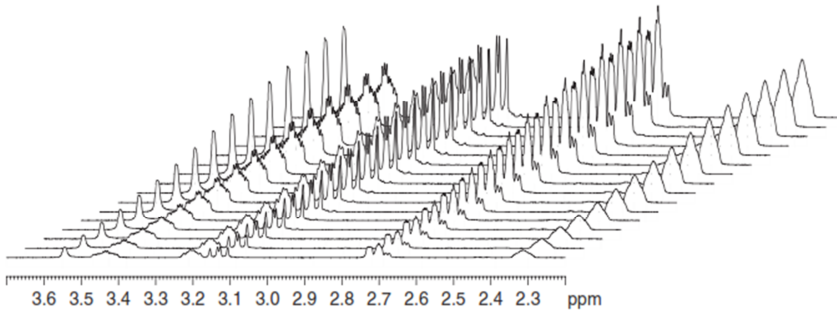


Figura 1.11. Espectres de protó (^1H) que mostren la progressiva caiguda de la intensitat en funció de l'augment del gradient (des del darrere cap endavant) (Claridge, 2009).

La relació que hi ha entre la intensitat de la senyal observada, I_G , que s'obté al utilitzar gradients G és una funció exponencial descrita per l'equació Stejskal-Tanner (Equació 1.14):

$$I_G = I_{G=0} \exp\left(-(\gamma\delta G)^2 D \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)\right) \quad (\text{Equació 1.14})$$

on I_0 és la intensitat de la senyal de referència (amb intensitat de gradient nul·la), δ és la durada dels gradients (en segons), Δ és la separació entre els gradients (en segons) i γ és la constant de radi giromagnètica del nucli.

A partir de l'ajust per regressió de la intensitat del pic I_G en funció del gradient al quadrat G^2 (Figura 1.12) es pot extreure el coeficient de difusió D , ja que la resta de termes de l'Equació 4 es mantenen constants durant les condicions experimentals.

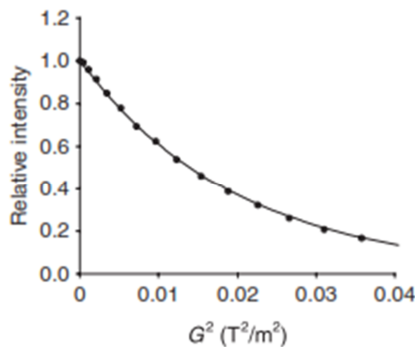


Figura 1.12. Anàlisi per regressió per tal d'obtenir el coeficient de difusió a partir d'un ajust exponencial del perfil de caiguda de la intensitat (I_G) en funció del gradient al quadrat (G^2), (Claridge, 2009).

Degut a que els pics d'un mateix component presenten el mateix valor de D , és possible utilitzar els experiments de difusió per separar i identificar les senyals de components diferents d'una mateixa mescla. Una manera de representar els resultats de les dades de difusió és l'anomenat mètode DOSY "Diffusion Ordered Spectroscopy" (Johnson, 1999). Aquest mètode consisteix en l'adquisició i el processat automàtic d'una sèrie d'espectres de difusió adquirits amb un increment de la intensitat del gradient. En el processat s'aplica la transformada de Fourier i el resultat és la sèrie d'espectre de ^1H , als quals se'ls hi aplica una transformada de Laplace inversa. El resultat final és una representació 2D amb l'espectre de RMN en l'eix x i el coeficient de difusió D en l'eix y (Figura 1.13). El centre del pic en la dimensió de l'eix de difusió indica el valor del coeficient de difusió D i l'amplada senyala l'error de l'ajust (Claridge, 2009).

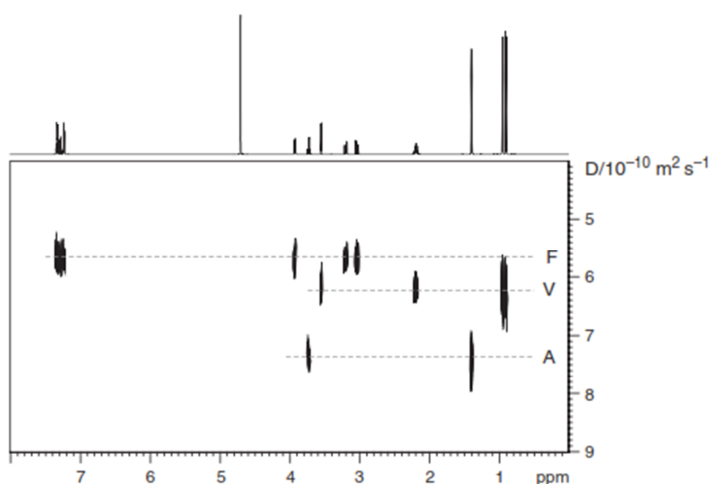


Figura 1.13. Representació DOSY. L'espectre mostra la separació de senyals en una mescla equimolar de tres aminoàcids L-amino, alanina (A), valina (V) i fenilalanina (F) en solució aquosa a 298K segons els seus coeficients de difusió representats en l'eix vertical, (Claridge, 2009).

Si es produeixen solapament de pics, existeixen programes computacionals eficients (DECRA, CORE, SPLMOD, CONTIN, etc) (Johnson, 1999), (Antalek, 2002) amb algorismes capaços d'analitzar el conjunt de dades resultants de les transformades de Fourier i Laplace inversa i obtenir posteriorment les representacions DOSY. No obstant, és important conèixer els avantatges i les febleses de cada un d'ells així com la possible aparició d'artefactes indesitjats.

Per tal d'avaluar el coeficient de difusió en termes d'estructura és necessari determinar el coeficient de difusió relatiu de l'aigua $(D/D_o)_{\text{aigua}}$ i de l'oli $(D/D_o)_{\text{oli}}$ present en la mostra a una temperatura determinada, que s'obté dividint els respectius coeficients de

difusió de l'aigua i de l'oli en la mostra D_w , D_o , pels coeficients de difusió dels mateixos, purs, D_o^{aigua} , D_o^{oli} (Liu, 2009).

S'ha descrit que si els coeficients de difusió relatius (D/D_o) de l'aigua i de l'oli difereixen en més d'un ordre de magnitud, l'estructura que presenta la mostra és discreta. Contràriament, si els valors dels coeficients de difusió relatius de l'aigua i de l'oli són del mateix ordre és indicatiu que la mostra presenta estructura bicontínua (Libster, 2006), (Fanun, 2009).

1.2.2. Caracterització de la mida i forma de les gotes mitjançant la tècnica de dispersió de la llum làser

Quan un feix de llum incideix sobre una dispersió col·loïdal de nanopartícules en la que aquestes presenten un índex de refracció que difereix de l'índex de refracció del solvent, les partícules dispersaran la llum en totes direccions. Així, si s'il·lumina amb un feix de llum làser la mostra, la intensitat de llum dispersada pot ser mesurada en funció de l'angle de dispersió θ . Les tècniques de dispersió dinàmica i estàtica de la llum làser (DLS i SLS) es basen en el contrast dels índexs de refracció per a realitzar les mesures i poder obtenir informació sobre la mida, forma i estructura de les nanopartícules.

1.2.2.1. Determinació de la mida de gota per dispersió dinàmica (DLS)

En la tècnica de dispersió dinàmica de llum làser "dynamic light-scattering" (DLS) es mesuren les fluctuacions en la intensitat de llum dispersada I en funció del temps (Figura 1.14a) a un angle θ determinat de la direcció de la llum incident.

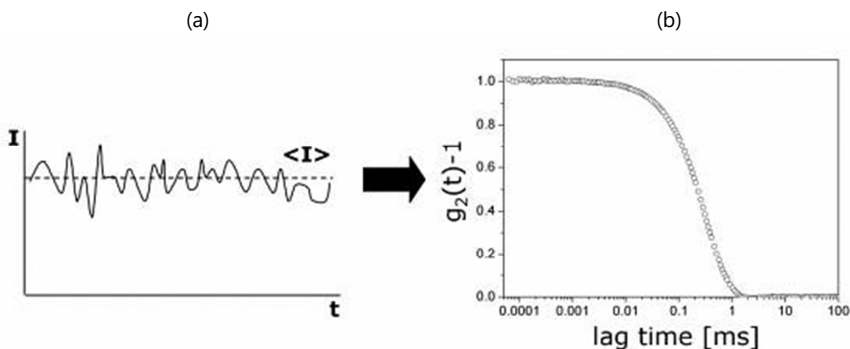


Figura 1.14. (a) Fluctuacions en la intensitat de llum dispersada en funció del temps mesurada per DLS, (b) Funció d'autocorrelació, (lag time = τ). (www.lsinstruments.com)

A partir d'aquestes mesures s'extreu la funció d'autocorrelació normalitzada (Figura 1.14b), que mesura la intensitat de llum dispersada a un temps t i la intensitat després d'un cert temps "lag time" τ , i s'expressa com:

$$g^{(2)}(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle_t}{\langle I(t) \rangle_t^2} \quad (\text{Equació 1.15})$$

on $\langle I(t)I(t+\tau) \rangle_t$ indica un promig amb el temps.

A partir de la funció d'autocorrelació es pot obtenir el valor del coeficient de difusió mitjançant diversos anàlisis matemàtics. En la present tesi s'expliquen els mètodes matemàtics d'anàlisi que s'han emprat de menor a major complexitat: "Multi-angle DLS", "Cumulants", i CONTIN. En tots tres procediments matemàtics s'assumeix que el sistema està suficientment diluït per tal que no hi hagi interacció entre les partícules, i que les partícules presenten forma esfèrica.

- Multi-angle DLS

La funció d'autocorrelació de la intensitat de llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ està directament relacionada amb la funció d'autocorrelació del camp elèctric per la següent expressió:

$$g^{(1)}(\tau) = a|g^2(\tau) - 1|^{1/2} \quad (\text{Equació 1.16})$$

on la constant a és proporcional a l'amplitud de la senyal dispersada. Per solucions de nanopartícules col·loïdals monodisperses, polímers, proteïnes, etc., en règim diluït, els objectes estan suficientment aïllats que no hi ha interacció entre ells, llavors la funció d'autocorrelació del camp elèctric mostra un perfil de caiguda monoexponencial amb el temps. L'aproximació més senzilla és analitzar la funció d'autocorrelació del camp elèctric $g^{(1)}(\tau)$ com una caiguda monoexponencial. Aquesta aproximació és adequada si la mostra presenta una població monodispersa.

$$g^{(1)}(\tau) = a \exp(-\Gamma\tau) \quad (\text{Equació 1.17})$$

La velocitat de caiguda "decay rate" Γ depèn del vector de llum de dispersió q i del coeficient de difusió de la partícula, D :

$$\Gamma = Dq^2 \quad \text{i} \quad q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{Equació 1.18 i 1.19})$$

on n indica l'índex de refracció del medi i λ indica la longitud d'ona de la radiació incident.

INTRODUCCIÓ

Així, substituint l'Equació 1.18 a l'Equació 1.16 i fent el logaritme s'obté la següent expressió:

$$\ln(g^{(2)}(\tau) - 1) = -2\Gamma\tau \quad (\text{Equació 1.20})$$

Tot i que, en principi, només és necessari realitzar la mesura a un únic angle de dispersió θ per tal d'obtenir el coeficient de difusió D , a la pràctica, la velocitat de caiguda "decay rate" Γ s'obté a partir de la mesura de la funció d'autocorrelació $g^{(2)}(\tau)$ a diferents angles θ per cada mostra. La representació de Γ en front q^2 exhibeix una línia recta, el pendent de la qual proporciona una estimació del coeficient de difusió D (Equació 1.18). Finalment, assumint que les partícules són esfèriques, a partir de l'equació d'Stokes-Einstein es pot obtenir el radi hidrodinàmic R_h .

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (\text{Equació 1.21})$$

on η és la viscositat de la solució, k_B és la constant de Boltzmann, i T la temperatura absoluta.

- Cumulants

El mètode d'anàlisi de Cumulants és un mètode d'anàlisi simple de la funció d'autocorrelació generada a partir d'un experiment de DLS (**Koppel, 1972**), (**Friskens, 2001**).

En aquest mètode d'anàlisi s'assumeix que la mostra és polidispersa (**Pecora, 2000**), (**Pons, 2006**), (**Instruments, 2015**). D'aquesta manera, la funció d'autocorrelació del camp elèctric $g^{(1)}(\tau)$ s'expressa com una suma de caigudes exponencials corresponents a cada una de les espècies en la població:

$$g^{(1)}(\tau) = \sum_i A_i \exp(-\Gamma_i \tau) \quad (\text{Equació 1.22})$$

si es realitza una expansió de Taylor l'Equació 1.22 queda com:

$$g^{(1)}(\tau) = \exp(-\Gamma\tau + \frac{\mu_2}{2}\tau^2 + \dots) \quad (\text{Equació 1.23})$$

Així, el logaritme de la funció d'autocorrelació es pot expressar com una sèrie en el temps:

$$\ln(g^{(1)}(\tau)) = -K_1\tau + \left(\frac{1}{2}\right)K_2\tau^2 + \dots \quad (\text{Equació 1.24})$$

on els coeficients K_n són els cumulants.

El primer Cumulant, K_1 , que està relacionat amb la mitjana del radi hidrodinàmic (mida de partícula) es defineix com:

$$K_1 = \frac{k_B T q^2}{6\pi\eta R_h} \quad (\text{Equació 1.25})$$

on k_B és la constant de Boltzmann, q és el mòdul del vector de dispersió, R_h és el radi hidrodinàmic, T és la temperatura absoluta i η és la viscositat.

Aplicant l'equació per a partícules esfèriques (Stokes-Einstein) ja definida prèviament (Equació 1.21) l'Equació 1.25 es pot expressar com:

$$K_1 = Dq^2 = \Gamma \quad (\text{Equació 1.26})$$

Així el primer cumulant K_1 és igual a la velocitat de caiguda "decay rate" Γ de la funció d'autocorrelació.

El segon cumulant K_2 fa referència a la polidispersitat de la distribució de la mida de partícula. Està relacionat mitjançant l'Equació 1.24 amb el terme amplada "width" que apareix en el software d'anàlisi (**Instruments, 2015**) i que es refereix a la varianza promig σ_R en la distribució de la mida de partícula.

$$\text{"width"} = \sigma_R = \sqrt{K_2} \left[\frac{6\pi\eta R_h^2}{k_B T q^2} \right] \quad (\text{Equació 1.27})$$

Així substituint l'Equació 1.27 a l'Equació 1.25 el terme "width" es pot expressar com:

$$\text{"width"} = \sigma_R = \frac{\sqrt{K_2}}{K_1} R_h \quad (\text{Equació 1.28})$$

L'índex de polidispersitat (PDI) es defineix com la relació entre el "width" i el R_h per mitjà de la següent expressió:

$$PDI = \frac{\text{"width"}}{R_h} = \frac{\sqrt{K_2}}{K_1} \quad (\text{Equació 1.29})$$

S'ha de mencionar que si en l'Equació 1.23 el segon i els successius cumulants són 0, la funció d'autocorrelació s'ajusta a una funció monoexponencial com la descrita anteriorment (Equació 1.17). En aquest cas, el radi de partícula obtingut pel mètode Multi-angle DLS hauria de ser similar al obtingut pel mètode dels Cumulants.

L'índex de polidispersitat és un paràmetre adimensional que té valors entre 0 i 1. Valors d'índex de polidispersitat majors a 0.7 indiquen que la mostra presenta una distribució de mida ampla i que probablement no és adequada per la tècnica de DLS. El càlcul d'aquest paràmetre està definit en el document de la ISO estàndard 13321:1996 i la ISO 22412:2008. En referència a l'anàlisi de la mida de gota pel mètode d'anàlisi de Cumulants d'una solució de proteïnes un valor d'índex de polidispersitat menor a 0.2 és indicatiu que la mostra és monodispersa (**Instruments, 2011**).

No obstant, s'ha de mencionar que com tot procediment matemàtic la qualitat del resultat depèn significativament de la qualitat de les dades (**Instruments, 2015**).

- CONTIN

El mètode d'anàlisi CONTIN és utilitzat en mostres polidisperses i que presenten dues o més distribucions de mides el que fa que en aquest tipus de mostres no es pugui aplicar el mètode d'anàlisi de Cumulants. El mètode d'anàlisi CONTIN es basa en un complex algoritme matemàtic (**Provencher, 1982a**), (**Provencher, 1982b**) que proporciona una bona estimació de les distribucions de mides quan es té una bona relació soroll/senyal (**Pecora, 2000**). La (Figura 1.15) exhibeix un perfil de distribució de mides obtingut mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN.

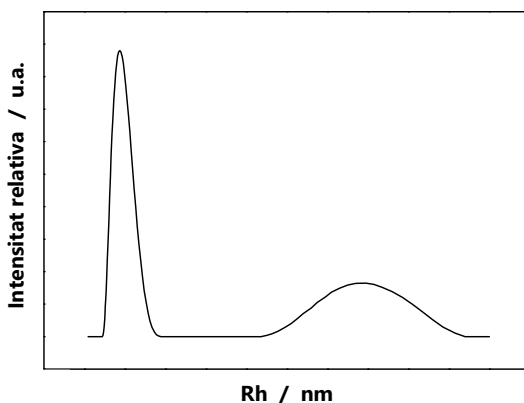


Figura 1.15. Exemple de perfil de distribució de mides (Intensitat relativa vs radi hidrodinàmic) obtingut mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN.

1.2.3. Estimació de la forma de la gota per dispersió estàtica (SLS)

La tècnica de dispersió estàtica de la llum làser "static light-scattering" (SLS) mesura la intensitat de llum dispersada en funció de l'angle de dispersió θ .

La intensitat de llum depèn (Equació 1.30) del factor de forma $P(q)$, que conté informació sobre la forma i la distribució interna de la densitat de les partícules, i del factor

d'estructura $S(q)$, que conté informació en relació a les interaccions partícula-partícula (Kunz, 1983), (Schnablegger, 2013).

$$\Delta I(q) = K \cdot P(q) \cdot S(q) \quad (\text{Equació 1.30})$$

El factor de forma $P(q)$ es pot ajustar a una corba de tipus Gaussià a angles petits. Segons Guinier (1939), la curvatura d'aquesta Gaussiana és deguda a la mida global de les partícules mitjançant la següent expressió:

$$P(q) \approx a_0 \cdot e^{-\left(\frac{R_g^2 q^2}{3}\right)} \quad (\text{Equació 1.31})$$

on q és el vector de dispersió, i R_g és el radi de gir que és independent del model, és a dir, que no conté informació sobre la forma o l'estructura interna de la partícula. Però si l'estructura de les partícules pot ser estimada, el R_g pot ser utilitzat per determinar les dimensions de la partícula. Així, si es coneix que les partícules presenten geometria esfèrica amb una densitat homogènia llavors el radi promig d'aquestes partícules es pot calcular a partir del R_g mitjançant la següent expressió:

$$R_g = \sqrt{\frac{3}{5}} R \quad (\text{Equació 1.32})$$

El paràmetre a_0 de l'Equació 1.31 és l'extrapolació de la intensitat a angle 0. En l'Equació 1.31 $a_0 = 1$, ja que $P(0) = 1$ per definició, però si en comptes de $P(0)$ s'utilitza $\Delta I(q)$, llavors, $a_0 = \Delta I(0)$ es pot emprar per a determinar el pes molecular (Orthaber, 2000). D'aquesta manera, a partir de l'equació de Guinier (Guinier, 1939) es pot determinar el R_g mitjançant la següent expressió:

$$\ln[\Delta I(q)] = \ln[a_0] - \left(\frac{R_g^2 q^2}{3}\right) \quad (\text{Equació 1.33})$$

A partir de la representació de la intensitat absoluta $I(q)$ en funció del quadrat del vector dispersat q^2 i l'ajust dels resultats a una línia recta es poden determinar els paràmetres R_g i a_0 , on el pendent correspon a $-\left(R_g^2/3\right)$ i a_0 és obtingut per extrapolació de l'ajust a angle 0 (veure Figura 1.16).

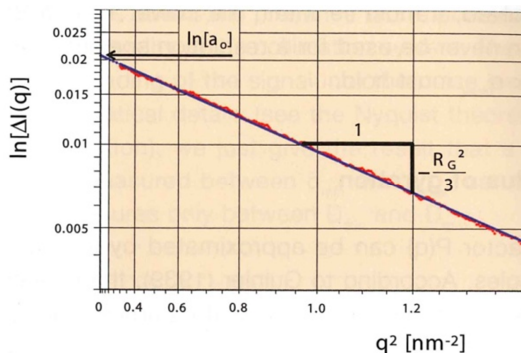


Figura 1.16. Representació de l'Equació 1.33 de Guinier per tal de determinar el R_g i el paràmetre a_0 (Schnablegger, 2013).

Les dades d'intensitat obtingudes de les mesures per SLS han de ser tractades per tal d'obtenir la intensitat absoluta. Primer, els angles de dispersió θ als quals s'han realitzat les mesures han de ser convertits en unitats de vector de dispersió, q (nm^{-1}) mitjançant l'Equació 1.34:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (\text{Equació 1.34})$$

on n és l'índex de refracció del solvent a la temperatura en la que s'ha realitzat la mesura, λ és la longitud d'ona del llum làser incident a la mostra i l'angle de dispersió θ en radians.

A continuació es descriu el tractament per convertir les unitats de la intensitat a valors absoluts seguint els següents passos:

Primer la intensitat ha de ser corregida restant-li el "dark current" (intensitat detectada sense mostra) mitjançant la següent expressió:

$$\text{Intensitat corregida} = (\text{Intensitat obtinguda} - \text{"dark current"}) * \sin(\theta) \quad (\text{Equació 1.35})$$

on $\sin(\theta)$ és un factor corrector que és emprat amb la finalitat d'evitar l'efecte de l'angle en el volum dispersat.

Així, la intensitat absoluta és obtinguda relacionant la intensitat corregida de la mostra amb la intensitat del toluè que és utilitzat com a referència (Equació 1.36):

$$\text{Intensitat absoluta} = \frac{\text{Intensitat corregida}}{\text{Intensitat promig}} \cdot R(\theta)_{\text{toluè}} \left(\frac{n}{n_{\text{toluè}}}\right)^2 \quad (\text{Equació 1.36})$$

on la intensitat promig és la intensitat detectada a cada angle quan es realitza la mesura amb el toluè, $R(\theta)_{toluè}$ és la raó Rayleigh "Rayleigh ratio" del toluè i $n_{toluè}$ és l'índex de refracció del toluè a la temperatura a la que s'ha realitzat la mesura en cada cas.

Cada partícula té un factor de forma que és característica de la seva estructura. En les mesures de SLS els valors dels vectors de dispersió q es troben en la regió esquerra de la Figura 1.17. D'aquesta manera a partir de la següent representació (Figura 1.17) es pot determinar la forma de la partícula a partir de mesures de SLS sempre i quan es compleixi el règim de Guinier.

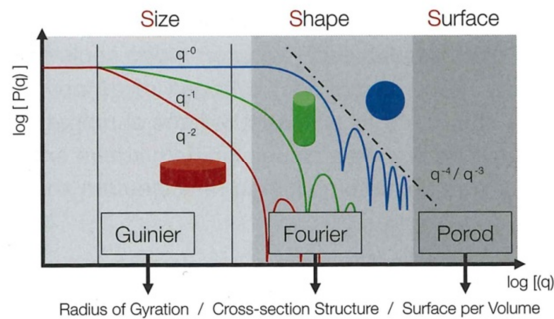


Figura 1.17. Factor de forma $P(q)$ en funció del vector de dispersió q (Schnablegger, 2013).

Per tal de confirmar la forma de les gotes estimada a partir d'experiments per SLS caldria fer les mesures a vectors d'angle de dispersió q majors, mitjançant tècniques més complexes com dispersió de neutrons (SANS) o (SAXS).

Capítol 2

Objectius

Les nano-emulsions són emulsions, és a dir, dispersions de dos líquids immiscibles, amb una mida de gota en el rang nanomètric, en general, entre 20-200 nm (**Solans, 2005**). Degut a la mida de gota, les nano-emulsions presenten estabilitat en front a la sedimentació o cremat, una elevada àrea interfacial i són transparents o translúcides (**Tadros, 2004**). Totes aquestes propietats fan que les nano-emulsions tinguin aplicacions en sectors industrials molt diversos (farmacèutic, agroquímic, cosmètic i alimentari) (**Maali, 2013**). Les nano-emulsions són termodinàmicament inestables, per tant, no es formen espontàniament i és necessari aportar energia per a la seva formació. Si el subministre d'energia és extern el mètode d'emulsificació s'anomena de dispersió o alta energia. Si s'utilitza l'energia química dels components del sistema que s'allibera durant el procés d'emulsificació, el mètode s'anomena de condensació o baixa energia. Aquests darrers mètodes permeten obtenir, en general, gotes de mida més petita i més uniformes que els mètodes d'alta energia (**Tadros, 2004**), (**Solans, 2005**), i es poden dur a terme en condicions suaus de pressió, temperatura, pH, etc.

Entre les aplicacions de les nano-emulsions destaca la seva utilització com a plantilla per obtenir nanopartícules. En el camp farmacèutic les nanopartícules s'utilitzen principalment com a sistemes d'alliberació de principis actius (**Lai, 2014**). El principal avantatge de les nanopartícules en front d'altres sistemes col·loïdals com les microemulsions o els liposomes es que són més versàtils doncs permeten una major funcionalització. Un mètode per a preparar nanopartícules polimèriques és a partir de nano-emulsions utilitzant polímers pre-formats dissolts en un solvent orgànic com a fase dispersa seguida de l'evaporació del solvent (**Anton, 2008**), (**Kumari, 2010**), (**Calderó, 2011**).

Entre els mètodes de baixa energia per a la preparació de nano-emulsions cal destacar els mètodes d'inversió de fases, ja sigui per un canvi de composició a temperatura constant (PIC) ó bé per un canvi de temperatura a composició constant (PIT). En aquests mètodes durant el procés d'emulsificació es produeixen transicions de fases que determinen la mida de gota mínima de les nano-emulsions. Així, el coneixement del comportament fàsic és un factor clau en l'estudi dels mecanismes de formació de nano-emulsions per mètodes d'inversió de fases. El mètode PIC és un mètode més adequat que el mètode PIT per diverses aplicacions, especialment farmacèutiques quan s'utilitzen components i/o principis actius inestables a temperatures elevades. La formació de nano-emulsions O/W pel PIC es produeix per dilució amb la fase continua de mesclades binàries oli-tensioactiu ó ternàries aigua-tensioactiu-oli, no obstant, seria d'esperar que el canvi de curvatura del film interfacial de tensioactiu es pogués produir per addició d'altres components diferents a l'aigua. També s'ha descrit la formació de nano-emulsions per mètodes de baixa energia sense inversió de fases, són els anomenats mètodes d'autoemulsificació ó d'emulsificació espontània. En aquests mètodes l'energia del

OBJECTIUS

sistema s'obté principalment per un procés de dilució de mescles binàries oli/tensioactiu amb la fase continua.

Estudis recents de comportament fàsic han posat de manifest que els processos d'emulsificació per baixa energia es poden produir mitjançant varis mecanismes de manera seqüencial. Un coneixement aprofundit dels mecanismes implicats permetrà determinar quina és la fase decisiva en la formació de les nano-emulsions per mètodes de baixa energia, l'optimització del procés i en conseqüència millorar i ampliar els camps d'aplicació de les nano-emulsions.

L'objectiu principal de la present tesi doctoral és **aprofundir en els mecanismes de formació de nano-emulsions de fase externa aquosa (O/W)** per mètodes de baixa energia a temperatura constant, i **estudiar la formació de nano-emulsions polimèriques** i la seva utilització com a plantilla per a **l'obtenció de nanopartícules polimèriques** per a ús farmacèutic.

A fi d'assolir els objectius proposats es va dissenyar el següent pla de treball:

- Selecció de sistemes aigua/tensioactiu/component oliós adequats per a ús farmacèutic i cosmètic.
- Determinació de les temperatures d'inversió de fases per mesures de conductivitat i estudi del comportament fàsic amb diagrames de fases.
- Caracterització de fases de microemulsió mitjançant espectroscopia de ressonància magnètica nuclear (RMN), dispersió dinàmica de la llum làser (DLS), dispersió estàtica de la llum làser (SLS), i per difusió d'un colorant.
- Estudi de la formació de nano-emulsions oli-en-aigua per mètodes de baixa energia a temperatura constant per addició d'aigua i d'altres components, partint de diferents composicions binàries oli-tensioactiu i ternàries oli-tensioactiu-aigua.
- Preparació de nanopartícules polimèriques utilitzant nano-emulsions com a plantilla en funció de la concentració de polímer.
- Caracterització de les nano-emulsions oli-en-aigua i de les dispersions de nanopartícules mitjançant la tècnica de dispersió dinàmica de la llum làser, un analitzador d'estabilitat per retrodifusió de llum, per microscopia, etc.
- Estudi de la influència de la concentració de polímer en les propietats de les nano-emulsions i nanopartícules polimèriques.
- Estudi de la influència de concentració de polímer en l'eficiència d'encapsulació d'un principi actiu en les nanopartícules, en l'alliberació del principi actiu des de la dispersió de nanopartícules a una solució receptora i l'avaluació de la citotoxicitat de les nanopartícules polimèriques amb i sense principi actiu.

Capítol 3
Experimental

3.1. MATERIALS

Les estructures químiques han estat dibuixades amb el software BKChem.

3.1.1. Tensioactius

S'han utilitzat tensioactius no iònics de tipus etoxilat, abreviats com C_mE_n , on m és el nombre de carbonis (C) de la cadena hidrocarbonada i n és el nombre d'unitats d'òxids d'etilè (E). La majoria dels tensioactius utilitzats han estat comercials, que són barreges d'homòlegs. S'ha de mencionar que en aquests tensioactius comercials l'abreviació C_mE_n indica el valor promig de la cadena hidrocarbonada així com de les unitats d'òxid d'etilè.

Brij[®] 30 (C₁₂E₄)

El Brij[®] 30 subministrat per Sigma-Aldrich (ref. 235989; CAS 9002-92-0) amb una puresa $\geq 99\%$ és un tensioactiu comercial no iònic de tipus etoxilat que té un HLB de 9-10 i un pes molecular de 362 g/mol. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) és denominada "Laureth-4" i la seva fórmula és $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_4OH$ (Figura 3.1), abreviada com $C_{12}E_4$. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un líquid incolor i insoluble en aigua i presenta una densitat relativa de 0.95 g/cm³. Exhibeix un punt de fusió de 41-45°C. El Brij[®] 30 és utilitzat com agent humectant i en detergència.

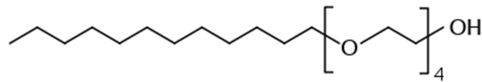


Figura 3.1. Estructura química del Brij[®] 30.

Brij[®] 97 (C₁₈E₁₀)

El Brij[®] 97 subministrat per Sigma-Aldrich (ref. 431281; CAS 9004-98-2) és un tensioactiu comercial no iònic de tipus etoxilat que té un HLB de 12.4 i un pes molecular de 709 g/mol. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) s'anomena "Oleth-10" i la seva fórmula és $C_{18}H_{35}(OCH_2CH_2)_{10}OH$ (Figura 3.2) abreviada com $C_{18}E_{10}$. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un líquid o semi-sòlid de color groc, soluble en aigua i presenta una densitat relativa de 1 g/cm³. Exhibeix un punt de fusió aproximat de 16°C. El Brij[®] 97 és utilitzat en aplicacions bioquímiques per solubilitzar proteïnes.

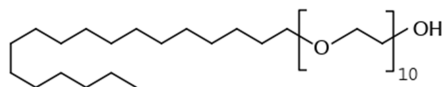


Figura 3.2. Estructura química del Brij[®] 97.

Cremophor® EL

El Cremophor® EL subministrat per BASF (ref. 50259799; CAS 9002-92-0) és un tensioactiu comercial no iònic de tipus etoxilat obtingut de la reacció d'un mol d'oli de ricí amb trenta-cinc mols d'òxid d'etilè. És un tensioactiu heterogeni, format per una gran varietat de components (**Meyer, 2002**). El component principal és el ricinoleat de glicerina de polietilenglicol (Figura 3.3), juntament amb d'altres èsters d'àcids grassos de polietilenglicol, polietilenglicols lliures i etoxilats de glicerina. El seu nombre HLB és de 12-14 i té un pes molecular d'aproximadament 3000 g/mol (**Gelderblom, 2001**). Es pot trobar també com Kolliphor™ EL. El seu aspecte és el d'un líquid de color lleugerament groc, soluble en aigua i en varis solvents orgànics com l'etanol, el propanol, l'isopropanol, l'acetat d'etil o el cloroform. Presenta una densitat relativa de 1.05 g/cm³ a 20°C. Exhibeix una concentració micel·lar crítica de 0.02%. Kolliphor™ EL és utilitzat per la indústria farmacèutica com agent emulsificant i solubilitzador de principis actius hidrofòbics en preparacions aquoses (**Gelderblom, 2001**). Es troba descrit l'ús d'aquest tensioactiu en l'obtenció de partícules polimèriques amb fàrmac encapsulat (**Ye, 2013**).

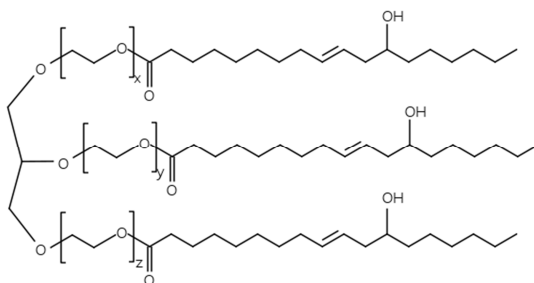


Figura 3.3. Estructura química del component principal (ricinoleat de glicerina de polietilenglicol) del Cremophor EL ($x+y+z \approx 35$).

Synperonic 91/6 (C₉₋₁₁E₆)

El Synperonic 91/6 subministrat per Croda (ref. ETX 2258/XSAMP; CAS 68439-46-3) és un tensioactiu comercial no iònic de tipus etoxilat que té un HLB de 13 i un pes molecular de 408 g/mol. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) es denomina "Pareth-6" i la seva fórmula és C₉H₁₉(OCH₂CH₂)₆OH (Figura 3.4), abreviada com C₉₋₁₁E₆. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un líquid incolor, soluble en aigua, etanol i cloroform. Presenta un punt de tèrbol de 52°C. És totalment biodegradable (**Ash, 2004**). El Synperonic 91/6 és utilitzat com a detergent, emulsionant i agent humectant.

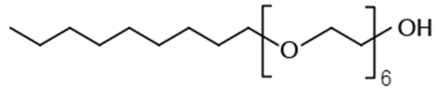


Figura 3.4. Estructura química del Synperonic 91/6.

Synperonic 13/6.5 (C₁₃E₇)

El Synperonic 13/6.5 subministrat per Croda (ref. 1503/XSAMP; CAS 24938-91-8) és un tensioactiu comercial no iònic de tipus etoxilat que té un HLB de 12.5 i un pes molecular de 508 g/mol. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) s'anomena "Trideceth-7" i la seva fórmula és C₁₃H₂₇(OCH₂CH₂)₇OH (Figura 3.5), abreviada com C₁₃E₇. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un líquid incolor, soluble en aigua, etanol i cloroform. El Synperonic 13/6.5 és utilitzat com emulsionant industrial, agent humectant, i detergent. És biodegradable (Ash, 2004).

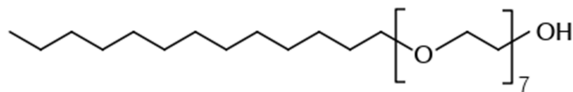


Figura 3.5. Estructura química del Synperonic 13/6.5.

Dodecil sulfat de sodi (SDS)

El dodecil sulfat de sodi abreviat com SDS subministrat per Sigma-Aldrich (ref. 862010; CAS 151-21-3) amb una puresa $\geq 99\%$ és un tensioactiu comercial iònic que té un HLB de 40 i un pes molecular de 288.38 g/mol. La seva fórmula química és C₁₂H₂₅O₄S.Na (Figura 3.6). Sinònims: lauril sulfat sòdic. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un sòlid de color blanc, soluble en aigua i presenta una densitat relativa de 0.370 g/cm³. Exhibeix un punt de fusió de 201-207°C. El SDS és emprat en el camp cosmètic i de la detergència, per exemple, en diversos productes d'higiene personal com pasta de dents, xampú i sabons de mà.

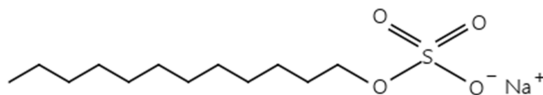


Figura 3.6. Estructura química del SDS.

EXPERIMENTAL

Penta etilenglicol mono-n-dodecil éter (C₁₂E₅)

El penta etilenglicol mono-n-dodecil éter subministrat per Nikko Chemicals (ref. BL-5SY; lot nº 6089) abreviat com C₁₂E₅ és un tensioactiu no iònic pur de tipus etoxilat que té un HLB de 11.3 i un pes molecular de 406.60 g/mol. El seu aspecte és el d'un líquid incolor. Presenta una densitat relativa de 0.963 g/cm³ a 20°C i la seva fórmula és C₂₂H₄₆O₆ (Figura 3.7).

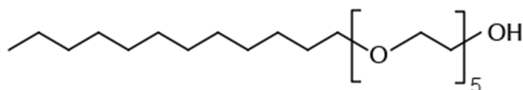


Figura 3.7. Estructura química del C₁₂E₅.

PPO-PEO-3 i PPO-PEO-5

Els tensioactius abreviats com PPO-PEO-3 i PPO-PEO-5 subministrats per l'empresa Nihon Emulsion amb una puresa del 90% són tensioactius comercials no iònics de tipus etoxilat addicionalment polimeritzat a polioxipropilè (2 mols), que tenen un HLB de 7 i 9, respectivament. El seu nom químic és "Polyoxypropylene (2) Polyoxyethylene Decyl Ether", i segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) s'anomena "PPG-2 Deceth-3", i "PPG-2 Deceth-5" respectivament. Les seves fórmules químiques són C₁₀H₂₁(OCH₂CH₂)₃C₆H₁₀OH i C₁₀H₂₁(OCH₂CH₂)₅C₆H₁₀OH (Figura 3.8), respectivament. El seu aspecte a 20°C és el d'un líquid incolor. Són utilitzats com agent emulsificant i dispersant en cosmètica ja que a les concentracions en les que es fan servir no són tòxics (**"Safety Assessment of Alkyl PEG/PPG Ethers as Used in Cosmetics," 2013**). Van sorgir per a substituir els tensioactius "Laureth" i els "Nonoxynol".

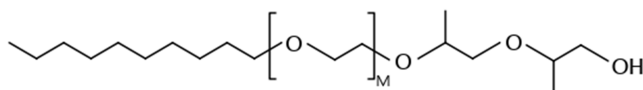


Figura 3.8. Estructura química del PPO-PEO-3 (M=3) i PPO-PEO-5 (M=5).

3.1.2. Olis

Hexadecà

L'hexadecà subministrat per Sigma-Aldrich (ref. H0255, CAS 544-76-3) amb una puresa $\geq 99\%$ és un alcà lineal i la seva fórmula química és $C_{16}H_{34}$ (Figura 3.9). Presenta un pes molecular de 226.44 g/mol. A la temperatura de 25°C és líquid i incolor i exhibeix una densitat relativa de 0.773 g/cm³. Té un punt de fusió de 18°C i un índex de refracció de 1.434.

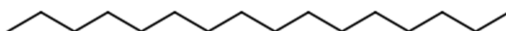


Figura 3.9. Estructura química de l'Hexadecà.

Decà

El decà subministrat per Merck (ref. 109603, CAS 124-18-5) és un alcà lineal amb una puresa $\geq 99.5\%$. La seva fórmula química és $C_{10}H_{22}$ (Figura 3.10) i presenta un pes molecular de 142.28 g/mol. Sinònim: n-decà. A la temperatura de 25°C és líquid i incolor. Exhibeix un punt de fusió de -29.7°C i presenta una densitat relativa de 0.73 g/cm³ a 20°C.



Figura 3.10. Estructura química del Decà.

Dodecà

El dodecà subministrat per Sigma-Aldrich (ref. 297879, CAS 112-40-3) és un alcà lineal amb una puresa $\geq 99.5\%$. La seva fórmula química és $C_{12}H_{26}$ (Figura 3.11) i presenta un pes molecular de 170.33 g/mol. A la temperatura de 25°C és líquid i incolor. Exhibeix una densitat relativa de 0.75 g/cm³ a 20°C i un punt de fusió de -9.6°C.

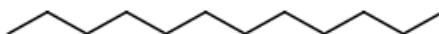


Figura 3.11. Estructura química del Dodecà.

Acetat d'Etil

L'acetat d'etil subministrat per Merck (ref. 822277, CAS 141-78-6) amb una puresa $\geq 99.8\%$ és un solvent líquid i incolor a la temperatura de 25°C . La seva fórmula química (Figura 3.12) és $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ i el seu pes molecular és 88.11 g/mol . Sinònims: etanoat d'etil. Presenta una densitat relativa de 0.90 g/cm^3 a 20°C , un punt d'ebullició de 77°C , un punt de congelació de -83.6°C i un índex de refracció de 1.3719. És parcialment soluble en aigua, sent més soluble en aigua a baixes temperatures. L'acetat d'etil pertany a la classe 3 del llistat de solvents "ICH Guidelines" (FDA, 2012), que són els que presenten una menor toxicitat i un menor risc per a la salut humana. Per tant, poden ser emprats en la indústria farmacèutica sempre i quan el contingut residual d'aquest solvent sigui inferior a 50 mg/dia ó 5000 ppm (FDA, 2012).

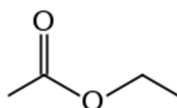


Figura 3.12. Estructura química de l'Acetat d'Etil.

Esqualà

L'esqualà subministrat per Sigma-Aldrich (ref. 234311, CAS 111-01-3) amb una puresa del 99% és un alcà ramificat d'origen natural. La seva fórmula química és $\text{C}_{30}\text{H}_{62}$ (Figura 3.13) i el seu pes molecular és 422.81 g/mol . A la temperatura de 25°C presenta un aspecte líquid i incolor i exhibeix una densitat de 0.85 g/mL . L'esqualà és utilitzat en la indústria farmacèutica i cosmètica.

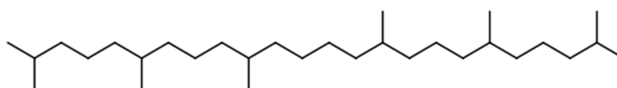


Figura 3.13. Estructura química de l'Esqualà.

Miristat d'isopropil

El miristat d'isopropil subministrat per Sigma-Aldrich (ref. M0757, CAS 110-27-0) amb una puresa $\geq 90\%$ s'obté per reacció de l'àcid mirístic o del clorur de miristil amb l'isopropanol, o bé per esterificació enzimàtica a baixa temperatura. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) s'anomena "Isopropyl myristate". La seva fórmula química és $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (Figura 3.14) i el seu pes molecular és de 270.45 g/mol . A la temperatura de 25°C presenta un aspecte líquid i incolor amb una densitat de 0.853 g/mL . És soluble en aigua i en etanol al 96% , en àcids grassos i en

parafina. Donat que és fotosensible cal emmagatzemar-lo en recipients ben tancats protegits de la llum. S'incorpora a la fase greixosa de les emulsions per millorar el seu aspecte cosmètic i afavorir la penetració dels principis actius. S'ha emprat per exemple per formar microemulsions i microesferes per a produir nanopartícules alliberadores de principis actius peptídics.

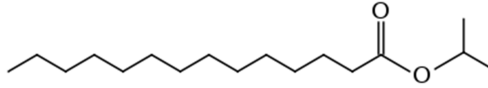


Figura 3.14. Estructura química del miristat d'isopropil

Parafina líquida

La parafina líquida subministrada per Merck (ref. 107162, CAS 8042-47-5) està formada principalment d'hidrocarburs saturats no ramificats de cadena llarga, així com d'una petita proporció d'hidrocarburs ramificats, i és obtinguda de ceres de parafina bruta durant la producció d'olis del petroli. El seu pes molecular és de 400-1400 g/mol. Segons la nomenclatura internacional d'ingredients cosmètics (INCI) s'anomena "Paraffin". El seu aspecte és el d'un líquid incolor, pràcticament insoluble en aigua i en etanol al 96%. Presenta una densitat de 0.86 g/mL a 20°C i un punt de fusió de 42-44°C. Cal emmagatzemar-lo en envasos protegits de la llum ja que és fotosensible. És un agent amb propietats emol·lients ja que al ser aplicada sobre la pell la protegeix i estova augmentant la seva flexibilitat. Es fa servir com agent de consistència i base de pomades i emulsions en preparats tòpics. També es fa servir en el recubriment de càpsules i comprimits.

3.1.3. Components aquosos

Aigua

Es va utilitzar aigua desionitzada i posteriorment filtrada utilitzant un sistema de purificació d'aigua Millipore model SYNSVHFWW Synergy® UV. Resistivitat de l'aigua produïda 18.2 MΩ·cm. TOC < 5 ppb. Qualitat de l'aigua Tipus I.

Aigua deuterada

L'aigua deuterada utilitzada va ser subministrada per Sigma-Aldrich (ref. 151882, CAS 7789-20-0) amb una puresa ≥ 99.85%. Fòrmula química: D₂O. Sinònims: aigua pesada, òxid de deuteri.

3.1.4. Altres components químics utilitzats

Àcid (Poli(D,L-làctic-co-glicòlic) (PLGA)

L'àcid (Poli(D,L-làctic-co-glicòlic) abreviat com PLGA subministrat per Evonik (ref. 719919, CAS 26780-50-7) és un un copolímer de l'àcid làctic i de l'àcid glicòlic amb una relació làctic:glicòlic (75:25) que es comercialitza com a Resomer RG® 752 H. La seva fòrmula química (Figura 3.15) és $[(C_6H_8O_4)_x(C_4H_4O_4)_y]_n$ amb un pes molecular 4000-15000 g/mol. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un sòlid en forma de pols. Presenta una temperatura de transició vítreua de 45°C (Muthu, 2009). El PLGA és biodegradable i biocompatible. Així mateix ha estat aprovat per la FDA i l'Agència Europea de Medicina per la seva utilització en sistemes d'alliberació de fàrmacs per via parenteral. Degut a les propietats que exhibeix el PLGA és utilitzat en la formulació de nanopartícules polimèriques (Danhier, 2012), (Makadia, 2011).

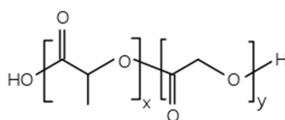


Figura 3.15. Estructura química del PLGA. (**x** fa referència al nombre d'unitats de l'àcid làctic i **y** fa referència al nombre d'unitats de l'àcid glicòlic).

Dexametasona

La dexametasona abreviada com DXM subministrada per Fagron (ref. 30504-22, CAS 50-02-2) amb una puresa del 99.8% és un fàrmac antiinflamatori esteroide i immunosupressor. La seva fòrmula química és $C_{22}H_{29}FO_5$ (Figura 3.16) i el seu pes molecular és 392.47 g/mol. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un sòlid en forma de pols blanca. Exhibeix un punt de fusió de 262-264°C. És pràcticament insoluble en aigua i és soluble en etanol. És sensible a la llum. La dexametasona és utilitzada com anti-inflamatori en el tractament de l'astma amb una dosi terapèutica de 10 mg% (10 mg/100 mL) (Gómez-Gaete, 2007).

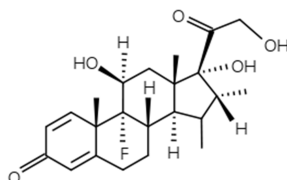


Figura 3.16. Estructura química de la Dexametasona.

Blau de metilè

El blau de metilè subministrat per Sigma-Aldrich (ref. M9149, CAS 7220-79-3) és un colorant hidrofílic amb una puresa $\geq 82\%$. La seva fórmula química és $C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot 3H_2O$ (Figura 3.17) i el seu pes molecular és 373.90 g/mol. Sinònims: blau bàsic 9. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un sòlid en pols de color verd obscur i és soluble en aigua.

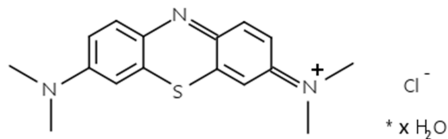


Figura 3.17. Estructura química del Blau de Metilè.

Sudan IV

El Sudan IV subministrat per Sigma (ref. S 4261, CAS 85-83-6) és un colorant lipòfil amb una puresa $\geq 80\%$. La seva fórmula química és $C_{24}H_{20}N_4O$ (Figura 3.18) i el seu pes molecular és 380.5 g/mol. Sinònims: oli vermell IV. A la temperatura de 25°C el seu aspecte és el d'un sòlid en pols de color vermell fort marró. És utilitzat a nivell industrial per colorejar olis, ceres, vernissos, etc.

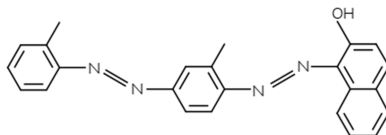


Figura 3.18. Estructura química del Sudan IV.

Acetonitril (ACN)

L'acetonitril abreviat com a ACN subministrat per Merck (ref. 100003, CAS 75-05-8) és un solvent orgànic utilitzat en cromatografia en fase líquida amb una puresa ≥ 99.9 . La seva fórmula química és CH_3CN (Figura 3.19) i té un pes molecular de 41.05 g/mol. El seu aspecte és el d'un líquid incolor, que presenta un punt de fusió de $-45.7^\circ C$ i un punt d'ebullició de $81.6^\circ C$. Exhibeix una densitat de 0.786 g/cm^3 a $20^\circ C$.

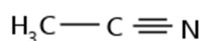


Figura 3.19. Estructura química de l'acetonitril.

Dimetil sulfòxid (DMSO)

El dimetil sulfòxid abreviat com a DMSO subministrat per Sigma (ref. D5879, CAS 67-68-5) amb una puresa $\geq 99.5\%$ és un solvent polar que presenta un pes molecular de 78.13 g/mol. La seva fórmula química és C_2H_6SO (Figura 3.20). A la temperatura de $25^\circ C$ el seu aspecte és el d'un líquid incolor. És soluble en aigua, etanol, acetona, éter, benzé i cloroform. El seu punt de fusió és de $18.45^\circ C$. El DMSO és utilitzat en l'assaig bioquímic de MTT per a dissoldre els cristalls de "formazan".

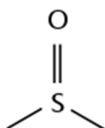


Figura 3.20. Estructura química del DMSO.

3.1.5. Altres materials

Cèl·lules HeLa

Les cèl·lules HeLa subministrades amablement pel Dr. Josep Villanueva del laboratori "Tumor Biomarkers Group" de l'Institut d'Oncologia de la Vall D'Hebron, (VHIO) són un tipus de cèl·lules utilitzades en investigació científica. El llinatge al que pertanyen aquestes cèl·lules prové d'una mostra de càncer cèrvic-uterí obtinguda el 8 de febrer de 1951 d'una pacient anomenada Henrietta Lacks (d'aquí l'acrònim de HeLa) que va morir l'octubre d'aquell mateix any com a conseqüència del càncer que patia (**Sherer, 1953**). És el llinatge cel·lular més antic conegut i utilitzat en una major freqüència (**Rahbari, 2009**).

Medi de cultiu Eagle modificat de Dulbecco (DMEM)

El medi de cultiu Eagle modificat de Dulbecco abreviat com "DMEM high glucose" subministrat per Gibco (ref. 41965-039) és utilitzat en assajos bioquímics com a medi de cultiu cel·lular. El medi de cultiu utilitzat en aquest estudi contenia també un 10% de suero fetal boví (FBS) subministrat per Gibco (ref. 10500-064) i un 1% d'antibiòtics (Penicil·lina/Estreptomicina, 5000 U/mL) subministrat per Gibco (ref. 15070-063).

3.2. APARELLS I INSTRUMENTS

- **Cromatògraf de líquids d'alta resolució (HPLC)**

Cromatògraf de líquids d'alta resolució Waters 1525 Series, equipat amb una bomba de gradient binari amb un nivell màxim de flux de 10 mL/min i una pressió màxima de 6000 psi (414 bars), un detector UV-visible Waters 2489 amb un rang de longitud d'ona 190-600 nm, i un autoinjector model Waters 2707 amb un rang de volum d'injecció de 5 a 50 µL. L'equip està connectat a un ordinador mitjançant una interfície (SATIN). El software que controla l'equip és el Breeze 2. La columna utilitzada va ser una columna Waters Spherisorb® 5 µm ODS2 4.6 x 150 mm (ref. PSS831913, n° sèrie 01663913813675).

- **Espectrofotòmetre de correlació creuada de fotons**

Espectrofotòmetre de Correlació Creuada de Fotons 3D (PCCS 3D), LS Instruments. Permet realitzar mesures de dispersió de llum (light-scattering) dinàmica (DLS) i estàtica (SLS) amb angle variable 12°-155° amb una resolució >0.01. La tecnologia 3D permet suprimir la dispersió múltiple. Disposa de control de temperatura. El làser és d'He-Ne amb una longitud d'ona de 633 nm. El software 3D LS Spectrometer v.6.3 permet l'estimació automàtica del radi hidrodinàmic mitjançant el mètode d'anàlisi de "Cumulants" i l'estimació del perfil de distribució de mides pel mètode d'anàlisi CONTIN.

- **Espectròmetre de ressonància magnètica nuclear (RMN)**

Espectròmetre de Ressonància Magnètica Nuclear Varian 500 MHz (11.7 Teslas) equipat amb una consola Inova, una sonda de detecció inversa AutoX. El software d'adquisició que utilitza és la versió 2.2D del VnmrJ. En el tractament dels resultats es va emprar el software MestReNova v.8.1.

- **Microscopi òptic**

Microscopi òptic Olympus BX51TRF-6. Permet treballar en transmissió ó en reflexió. Disposa de les tècniques d'observació de camp clar, camp fosc, contrast de fases, contrast interferencial, polarització i fluorescència. Té acoplada una càmera digital (Olympus DP73) connectada a un ordinador amb un software Stream Essentials que permet la captura d'imatges i vídeos.

- **Agitadors**

Agitador magnètic amb calefacció MRHei-Standard connectat a una sonda de temperatura Heidoph EKT HeiCON. Revolucions màximes 1400 rpm. Temperatura 0-300°C. Exactitud d'ajust de temperatura ± 1°C.

Agitador Vòrtex Genie 2 Scientific Industries. Disposa de control de velocitat variable que permet l'agitació de mostres de manera suau o vigorosa.

EXPERIMENTAL

- **Balances**

Balança Analítica Metler Toledo AB204-S. Interval de treball 10 mg – 220 g amb un rang d'incertesa admissible de +/- 0.0001.

- **Bany termostatitzat**

Bany d'aigua termostatitzat: bany de metracrilat de metil amb control de temperatura mitjançant un termòstat ThermoScientific™ SC100, rang de treball -25 - 100°C i un criostat Haake EK20 amb una capacitat de refredament de fins a -20°C. Estabilitat de la temperatura 0.02°C. Recircula l'aigua a un cabal de 17 L/min.

- **Centrífugues**

Centrífuga Eppendorf 5804 R. Velocitat màxima de 5000 rpm, equivalent a 4500g. Temperatura variable -9 - 40°C.

- **Conductímetre**

Conductímetre Crison GLP31 connectat a un ordinador. Està equipat amb una cel·la de conductivitat model 52-92 Crison amb un electrode de Pt i una constant de cel·la de 1 cm⁻¹. Permet controlar la temperatura ± 0.0055°C mitjançant un sensor de temperatura model 55-31 Crison.

- **Rotavapor**

Rotavapor Buchir-210V Plastic Glas. Aparell destinat a la destil·lació de líquids volàtils en condicions de temperatura i pressió programables digitalment. Consta de bomba de buit, controlador digital de buit, cubeta de temperatura regulable, control de velocitat de rotació i condensador connectat a un criòstat que permet evaporar a baixa temperatura.

- **Espectrofotòmetre de Microplaques**

Espectrofotòmetre per Microplaques Epoch™ BioTek. Sistema basat en monocromador UV-Vis per selecció de longituds d'ona desde 200 nm fins a 999 nm i capacitat de lectura de microplaques desde 6 fins a 384 puets, tot controlat a través del Software per Anàlisi de Dades Gen5.

- **Analitzador d'estabilitat per retrodifusió de llum**

El analitzador d'estabilitat per retrodifusió de llum Turbiscan LAB Formulacion, (**Formulacion, 2016a**), (**Formulacion, 2016b**) consta d'una font de llum propera a l'infraroig (880 nm) i de dos detectors sincronitzats. La tecnologia del Turbiscan TM permet mesurar la intensitat de llum retrodispersada "backscattering" (a un angle de 135° respecte a la llum incident) i la intensitat de llum transmesa "transmission" (a un angle de 0° respecte a la font de llum incident) en funció de l'alçada de la mostra amb la

finalitat de detectar canvis en la mida de partícula (coalescència, floculació) i separació de fases (sedimentació, cremat) fins a 50 vegades més ràpid que a nivell visual. La mostra es manté a temperatura controlada (desde temperatura ambient fins a 60°C). Per l'adquisició i anàlisi de dades utilitza el software Turbisoft 2.0 o Turbisoft Lab Expert.

3.3. MÈTODES

En la present memòria els tensioactius, components oliosos i components aquosos s'han abreujat amb les sigles **S**, **O** i **W**, les inicials dels mots anglesos "surfactant", "oil" i "water" respectivament.

Sinó s'especifica el contrari el contingut dels components està expressat en % en pes i les relacions entre els components són màssiques.

S'ha definit com fracció màssica, **R_{ab}** :

$$R_{ab} = \frac{m_a}{m_a + m_b} \quad (\text{Equació 3.1})$$

on m_a i m_b són les masses dels components.

3.3.1. Elaboració de diagrames de fases

Es van elaborar diagrames de fases ternaris de sistemes aigua/tensioactiu/component oliós mitjançant dos mètodes:

- Mètode de valoració

Els mètodes de valoració són utilitzats per a realitzar un "screening" del comportament fàsic del sistema delimitant les zones monofàsiques i multifàsiques així com la presència de composicions que presenten birrefringència.

El mètode de valoració consisteix en l'addició de quantitats successives d'un dels components a diferents mesclades binàries constituïdes pels components restants, (tensioactiu i component oliós). Es va procedir preparant en vials de vidre amb taps de rosca composicions amb diferents relacions oli/tensioactiu. Les mostres van ser homogeneïtzades mitjançant un agitador vòrtex. A continuació es va procedir a l'addició de quantitats successives d'aigua. Després de cada addició, les mostres es van homogeneïtzar novament amb un agitador vòrtex i tot seguit es va realitzar l'observació visual anotant l'existència d'una o més fases macroscòpiques, la transparència, translúcidesa, terbolesa o opacitat de les mostres, el color, la viscositat i la presència de regions amb birrefringència que van ser identificades per la brillantor que presenten quan són observades entre polaritzadors de la llum creuats i exposats a una font lluminosa.

- Mètode de pesada directa

El mètode de pesada directa s'utilitza per tal de definir els límits de les regions amb més precisió i per conèixer les fases a l'equilibri del diagrama.

El mètode de pesada directa consisteix en preparar les mostres amb les diferents composicions finals. Així, per cada composició es van pesar, en tubs de vidre, tots els

components. A continuació es van centrifugar els tubs durant 5min a 5000 rpm i després es van sellar a la flama per evitar la possible evaporació de la mostra. Finalment les mostres van ser agitadaes amb un agitador vòrtex. En els sistemes amb el Brij30 va ser necessari escalfar les mostres a uns 80°C aproximadament a fi d'assolir una bona homogeneïtzació. Després d'escalfar, les mostres es van congelar durant un període mínim de 14h. Finalment es van termostatitzar els tubs en un bany a la temperatura desitjada fins a aconseguir separació de fases. Les fases estan en equilibri termodinàmic quan són transparents. Les diferents fases transparents estan separades per interfícies. L'observació visual de les mostres es va realitzar com s'ha descrit en el mètode de valoració.

La presència de fases de cristall líquid es va identificar, primer, com s'ha indicat en els mètodes de valoració, a través de polaritzadors de la llum creuats. Per confirmar la presència de cristall líquid es van observar les mostres per microscopia òptica amb llum polaritzada que permet identificar les fases.

La nomenclatura utilitzada en aquest treball per denominar les fases i la corresponent descripció es mostren a la Taula 3.1.

Taula 3.1. Nomenclatura de les principals fases trobades en els sistemes aigua/tensioactiu/component oliós a les quals es farà referència en els diagrames de fases de la secció de *Resultats i discussió*.

| Nomenclatura | Descripció |
|--------------|--|
| D_1, L_1 | Fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W. |
| D'_1 | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'oli (curvatura còncava o positiva). |
| $L\alpha$ | Fase anisòtropa i lleugerament viscosa que correspon a una fase de cristall líquid laminar. |
| D_2, L_2 | Fase líquida isòtropa i transparent de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura W/O. |
| D'_2 | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'aigua (curvatura convexa o negativa). |
| M_1 | Fase multifàsica d'estructura O/W. |
| M_2 | Fase multifàsica d'estructura W/O. |

3.3.2. Determinació de la Temperatura d'inversió de fase (T_{HLB})

La determinació de la T_{HLB} es va realitzar mitjançant mesures de conductivitat específica en funció de la temperatura. La fase aquosa és normalment conductora, mentre que la fase oliosa no ho és. Al augmentar la temperatura, en sistemes amb tensioactius no iònics etoxilats es produeix un descens brusc en els valors de conductivitat específica, indicant la inversió de fases d'estructures directes o de fase externa aquosa (O/W) a estructures inverses o de fase externa oliosa (W/O) (Figura 3.21). La T_{HLB} és la temperatura promig entre la temperatura a la qual la conductivitat comença a disminuir i quan aquesta assoleix el valor més baix. Per a determinar la T_{HLB} es va procedir de la manera següent: es van pesar en un vial primer el tensioactiu i l'oli i es van homogeneïtzar mitjançant agitació vòrtex. A continuació es va pesar l'aigua. La mostra (3g) va ser agitada amb vòrtex i escalfada a 80°C aproximadament i es va mantenir congelada com a mínim una nit abans de procedir a fer les mesures de conductivitat. Per a realitzar aquestes mesures es va introduir el vial en un recipient amb aigua-gel a 5-10°C en una placa amb agitació magnètica amb calefacció, a 1000 rpm. Dins del vial es va introduir l'electrode del conductímetre i en el recipient exterior que contenia l'aigua-gel s'hi va instal·lar una sonda de temperatura. Abans de procedir a fer les mesures es va esperar a que la mostra assolís la temperatura inicial que generalment va ser de 10-20°C depenent del sistema. A continuació es va augmentar lentament la temperatura registrant de manera simultània els valors de conductivitat i de temperatura.

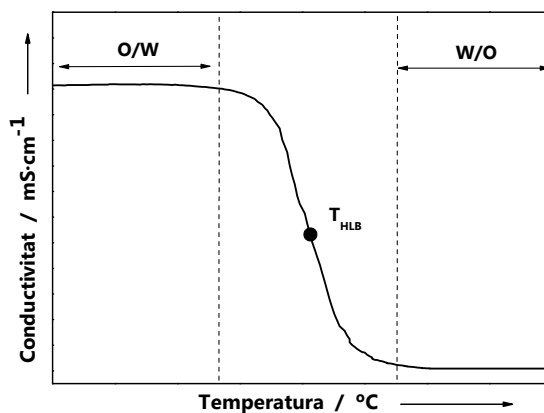


Figura 3.21. Exemple de perfil de conductivitat en funció de la temperatura.

En general, en sistemes amb tensioactius no iònics etoxilats purs és necessari, generalment, afegir a la fase aquosa una petita concentració d'electrolit per augmentar la seva conductivitat específica i obtenir així un perfil més nítid de la temperatura d'inversió de fase sense produir canvis significatius en el valor de la T_{HLB} (Shinoda, 1970). No obstant, en el present treball l'ús de tensioactius comercials ha fet possible la

determinació de la T_{HLB} per conductivitat sense haver d'afegir electrolits ja que els tensioactius comercials contenen espècies iòniques provinents de la seva síntesi.

3.3.3. Formació de nano-emulsions

3.3.3.1. Emulsificació a temperatura constant per addició d'aigua (amb o sense inversió de fases)

L'emulsificació va consistir primer en barrejar mitjançant vòrtex el component oliós i el tensioactiu en la relació Ros seleccionada fins a obtenir una mescla homogènia. A continuació es va addicionar a la barreja O/S, mantinguda en agitació amb vòrtex, la quantitat necessària d'aigua mitjançant una xeringa en addicions successives o en una sola addició. L'addició es va realitzar a temperatura ambient i un cop addicionada tota l'aigua es va mantenir la mostra a la temperatura constant seleccionada. La quantitat total de mostra preparada va ser de 4g.

En els sistemes amb polímer i/o principi actiu a la fase oliosa es va incorporar el principi actiu en el component oliós i es va deixar en agitació tota una nit abans de preparar la mescla amb el tensioactiu i d'addicionar posteriorment l'aigua.

- Determinació de la zona de formació de nano-emulsions en sistemes aigua/tensioactiu/component oliós

La formació de nano-emulsions en sistemes aigua/tensioactiu/component oliós es va avaluar primer d'una manera qualitativa a nivell visual. Es van seleccionar diferents relacions Ros i es va addicionar l'aigua anotant a quina concentració es formaven les nano-emulsions i a quina es desestabilitzaven. Es van considerar nano-emulsions les composicions amb un aspecte transparent ó translúcid i que presentaven efecte Tyndall quan eren observades a través d'un focus de llum. Aquest efecte és característic de les dispersions de mida de gota petita, les quals són capaces de dispersar la llum incident de manera que la llum dispersada s'observa de color blau i la llum transmesa d'una tonalitat vermella-taronja (Sul, 2011). Contràriament, l'opacitat o tonalitats grisses indiquen mides de gota superiors a 500 nm, és a dir, macroemulsions o emulsions convencionals.

3.3.3.2. Emulsificació a temperatura constant per addició de tensioactiu a microemulsions (sense inversió de fases)

L'emulsificació va consistir en l'addició d'un segon tensioactiu S2 mitjançant una pipeta pasteur per addicions successives a la fase de microemulsió D1 (2g). Durant l'addició del tensioactiu S2 es va mantenir la mostra en agitació i termostatitzada.

3.3.4. Preparació de nanopartícules

Es van preparar nanopartícules polimèriques a partir de nano-emulsions polimèriques mitjançant el mètode de l'evaporació de solvent. El solvent, acetat d'etil, va ser evaporat de manera controlada mitjançant un rotavapor a pressió reduïda durant 45 minuts (43 mbar, 135 rpm, 25°C, per 4 i 15g de mostra) (Desgouilles, 2003). Degut a que l'acetat d'etil és parcialment soluble en aigua durant el procés d'evaporació també es van evaporar petites quantitats d'aigua. Amb la finalitat de mantenir la concentració inicial de nanopartícules i de principi actiu es va compensar el volum evaporat amb aigua.

Un altre mètode que es va utilitzar per evaporar el solvent, és mantenir la nano-emulsió durant tota una nit en agitació constant i suau a temperatura ambient. Per tal d'augmentar la superfície d'evaporació es va deixar el vial que contenia la nano-emulsió obert. En estudis previs realitzats en el grup es va determinar que realitzant l'evaporació del solvent a temperatura ambient i amb agitació magnètica durant un mínim de 7h era suficient per considerar que tot l'acetat d'etil s'havia evaporat, ja que es va fer un seguiment de la mida de partícula amb el temps d'evaporació i no es va observar variació de la mida a partir de les 7h.

3.3.5. Incorporació del principi actiu

Es va seleccionar la dexametasona com a principi actiu model per estudiar la seva encapsulació en nanopartícules polimèriques. La dexametasona es utilitzada com anti-inflamatori en el tractament de l'asma amb una dosi terapèutica de 10 mg% (10 mg/ 100 mL) (Gómez-Gaete, 2007). Amb la finalitat de tenir aquesta dosi en la formulació es van dissoldre 0.18% de dexametasona en la fase oliosa (Fornaguera, 2015). A continuació, es van preparar les nanopartícules a partir de les nano-emulsions segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.4. Donat que la dexametasona és sensible a la llum es va tenir especial cura de protegir les mostres amb paper d'alumini o d'utilitzar vials de color àmbar per la quantificació del principi actiu mitjançant HPLC (veure secció 3.3.8).

3.3.6. Determinació de l'eficiència d'encapsulació

Es va determinar l'eficiència d'encapsulació del principi actiu en les nanopartícules polimèriques mitjançant un mètode indirecte de filtració/centrifugació. Es va addicionar la dispersió de nanopartícules (2.5-3g) en un tubs Falcon amb un filtre de cel·lulosa regenerada amb un pes molecular límit (MWCO) de 3 kDa, Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units (Millipore). Les mostres van ser centrifugades a 5000 rpm durant 60 minuts. El filtrat que contenia el principi actiu no-encapsulat va ser quantificat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC). Les determinacions per cada composició estudiada es van realitzar per triplicat. L'eficiència d'encapsulació es va calcular d'acord

amb l'Equació 3.2. Els resultats estan expressats com a valor promig \pm desviació estàndard.

$$\text{Eficiència d'encapsulació(\%)} = \frac{1 - DXM_{\text{no-encapsulada}}}{DXM_{\text{teòrica}}} \times 100 \quad (\text{Equació 3.2})$$

3.3.7. Estudis de difusió

Els experiments es van realitzar utilitzant tres recipients de vidre cilíndrics amb doble paret disposats damunt d'una multiplaca amb agitació magnètica, i connectats a un bany termostatitzat per mantenir la temperatura constant. Durant el temps de realització de l'estudi es van mantenir els tres recipients tapats amb Parafilm[®] per tal d'evitar pèrdua de solució receptora per evaporació. Es van utilitzar bosses de diàlisi hidrofíliques Spectra/Por[®] 4 Dialysis Membrane semipermeables, de cel·lulosa regenerada subministrades per Spectrumlabs (ref. 132697), i amb un límit d'exclusió de 12-14 kDa, molt superior al pes molecular del principi actiu. Per tal d'eliminar els possibles residus de la membrana provinent del procés de fabricació així com per acondicionar-les es van deixar en remull en una solució aquosa d'etanol al 10% durant 10 minuts i a continuació durant 20 minuts en aigua MilliQ.

Es va utilitzar aigua com a solució receptora. Els experiments es van realitzar per triplicat i seguint condicions allunyades de la saturació (condicions "sink"), és a dir, utilitzant un volum de solució receptora suficient per a mantenir una concentració de principi actiu durant tot l'assaig molt allunyada de la concentració de saturació. Per assolir condicions "sink" el volum de solució receptora ha de ser com a mínim entre 3 i 10 vegades superior al volum de saturació del principi actiu ("**Dissolution test for solid dosage forms,**" **2008**).

Abans d'iniciar l'estudi es van omplir els vasos encamissats amb 150 mL de solució receptora (aigua MilliQ) i es van deixar uns minuts per a que les solucions assolissin 25°C. La Figura 3.22 mostra una representació esquemàtica del dispositiu emprat en l'estudi d'alliberació del principi actiu.

L'estudi de difusió es va efectuar amb 2.5-3 g de mostra dins de la bossa de diàlisi i submergit en la solució receptora. Amb una pipeta automàtica es va extreure 1 mL de mostra de solució receptora, compensant el volum extret amb solució receptora nova. Es van realitzar les extraccions cada 5, 10, 15, 30, 45min i cada hora durant els períodes (1-9h i 21-30h) i totes les mostres es van dipositar en vials i es van analitzar mitjançant HPLC, obtenint els diferents perfils de difusió.

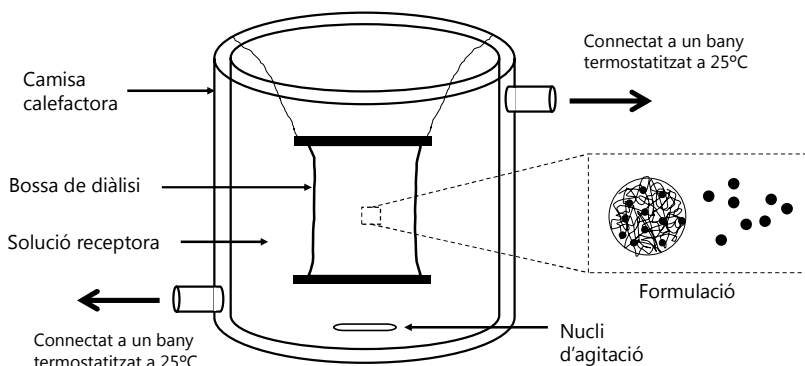


Figura 3.22. Representació esquemàtica del dispositiu emprat en l'estudi d'alliberació del principi actiu.

3.3.8. Quantificació del principi actiu per HPLC

La quantificació del principi actiu es va realitzar mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució "high performance liquid chromatography" (HPLC). El mètode d'anàlisi es va desenvolupar a partir de mètodes descrits a la literatura (**Gómez-Gaete, 2007**). Les determinacions es van realitzar amb una columna Water Spherisorb ODS2 C18 i un detector UV-visible a una longitud d'ona de 238 nm. Es va emprar un mètode isocràtic aigua/acetoni-tril 60/40 v/v, amb un flux de 1 mL/min, un volum d'injecció de 20 µL i a temperatura ambient. El temps de retenció de la dexametasona en aquestes condicions va ser de 4 minuts (Figura 3.23).

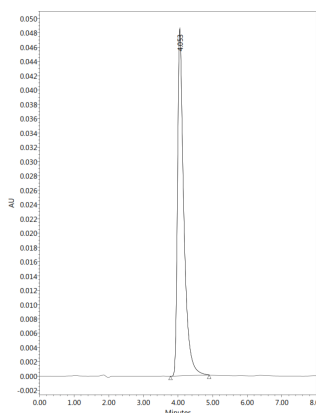


Figura 3.23. Cromatograma representatiu d'una solució de principi actiu (DXM), concentració 16 µg/g.

- Calibrat

El calibrat es va efectuar preparant patrons a diferents concentracions de principi actiu, utilitzant aigua com a dissolvent i analitzant-los en les condicions anteriorment descrites. La representació gràfica del valor de les àrees sota la corba dels pics obtinguts per a cada una de les concentracions de les solucions patrò va permetre extreure la recta de calibrat mitjançant l'ajust dels mínims quadrats o de regressió lineal (Equació 3.3). A partir de les rectes de calibrat es va determinar la zona de resposta lineal, és a dir, les concentracions límit dels patrons.

$$y = A + Bx \quad (\text{Equació 3.3})$$

on **y** és el valor de l'àrea cromatogràfica, **A** és l'ordenada a l'origen, **B** és el pendent de la recta i **x** és la concentració.

La Figura 3.24 presenta la recta de calibrat obtinguda pel principi actiu en aigua.

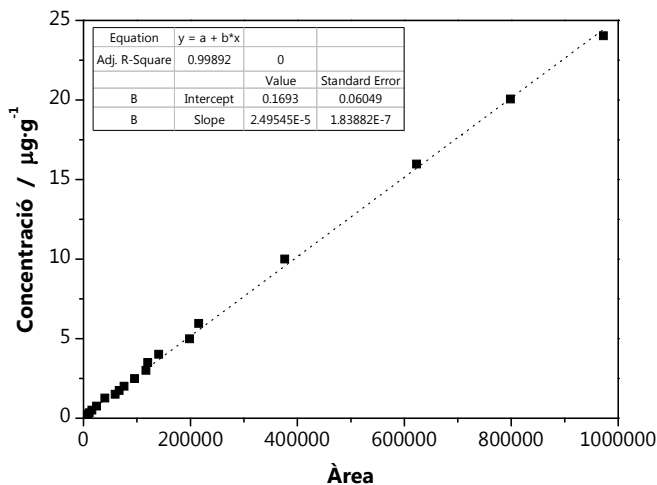


Figura 3.24. Recta de calibrat del principi actiu en aigua. La línia discontinua representa l'ajust per regressió.

D'aquesta manera per interpolació es pot obtenir a partir de la recta de calibrat la concentració de principi actiu en la solució problema.

3.3.9. Anàlisi in vitro de viabilitat de les cèl·lules

Es va analitzar la citotoxicitat de les dispersions de nanopartícules amb i sense fàrmac mitjançant un assaig bioquímic de viabilitat de les cèl·lules a través de la seva activitat metabòlica. L'assaig bioquímic es va realitzar mitjançant el mètode colorimètric MTT (**Riss, 2011**). El MTT o (bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difinitetrazoli) és una sal

de tetrazoli, insoluble en medi aquós, de color groc, que en ser reduït a "formazan" en les cèl·lules vives pren un color lila intens. Quan les cèl·lules moren aquestes perden l'abilitat de reduir el MTT a "formazan", d'aquesta manera aquest mètode colorimètric és un marcador adequat només de les cèl·lules vives i s'empra com una mesura de la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules vives a través de la seva activitat metabòlica redueixen el MTT a "formazan". Així, si posteriorment es dissol la sal precipitada ("formazan") amb DMSO i es realitza la lectura d'absorció d'intensitat a la longitud d'ona de 570 nm s'obté una relació d'absorbàncies que es correlaciona amb la viabilitat del cultiu cel·lular, és a dir, a més intensitat de color, més activitat mitocondrial de les cèl·lules i per tant indica més activitat de les cèl·lules vives. El mecanisme cel·lular a través del qual es produeix la reducció del MTT encara no és del tot conegut, però probablement implica la reacció amb el co-enzim NADH o molècules reductores similars que transfereixen electrons al MTT.

L'assaig es va realitzar com es descriu a continuació:

En una placa de cultiu de 96 pouets es va realitzar el sembrat de les cèl·lules en 200 µL de solució DMEM com a medi de cultiu, a la temperatura de 37°C durant 24h. Després, el medi de cultiu va ser reemplaçat per les mostres diluïdes en medi de cultiu fresc. Les cèl·lules van ser incubades durant 4h a 37°C en atmosfera de CO₂. Després d'aquest temps d'incubació el medi va ser reemplaçat amb 200 µL de medi de cultiu fresc amb la finalitat d'eliminar les nanopartícules que no haguessin entrat a les cèl·lules. Transcorregudes 24h des de l'inici de l'anàlisi es va realitzar l'assaig amb MTT, ja explicat prèviament, per tal de determinar la viabilitat de les cèl·lules a les nanopartícules amb i sense fàrmac per triplicat.

S'ha de mencionar que la manipulació en tot el procés es va realitzar seguint el protocol establert en el laboratori de cultius cel·lulars del departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica de la facultat de Farmàcia de la Universitat de Barcelona. Així, tot el material utilitzat va ser estèril i la manipulació de cultius es va realitzar en una cabina de seguretat biològica, o de flux laminar, desinfectada amb etanol al 70% abans i després del seu ús.

3.3.10. Difusió d'un colorant

Amb l'objectiu d'identificar possibles estructures de microemulsions, es va realitzar l'estudi de la difusió d'un colorant hidròfil (Blau de metilè) i d'un colorant lipòfil (Sudan IV). Es van preparar 2 g de mostra i aquesta es va transferir a un vial que contenia 2 mg de colorant. La difusió del colorant es va avaluar per observació visual durant 2h.

3.3.11. Estimació dels coeficients de difusió per Ressonància Magnètica Nuclear

Amb la finalitat de caracteritzar fases d'estructura discreta (directe o inversa) i de microemulsió bicontínua, es va procedir a determinar els coeficients de difusió de cada un dels components presents en la mostra de microemulsió mitjançant la tècnica d'espectroscopia de ressonància magnètica nuclear (RMN).

Per a les determinacions es van utilitzar tubs de vidre de RMN de 5 mm de diàmetre aptes per treballar a diferents temperatures (ref. WILMAD®528-PP-8) i l'aigua de les mostres va ser substituïda per aigua deuterada (D_2O).

La seqüència de pulsos utilitzada en la present tesi per estimar els coeficients de difusió D va ser una seqüència que utilitza pulsos bipolars per estimular el "spin-echo", "bipolar pulse pair stimulated echo" (BPPSTE) (Wu, 1995), (Liu, 2009), ajustant el gradient ($G = 1 - 30 G \cdot cm^{-1}$), duració del gradient ($\delta = 0.0020 s$), i separació entre els gradients ($\Delta_{aigua} = 0.05$), ($\Delta_{hexadecà} = 0.25$). Les mesures es van realitzar a temperatura constant. La descripció dels fonaments d'aquesta tècnica es troba a la Introducció (secció 1.2.1)

3.3.12. Caracterització de la mida i forma de les gotes per dispersió dinàmica i estàtica de la llum làser

Es van estimar la mida i forma de les microemulsions, la mida de les nano-emulsions i de les nanopartícules polimèriques mitjançant un espectròmetre de correlació creuada de fotons. Per a les determinacions es van utilitzar tubs de vidre de 5 mm de diàmetre (ref. NORELL 5-5-300-7, Select Series™).

Per estimar la mida es van realitzar mesures de dispersió de llum dinàmica "dynamic light-scattering" (DLS). Es van realitzar les mesures a angles de dispersió θ de 45° , 60° , 90° i 120° . L'experiment per cada mostra es va realitzar per triplicat i el temps de cada mesura va ser de 50s a temperatura constant. L'equip amb el que es van realitzar les mesures disposa d'un software amb el que realitza els anàlisis de Cumulants i CONTIN de manera automàtica. L'anàlisi de dades pel mètode "Multi-angle" realitzat de manera manual com es troba descrit a l'apartat 1.2.2.1 de la Introducció.

Per estimar la forma de les gotes es van realitzar mesures de dispersió de llum estàtica "static light-scattering" (SLS). Es van realitzar les mesures a angles de detecció θ entre 35° i 135° amb increments de 10° . El temps de cada mesura va ser de 50s i la temperatura es va mantenir constant. L'anàlisi de les dades es va realitzar segons el procediment descrit a l'apartat 1.2.2.2 de la Introducció.

3.3.13. Estabilitat de les emulsions i de les dispersions de nanopartícules

Es va estudiar l'estabilitat de les nano-emulsions polimèriques i de les dispersions de nanopartícules polimèriques amb i sense fàrmac mesurant la intensitat de llum transmesa i retrodispersada "backscattering" mitjançant un analitzador per retrodifusió de llum (Turbiscan) a la temperatura controlada de 25-28°C, en funció de l'alçada de la mostra (15g). Les mesures es van realitzar cada hora durant un període de 24h.

Capítol 4

Resultats i discussió

4.1. Selecció dels components i estudis preliminars

Per tal d'aprofundir en els mecanismes de formació de les nano-emulsions per mètodes de baixa energia i assolir així un dels principals objectius de la tesi era necessari utilitzar tensioactius que permetessin la formació de nano-emulsions per diferents mètodes. Per aquesta raó es va realitzar una cerca dins del grup de tensioactius no iònics etoxilats. Així mateix en la selecció dels components es va tenir en compte que fossin aptes per possibles aplicacions en el camp farmacèutic o cosmètic.

Amb la finalitat d'obtenir eficiències d'emulsificació elevades pel mètode PIC, és a dir, nano-emulsions amb mida de gota mínima utilitzant la menor quantitat de tensioactiu, es va considerar la formulació de nano-emulsions a temperatures pròximes a la temperatura d'inversió de fase (T_{HLB}) del sistema, ja que és en aquestes condicions on els valors de tensió interfacial O/W són molt baixos i en conseqüència les gotes d'emulsió que es generen són d'una mida molt petita. No obstant, quan els valors de tensió interfacial són baixos la desestabilització de l'emulsió per coalescència es produeix de manera ràpida i fan que tot i que la formació de l'emulsió estigui molt afavorida aquesta sigui inestable. Per altra banda, en aquestes condicions es facilita la presència en el sistema de fases en les quals el film interfacial poseeix curvatura zero (bicontínua ó laminar) durant l'emulsificació.

En base a aquesta hipòtesi calia seleccionar sistemes aigua/tensioactiu/oli que permetessin la formulació de fases de microemulsió pròximes a la temperatura d'inversió de fases i a més que aquesta temperatura T_{HLB} fós pròxima a la temperatura de preparació de les nano-emulsions (25°C). Així en base a aquests requeriments es van seleccionar tensioactius i olis tals que poguessin permetre que el sistema aigua/tensioactiu/oli presentés un balanç hidròfil-lipòfil (HLB) equilibrat.

Primer, es van pre-seleccionar tensioactius no iònics etoxilats amb un nombre del balanç hidròfil-lipòfil (N_{HLB}) proper a 10. La Taula 4.1 mostra els tensioactius no iònics etoxilats pre-seleccionats que cumplien aquests requeriments.

Taula 4.1. Tensioactius pre-seleccionats

| Tensioactiu | Fòrmula química | N_{HLB} |
|-----------------|-----------------|-----------|
| Brij 30 | $C_{12}E_4$ | 9 |
| Synperonic 13/3 | $C_{13}E_3$ | 9 |
| Synperonic A4 | $C_{12-13}E_4$ | 9 |

Dels tensioactius presentats a la Taula 4.1 es va seleccionar el tensioactiu Brij30 per a realitzar els estudis preliminars ja que hi han treballs descrits a la literatura en referència a l'ús d'aquest tensioactiu en la preparació de nano-emulsions per mètodes d'alta i baixa

energia (**Forgiarini, 2001**), (**Izquierdo, 2002**), (**Izquierdo, 2004**), (**Rao, 2010**), (**Noor El-Din, 2012**), (**Ševčíková, 2012**), (**Ontiveros, 2015**).

A continuació es va seleccionar el component oliós en base al tensioactiu seleccionat (Brij30). Estimant una T_{HLB} de 30°C pròxima a la temperatura de preparació de les nano-emulsions (25°C) es va calcular el N_{oil} teòric mitjançant l'equació 1.10, ja descrita prèviament a la introducció (**Kunieda, 1985a**).

Així el valor de N_{oil} teòric va ser de 7.25. A la Taula 4.2 es mostren els olis seleccionats que presenten un valor de N_{oil} (**Kunieda, 1985c**) pròxim al valor de N_{oil} teòric.

Taula 4.2. Olis seleccionats del sistema aigua/Brij30/oli

| Oli | N_{oil} |
|----------|-----------|
| Decà | 8.5 |
| Dodecà | 7 |
| Hexadecà | 7.7 |

Els estudis preliminars van consistir en la determinació de les temperatures d'inversió de fases dels sistemes seleccionats i en l'estudi del seu comportament fàsic amb la finalitat de determinar zones de microemulsió pròximes a la corba de temperatura T_{HLB} .

4.1.1. Temperatures d'inversió de fases

Es van determinar les temperatures d'inversió de fases mitjançant mesures de conductivitat en funció de la temperatura segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.2.

En els tensioactius comercials, com el Brij30, la T_{HLB} varia amb la composició degut a la diferent distribució dels tensioactius homòlegs a la interfase oli-aigua (**Kunieda, 1985a**). En conseqüència, és necessari determinar aquesta T_{HLB} per a cada composició d'interès. A la Figura 4.1 es mostren els perfils de conductivitat específica obtinguts en funció de la temperatura a diferents concentracions de tensioactiu pels sistemes aigua/Brij30/decà, aigua/Brij30/dodecà i aigua/Brij30/hexadecà. El contingut d'oli i les relacions Row seleccionades per a cada sistema van ser escollides per similitud amb els estudis d'altres autors (**Forgiarini, 2001**), (**Izquierdo, 2002**), (**Rao, 2010**).

Com era previst, tots els sistemes estudiats exhibeixen perfils de conductivitat similars independentment del contingut d'oli i de la relació Row (Figura 4.1). A temperatures baixes els valors de conductivitat són elevats indicant que la fase continua és aquosa. En aquestes condicions es formen dispersions de tipus oli-en-aigua (O/W). Al augmentar la temperatura es produeix una disminució brusca en la conductivitat específica fins a valors propers a zero que es mantenen constants al continuar augmentant la temperatura.

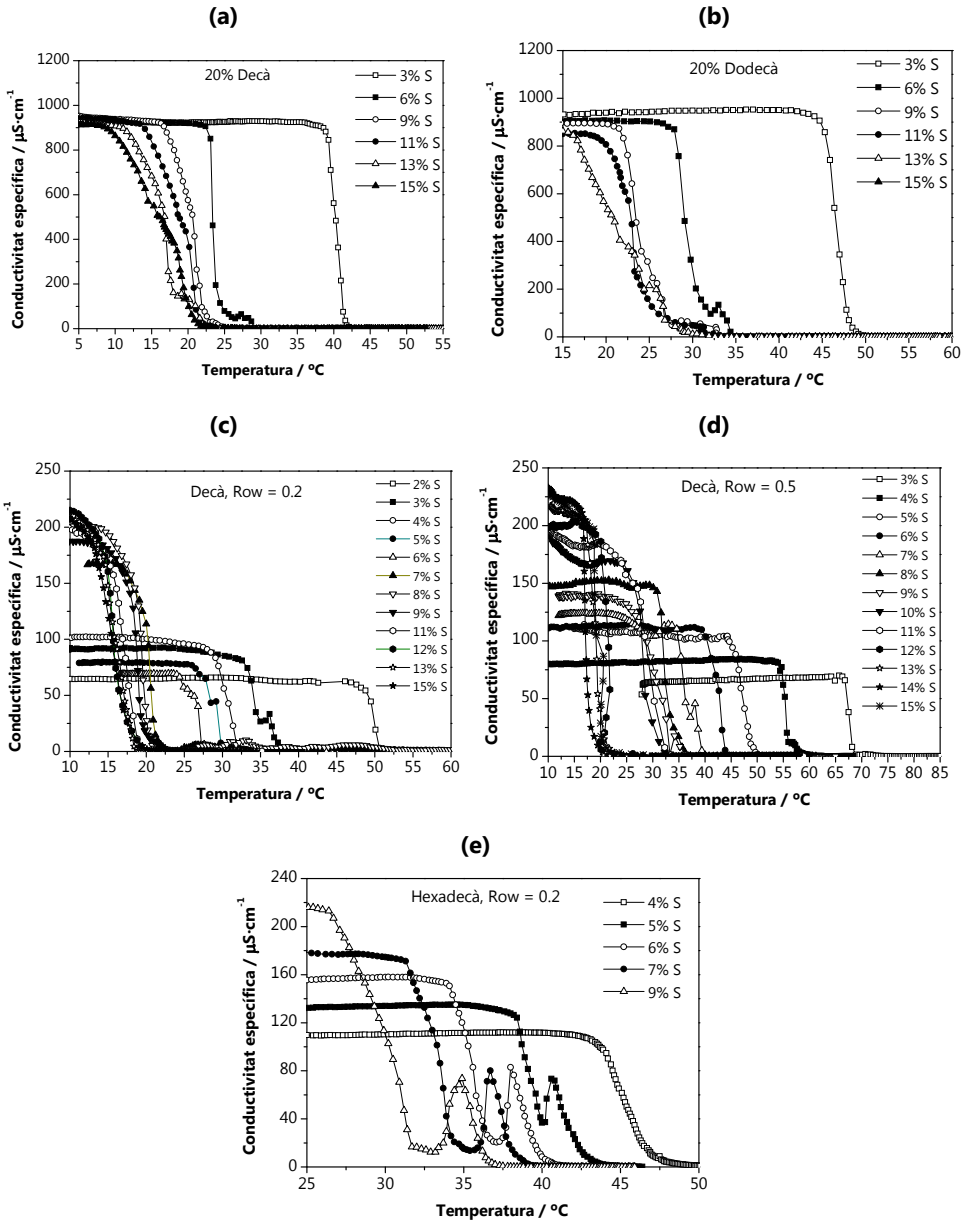


Figura 4.1. Conductivitat específica en funció de la temperatura a diferents concentracions de tensioactiu pels sistemes: (a) aigua/Brij30/decà, 20%O, (b) aigua/Brij30/dodecà, 20%O, (c) aigua/Brij30/decà, Row=0.2, (d) aigua/Brij30/decà, Row=0.5, i (e) aigua/Brij30/hexadecà, Row=0.2.

Aquests valors nuls de la conductivitat específica indiquen que la fase continua és oliosa, la mostra està formada per gotes d'aigua disperses en una fase continua d'oli, és a dir, estructura tipus aigua-en-oli W/O. Per tant, al augmentar la temperatura es produeix una inversió de fases, de O/W a W/O. S'ha de mencionar que no es va detectar disminució de

RESULTATS I DISCUSSIÓ

la conductivitat específica amb la temperatura en la mostra amb 2%S del sistema aigua/Brij30/decà, relació Row 0.5 (Figura 4.1d), indicant així la presència de l'estructura tipus O/W en tot el rang de temperatures estudiat (10-90°C).

Per a cada sistema al augmentar la concentració de tensioactiu disminueix la temperatura a la que es produeix el canvi brusca de conductivitat.

En els perfils de conductivitat específica pel sistema aigua/Brij30/hexadecà, relació Row 0.2, (Figura 4.1e), i concentració de tensioactiu superior al 5% després d'haver-se produït la disminució pronunciada de la conductivitat fins a valors propers a zero es detecta un augment de la conductivitat específica fins a assolir un màxim relatiu i després torna a disminuir fins a valors pràcticament nuls. Aquest fet indica que la inversió d'estructures O/W a W/O es produeix mitjançant estructures bicontínues com per exemple cristalls líquids laminars o estructures tipus esponja (Kunieda, 1996), (Izquierdo, 2002).

La temperatura a la que es produeix aquesta disminució brusca de la conductivitat específica s'anomena temperatura d'inversió de fases (T_{HLB}). Es troben descrits varis criteris per calcular la T_{HLB} en funció del perfil de conductivitat obtingut. El criteri que s'ha seguit en aquest treball és basa en la determinació del valor mig de temperatura entre els valors de temperatura abans i després que es produeixi la caiguda de la conductivitat. A partir dels perfils de conductivitat en funció de la temperatura s'han determinat les temperatures d'inversió de fases per a cada concentració de tensioactiu examinada. Així els valors de T_{HLB} del sistema aigua/Brij30/component oliós s'indiquen a la Taula 4.3 i a la Figura 4.2.

Taula 4.3. T_{HLB} en funció del %S pels sistema aigua/Brij30/component oliós, (dodecà, decà i hexadecà).

| % S | Dodecà | Decà | | Hexadecà |
|-----|--------|-------|---------|----------|
| | 20% O | 20% O | Row=0.5 | Row=0.2 |
| 2 | - | - | > 90.0 | 49.0 |
| 3 | 45.7 | 40.2 | 70.8 | 37.6 |
| 4 | - | - | 56.9 | 29.6 |
| 5 | - | - | 47.8 | 28.4 |
| 6 | 30.5 | 26.1 | 42.2 | 27.0 |
| 7 | - | - | 37.3 | 19.0 |
| 8 | - | - | 33.7 | 17.8 |
| 9 | 26.2 | 20.4 | 29.2 | 17.8 |
| 10 | - | - | 28.6 | 16.9 |
| 11 | 25.7 | 19.0 | 25.1 | 14.3 |
| 12 | - | - | 23.5 | 13.9 |
| 13 | 23.2 | 16.5 | 22.4 | 15.2 |
| 14 | - | - | 22.5 | 16.6 |
| 15 | 23.5 | 16.0 | 22.6 | 14.9 |

Els valors de T_{HLB} obtinguts pels sistemes aigua/Brij30/decà i aigua/Brij30/dodecà, 20% oli i 3%S concorden amb valors descrits a la literatura (Izquierdo, 2002), (Rao, 2010). El mateix succeeix amb el sistema aigua/Brij30/decà, relació Row 0.2 i 5%S (Forgiarini, 2001).

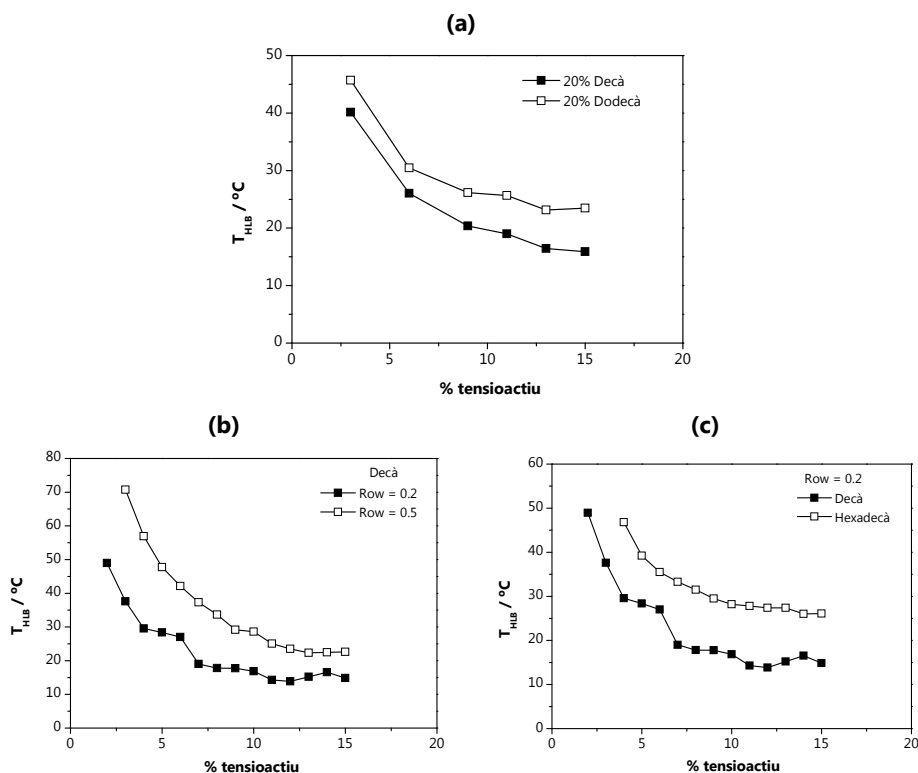


Figura 4.2. T_{HLB} en funció de la concentració de tensioactiu pels sistemes: (a) aigua/Brij30/decà i aigua/Brij30/dodecà amb un contingut d'oli del 20%, (b) aigua/Brij30/decà, Row=0.2 i Row=0.5, (c) aigua/Brij30/decà i aigua/Brij30/hexadecà, Row=0.2.

En tots els sistemes estudiats els perfils de la corbes de T_{HLB} en funció de la concentració de tensioactiu (Figura 4.2) són similars, com era previst (Kunieda, 1985b), (Ghoulam, 2004). La T_{HLB} disminueix al augmentar la concentració de tensioactiu fins a mantenir-se constant a concentracions de tensioactius properes al 10-15% depenent del sistema.

Al comparar els valors de T_{HLB} del sistema amb decà amb els sistemes amb dodecà (Taula 4.3 i Figura 4.2a) i hexadecà (Taula 4.3 i Figura 4.2c) es confirma, com s'esperava, que aquests últims presenten valors superiors. Així mateix, el sistema amb dodecà presenta unes T_{HLB} superiors a les corresponents al sistema amb decà (Figura 4.2a) ja que la T_{HLB} augmenta al augmentar la longitud de la cadena hidrocarbonada de l'oli. Aquest fenomen és degut a l'habilitat de les molècules d'oli a introduir-se entre les cadenes

hidrocarbonades de les molècules de tensioactiu de la pel·lícula interfacial, modificant la geometria òptima del film de tensioactiu en la interfase oli-aigua. Els olis de cadena més curta penetren amb més facilitat entre les cadenes hidrocarbonades de les molècules de tensioactiu i això afavoreix la curvatura plana del tensioactiu i en conseqüència la inversió de fases (**Rao, 2010**).

En el sistema aigua/Brij30/deca (Figura 4.2b) s'observa que al augmentar la relació Row, és a dir, el contingut d'oli, la inversió de fases té lloc a temperatures més elevades. Es troba descrit a la literatura que hi ha una relació lineal entre la T_{HLB} i la Row (**Kunieda, 1985b**), (**Forgiarini, 2001**).

Els tensioactius comercials són mesclades de molècules amb diferent grau d'etoxilació (homòlegs). Els homòlegs etoxilats experimenten un fenomen de partició en la interfase. D'aquesta manera, els homòlegs amb un grau d'etoxilació més baix, per tant més lipòfils, es dissolen preferentment en la fase oliosa, i els homòlegs de grau d'etoxilació més gran, és a dir, més hidròfils, es dissolen en la fase aquosa (**Graciaa, 1983**), (**Márquez, 2002**). Així el fet que la T_{HLB} augmenti amb la relació Row és atribuïble a la diferent partició dels homòlegs de tensioactius entre les fases aquosa i oliosa (**Kunieda, 1985b**). Al augmentar el contingut d'oli en el sistema la interfase aigua-oli es fa més hidròfila degut a que els homòlegs etoxilats més lipòfils es dissolen en la fase oliosa. En conseqüència és necessari augmentar la temperatura per a que es produeixi la inversió de fases de O/W a W/O.

4.1.2. Comportament fàsic

A partir del coneixement de la variació de la T_{HLB} en funció de la concentració de tensioactiu es va focalitzar l'estudi del comportament fàsic a temperatures properes a aquesta temperatura. El coneixement previ de les T_{HLB} va facilitar la identificació de fases d'estructura tipus O/W i fases d'estructura W/O.

S'ha de mencionar que l'estudi del comportament fàsic mitjançant diagrames de fases es va realitzar majoritàriament mantenint la relació Row constant, ja que es va considerar més interessant des del punt de vista de l'aplicació mantenir la relació Row constant que fixar el contingut d'oli (**Kunieda, 1985c**). No obstant, per similitud amb altres estudis es va fixar el contingut d'oli en lloc de la relació Row (**Izquierdo, 2002**), (**Izquierdo, 2004**).

La Taula 4.4 mostra la nomenclatura utilitzada en aquest treball per identificar les fases. Els subíndex 1 i 2 es refereixen a estructures directes i inverses, respectivament.

Taula 4.4. Nomenclatura de les principals fases trobades en els sistemes aigua/tensioactiu/component oliós a les quals es farà referència en els diagrames de fases.

| Nomenclatura | Descripció |
|-----------------|--|
| D ₁ | Fase líquida isotropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W. |
| D' ₁ | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'oli (curvatura còncaua o positiva). |
| L α | Fase anisòtropa i lleugerament viscosa que correspon a una fase de cristall líquid laminar. |
| D ₂ | Fase líquida isotropa i transparent de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura W/O. |
| D' ₂ | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'aigua (curvatura convexa o negativa). |

Els resultats del comportament fàsic per a cada un dels sistemes estudiats es mostren en els diagrames de la Figura 4.3 on també s'hi han representat les corbes de la T_{HLB}. En tots els diagrames s'observen regions monofàsiques pròximes a la corba de T_{HLB} així com una regió multifàsica per sota de la corba de T_{HLB} d'estructura oli-en-aigua O/W designada **M₁** i una regió multifàsica per damunt de la corba de T_{HLB} d'estructura aigua-en-oli W/O anomenada **M₂**.

En els diagrames de fases dels sistemes, aigua/Brij30/decà (Figura 4.3a) i aigua/Brij30/dodecà (Figura 4.3b) amb una concentració constant d'oli del 20% apareix una regió monofàsica que és birrefringent al moviment designada **D'₂**. Aquesta zona es troba en un rang molt estret de temperatures, 24-26°C pel sistema aigua/Brij30/decà, i 31-32°C pel sistema aigua/Brij30/dodecà, i en un rang de concentració de tensioactiu de 8-15% per ambdós sistemes. En aquests sistemes no es van detectar fases de microemulsió d'estructura O/W pròximes a la corba de T_{HLB} que són d'interès en aquest treball per a la posterior preparació de nano-emulsions.

Els estudis de comportament fàsic del sistema aigua/Brij30/decà amb relacions Row de 0.2 (Figura 4.3c) i 0.5 (Figura 4.3d) mostren que es forma una regió monofàsica, anisòtropa i lleugerament viscosa, denominada **L α** , que podria correspondre a una fase de cristall líquid laminar. Per la relació Row 0.5, es forma una tercera regió monofàsica, líquida, isotropa i transparent, designada **D₂**, que correspon a solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura W/O.

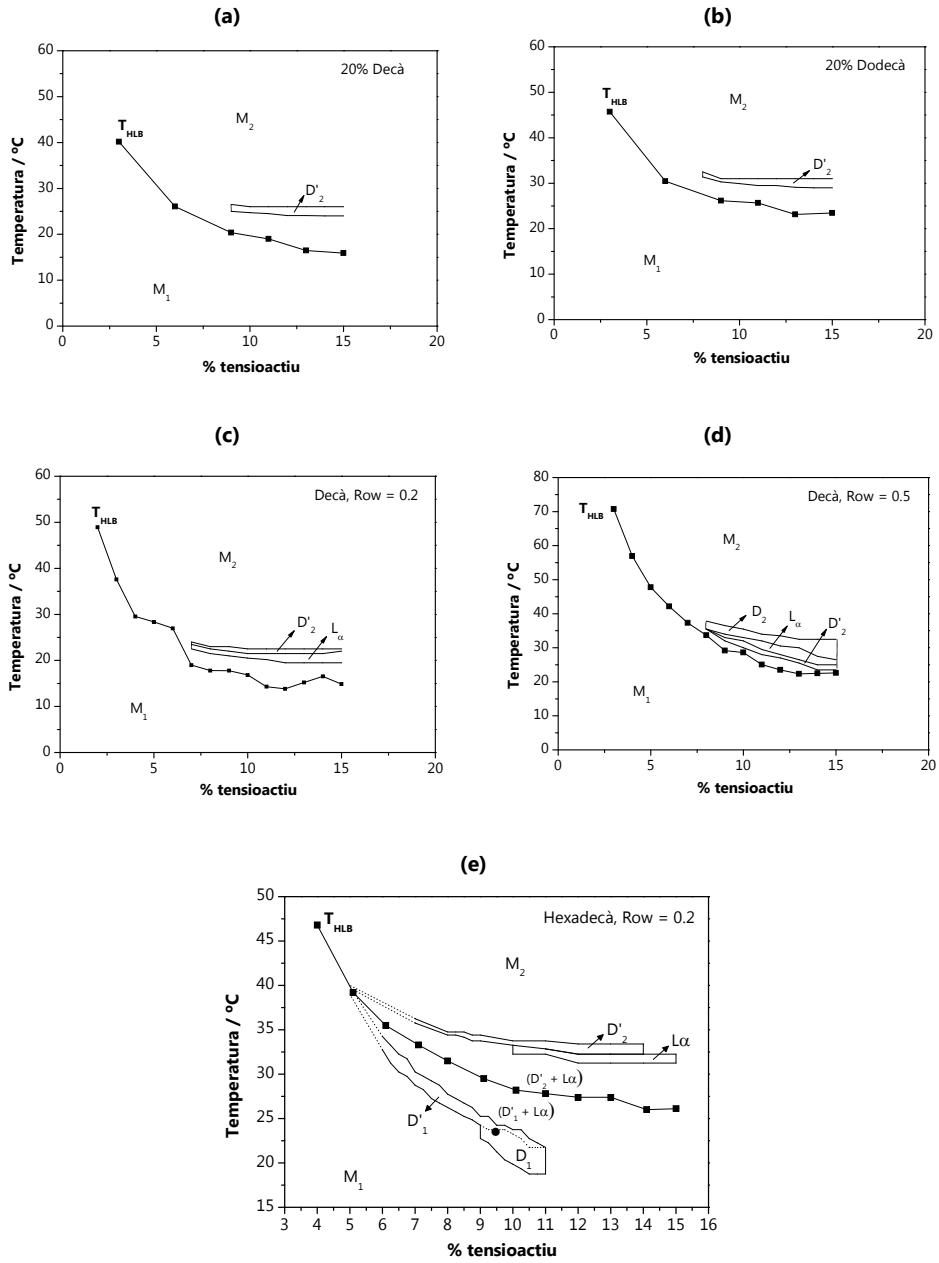


Figura 4.3. Diagrames de fases en funció de la concentració de tensioactiu i la temperatura pels sistemes: (a) aigua/Brij30/decà, 20%O, (b) aigua/Brij30/dodecà, 20%O, (c) aigua/Brij30/decà, Row=0.2, (d) aigua/Brij30/decà, Row=0.5, i (e) aigua/Brij30/hexadecà, Row=0.2. S'han representat també les corbes de T_{HLB} . (M_1 : multifàsic d'estructura O/W, M_2 : multifàsic d'estructura W/O, D'_2 : fase líquida líquida birrefringent al moviment d'estructura W/O, D_2 : fase líquida isòtropa i transparent d'estructura W/O, D'_1 : fase líquida birrefringent al moviment d'estructura O/W, D_1 : fase líquida isòtropa i transparent d'estructura O/W)

La presència de fases de microemulsió d'estructura W/O en el sistema aigua/Brij30/deca, relació Row 0.5, permetria mitjançant dilució la posterior formació de nano-emulsions d'estructura W/O, però no la formació de nano-emulsions d'estructura O/W que es el que es pretenia en la present tesi, ja que són més interessants des del punt de vista de formulació a nivell industrial (Maali, 2013), (Tadros, 2013). Per aquesta raó no es va continuar l'estudi amb el sistema aigua/Brij30/deca.

El diagrama de fases pel sistema aigua/Brij30/hexadeca, relació Row 0.2 (Figura 4.3e) a més de les regions monofàsiques D'_2 i $L\alpha$ observades en els diagrames de fases del sistema aigua/Brij30/deca descrites prèviament, presenta una tercera regió monofàsica, líquida i isotropa situada per sota de la corba de T_{HLB} , anomenada D_1 que correspon a solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W. Dins d'aquesta regió, D_1 , s'observa una subregió de fase líquida que presenta birrefringència al moviment assignada com D'_1 , que podria correspondre a una fase de micel·les cilíndriques o a una fase de microemulsió bicontínua.

En les zones del diagrama entre les regions monofàsiques D_2 , L_w i D_1 , properes a la corba de T_{HLB} coexisteixen les fases ($D'_2+L\alpha$) per damunt de la corba de T_{HLB} i ($D'_1+L\alpha$) per sota de la corba de T_{HLB} .

S'ha de mencionar que la fase $L\alpha$ es va observar per microscopia òptica mitjançant llum polaritzada però degut a la fragilitat de la mostra no va ser possible identificar el tipus de cristall líquid. A més, el rang estret de temperatures en el que es forma aquesta fase no va permetre la caracterització per dispersió de raigs-X a angles petits (SAXS).

Els resultats preliminars obtinguts amb els sistemes aigua/Brij30/ component oliós (dodeca, deca, hexadeca) van evidenciar la presència de fases de microemulsió d'estructura O/W properes a la corba de T_{HLB} únicament en el sistema aigua/Brij30/hexadeca. Per tant, el sistema aigua/Brij30/hexadeca va ser el sistema seleccionat per continuar l'estudi d'aquest treball per tal d'assolir un dels objectius de la present tesi doctoral.

4.2. Comportament fàsic del sistema aigua/Brij30/hexadecà i caracterització de fases de microemulsió

Una vegada determinades fases de microemulsió d'estructura O/W pròximes a la corba de T_{HLB} es pretenia en una segona etapa preparar nano-emulsions per mètodes de baixa energia pel sistema aigua/Brij30/hexadecà.

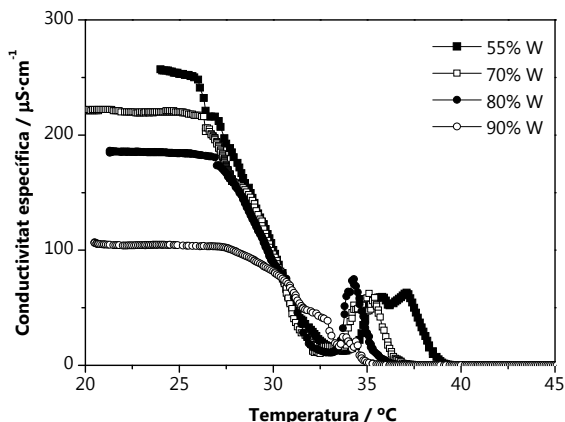
En el procés d'emulsificació per dilució amb aigua de fases de microemulsió O/W (**D₁**) del sistema aigua/Brij30/hexadecà, la relació Row inicial 0.2 va disminuint com a conseqüència de l'augment del contingut d'aigua. Per tant, calia estudiar el comportament fàsic del sistema en el rang de relació Ros 0.63-0.70 corresponents a les composicions de la regió **D₁** per tal d'identificar les fases presents durant el el procés d'emulsificació per dilució amb aigua.

4.2.1. Determinació de la corba de la T_{HLB}

Es va determinar la T_{HLB} de composicions del sistema aigua/Brij30/hexadecà amb una relació Ros de 0.67 en funció del contingut d'aigua. Es va seleccionar relació Ros de 0.67, per similitud amb estudis d'altres autors (**Morales, 2003**). Els valors de T_{HLB} es van determinar mitjançant mesures de conductivitat, d'acord amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.2. de la part experimental.

A la Figura 4.4 es mostra el perfil de la conductivitat específica en funció de la temperatura i del contingut d'aigua. La mostra amb un 5% d'aigua (concentració no representada) presentava valors de conductivitat nuls i es mantenien constants amb la temperatura, indicant així estructura de fase continua oliosa en tot el rang de temperatures estudiat. A la mostres amb un contingut d'aigua entre el 15% i el 50% no es va poder determinar bé la conductivitat específica a temperatures baixes degut a la viscositat com a conseqüència de la presència d'estructures de cristall líquid. En els perfils de conductivitat amb continguts d'aigua superiors al 55% després d'haver-se produït la disminució pronunciada de la conductivitat fins a valors pròxims a zero es detecta un augment de la conductivitat específica fins a assolir un màxim relatiu i després torna a disminuir fins a valors pràcticament nuls. Aquest fenomen, com ja s'ha comentat en els estudis preliminars, indicaria que la inversió O/W a W/O es produeix mitjançant, per exemple, fases de cristalls líquids laminars o estructures tipus esponja.

A partir dels perfils de conductivitat es van obtenir els valors de les T_{HLB} que es mostren a la Taula 4.5. Es percep que la T_{HLB} augmenta lleugerament amb el contingut d'aigua.



Taula 4.5. Valors de la T_{HLB} en funció del %W pel sistema aigua/Brij30/hexadecà, Ros=0.67.

| % W | T_{HLB} |
|-----|-----------|
| 55 | 28.8 |
| 70 | 29.0 |
| 80 | 29.8 |
| 90 | 31.3 |

Figura 4.4. Conductivitat específica en funció de la temperatura per a diferents continguts d'aigua del sistema aigua/Brij30/hexadecà, Ros=0.67.

4.2.2. Comportament fàsic proper a la corba de la T_{HLB}

A partir de les determinacions de les T_{HLB} es va realitzar l'estudi del comportament fàsic a temperatures properes a la T_{HLB} . Com ja s'ha esmentat prèviament, les mesures de conductivitat en funció de la temperatura va permetre diferenciar el tipus d'estructura (O/W ó W/O) de les fases presents en el diagrama.

La Figura 4.5 mostra el diagrama de fases obtingut del sistema aigua/Brij30/hexadecà per a una relació Ros 0.67 en funció de la temperatura i del contingut d'aigua. Així mateix també es mostra el valor de T_{HLB} .

Es van identificar dues regions monofàsiques:

- **D₁** correspon a una fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W. Aquesta regió presenta una subregió **D'₁**, una fase líquida que presenta birrefringència al moviment que podria correspondre a una fase de micel·les cilíndriques ó a una fase de microemulsió bicontínua, d'estructura O/W.
- **D₂** correspon a una fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura W/O. Dins d'aquesta regió hi ha una subregió **D'₂** que correspon a una fase líquida que presenta birrefringència al moviment.

La resta del diagrama està format per una regió multifàsica, **M**, d'emulsions O/W, **M₁**, per sota de la corba de T_{HLB} , i d'emulsions W/O, **M₂**, per damunt de la corba de T_{HLB} .

S'ha de mencionar, que es va comprovar que la fase **D₁** fos microemulsió ja que al desestabilitzar el sistema fent rampes de temperatures aquest recuperava l'aspecte inicial al retornar a la temperatura de formació. Per altra banda, dins la regió **M₁** es va observar

mitjançant llum polaritzada la presència de cristall líquid en el rang de contingut d'aigua de 15-50% i a temperatures inferiors als 30°C.

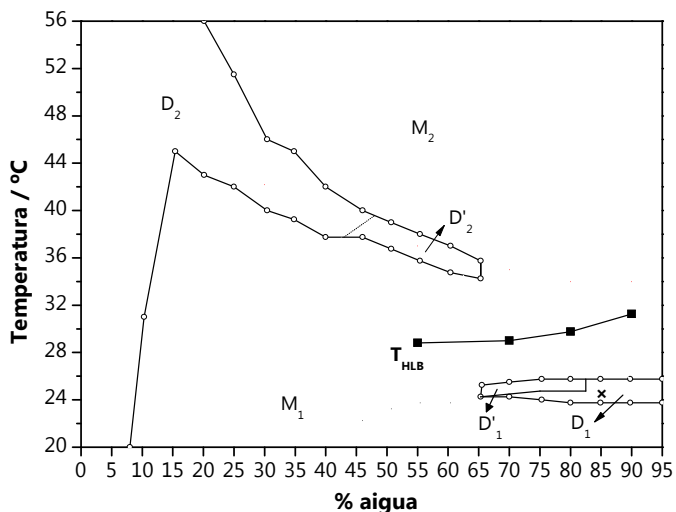


Figura 4.5 Diagrama de fases en funció de la concentració d'aigua i la temperatura pel sistema aigua/Brij30/hexadecà per a $Ros=0.67$. (D₁: fase líquida isòtropa i transparent d'estructura O/W, D'₁: fase líquida birrefringent al moviment, D₂: fase líquida isòtropa i transparent d'estructura W/O, D'₂: fase líquida birrefringent al moviment, M₁: emulsions d'estructura O/W, M₂: emulsions d'estructura W/O, T_{HLB}: temperatura d'inversió de fase. Els valors de la T_{HLB} en funció de la concentració d'aigua s'indiquen amb e símbol (■).

Així mateix es va determinar el comportament fàsic per altres valors de Ros. Com a resum, a la Figura 4.6 es mostren les regions monofàsiques **D₂** i **D₁** obtingudes pel sistema aigua/Brij30/hexadecà per a Ros entre 0.63 i 0.70. La regió **D₂** es manté quasi inalterable amb la relació Ros en el rang estudiat (Figura 4.6a). Contràriament, la regió **D₁** es desplaça lleugerament a temperatures més elevades en augmentar la relació Ros (Figura 4.6b).

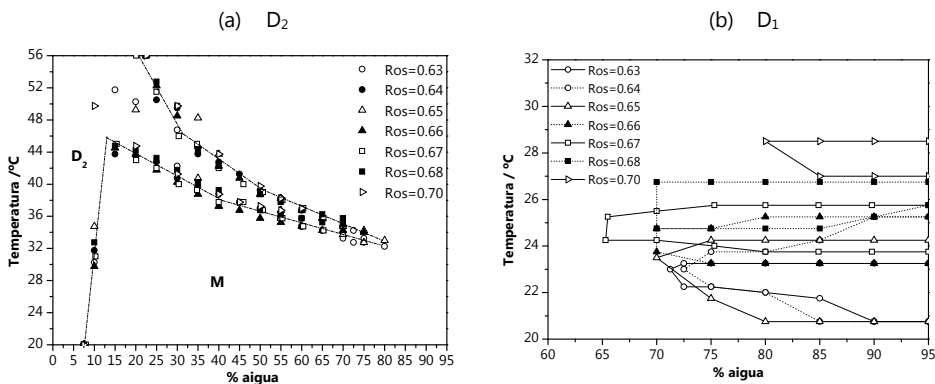


Figura 4.6. Representació de les regions D_2 (a) i D_1 (b) en funció de la temperatura i del contingut d'aigua per a diferents relacions Ros del sistema aigua/Brij30/hexadecà. D_1 : fase líquida isotropa i transparent d'estructura O/W, D_1' : fase líquida isotropa i transparent d'estructura W/O.

4.2.3. Caracterització de fases de microemulsió del sistema aigua/Brij30/hexadecà

La caracterització de les microemulsions es va realitzar amb la finalitat de poder relacionar les seves propietats amb les característiques de les nano-emulsions obtingudes per mètodes de baixa energia. Per determinar l'estructura de les microemulsions es van utilitzar les tècniques d'Espectroscopia de Ressonància Magnètica Nuclear (Diffusion Ordered Spectroscopy 1H NMR (DOSY 1H NMR)), i dispersió de la llum làser (Dynamic Light Scattering, DLS, i Static Light Scattering, SLS) (Kahlweit, 1987). Prèviament es van realitzar estudis de difusió d'un colorant.

4.2.3.1. Estudi de difusió d'un colorant

L'estudi de la difusió del colorant es va realitzar d'acord amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.10 de la part experimental. Es va seguir la difusió d'un colorant hidròfil i un lipòfil en les fases de microemulsió de tipus O/W, (D_1 i D_1'), del sistema aigua/Brij30/hexadecà, relació Ros 0.67 en el rang de 70 a 95% d'aigua a la temperatura controlada de 25°C.

Com s'il·lustra a la Figura 4.7 el colorant hidròfil difon ràpidament a través de la mostra en tot el rang de contingut d'aigua estudiat, indicant la presència de fase continua aquosa, estructura tipus oli-en-aigua O/W. Aquests resultats estan en concordança amb els resultats previs obtinguts per conductivitat. A la mostra amb un 72.5% de contingut d'aigua s'observa com la difusió del colorant es produeix a través d'un canal, que es podria atribuir a la presència d'estructures bicontínues en la fase de microemulsió. Això estaria en concordança amb la birefringència al moviment observada en l'estudi del comportament fàsic.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

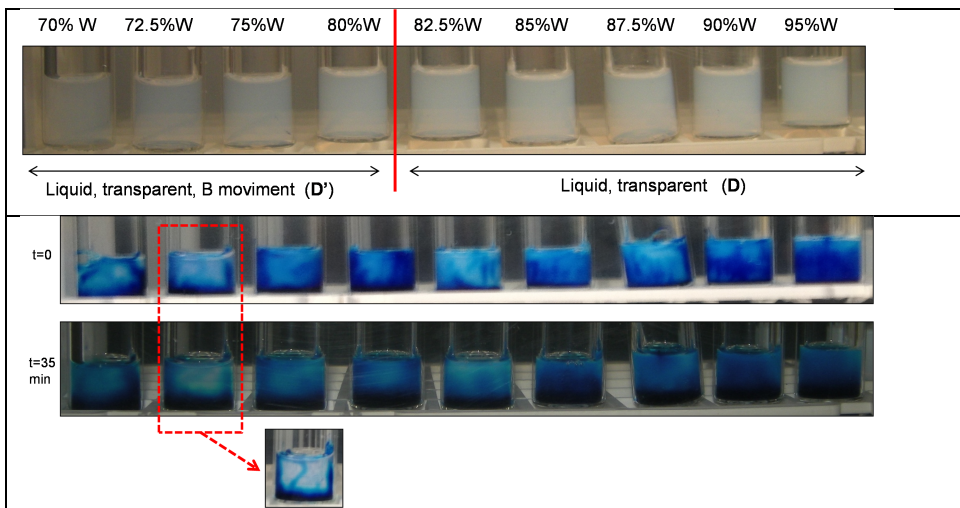


Figura 4.7. Difusió del colorant hidròfil en microemulsions del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, $T=25^{\circ}\text{C}$, en funció del contingut d'aigua. (B: birrefringent)

Així mateix es va fer l'estudi de difusió amb un colorant lipòfil, Sudan IV. Els resultats en mostres de la regió \mathbf{D}_1 i \mathbf{D}'_1 es mostren a la Figura 4.8. Es percep que el colorant persisteix al fons del vial i que pràcticament no hi ha difusió d'aquest en la mostra, indicant per tant l'absència de fase continua oliosa, confirmant així l'estructura de tipus O/W ja deduïda prèviament en les determinacions realitzades per conductivitat.

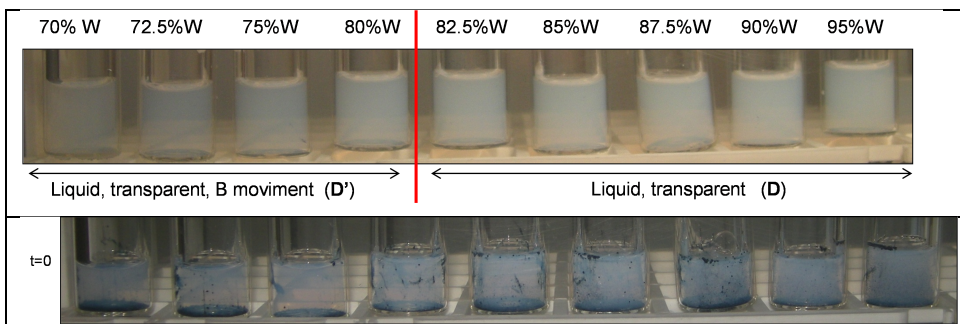


Figura 4.8. Difusió del colorant lipòfil en mostres de la regió \mathbf{D}_1 i \mathbf{D}'_1 del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, $T=25^{\circ}\text{C}$, en funció del contingut d'aigua.

L'estudi de la difusió dels colorants encara que va permetre diferenciar entre estructures tipus oli-en-aigua O/W i estructures tipus aigua-en-oli W/O, no va permetre evidenciar diferències entre la fase \mathbf{D}_1 (fase líquida isotropa d'estructura O/W) i la fase \mathbf{D}'_1 (fase líquida birrefringent al moviment) del sistema aigua/Brij30/hexadecà. Per tant, es va procedir a realitzar estudis més complexos per mitjà d'altres tècniques a fi d'esbrinar l'estructura de les microemulsions en aquest rang de concentracions.

4.2.3.2. Determinació dels coeficients de difusió dels components de les microemulsions per RMN

Amb l'objectiu d'esbrinar l'estructura de les microemulsions en les quals s'havia observat birefringència al moviment amb llum polaritzada, es va procedir a la determinació dels coeficients de difusió per mitjà de la tècnica d'espectroscopia de RMN dels components de les microemulsions del sistema aigua/Brij30/hexadecà d'acord amb el procediment descrit a l'apartat 3.3.11 de la part experimental.

Es troba descrit a la literatura que mitjançant la determinació dels coeficients de difusió per la tècnica d'espectroscopia de RMN de microemulsions es pot caracteritzar l'estructura de microemulsions directes, inverses i bicontínues, (**Olsson, 1986**), (**Solans, 1993**), (**Liu, 2009**). Així mateix, es troben descrits altres tipus d'experiments mitjançant l'espectroscopia de ressonància magnètica nuclear que són utilitzats per a la determinació dels coeficients de difusió (**Johnson, 1999**), (**Claridge, 2009**). No obstant, actualment la tècnica DOSY 1H NMR és la que proporciona uns resultats més acurats.

Prèviament es va realitzar una mesura de protó (^1H NMR) per tal d'assignar els pics als components del sistema. La Taula 4.6 mostra les espècies corresponents als desplaçaments químics dels pics representats a la Figura 4.9 i les molècules identificades presents a la mostra.

Taula 4.6. Assignació de pics dels components del sistema aigua/Brij30(tensioactiu)/hexadecà.

| δ / ppm | Espècie | Molècula identificada |
|----------------|------------------|-----------------------|
| 1.16 | CH ₃ | Hexadecà |
| 3.58 | EO | Tensioactiu |
| 4.66 | D ₂ O | Aigua deuterada |

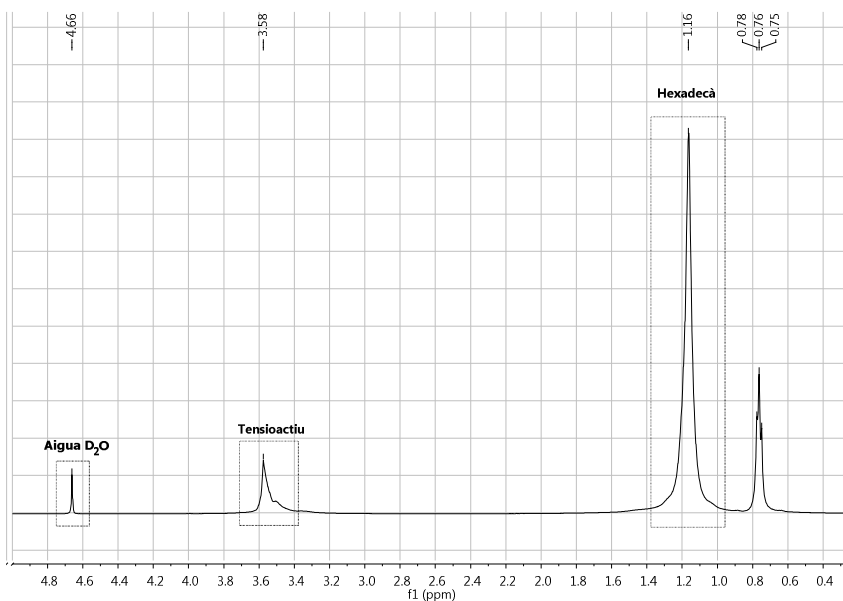


Figura 4.9. Exemple d'espectre de protó per RMN (¹H NMR) d'una mostra del sistema aigua/Brij30 (tensioactiu)/hexadecà.

Una vegada realitzada l'assignació de pics es va procedir a realitzar els experiments per estimar els coeficients de difusió de l'aigua i de l'hexadecà de les microemulsions, seguint la seqüència BPPSTE d'acord amb el procediment descrit al apartat 3.3.11. Per determinar el coeficient de difusió de l'aigua i de l'hexadecà, va ser necessari realitzar l'experiment en dues condicions diferents ja que la caiguda de la senyal de la intensitat de l'aigua D₂O es produïa a una major velocitat que la caiguda de la senyal de la intensitat de l'hexadecà. En les mesures realitzades es van obtenir una sèrie d'espectres de protó en funció de l'amplitud del gradient (Figura 4.10 i Figura 4.11).

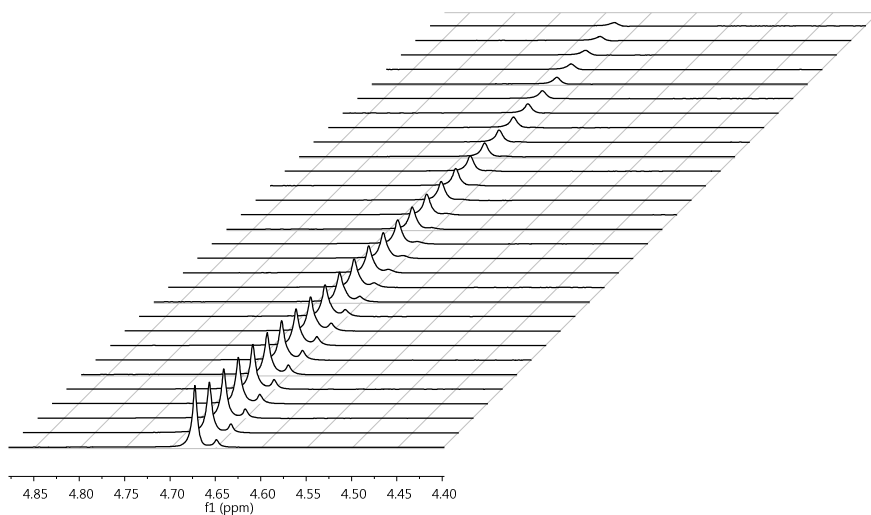


Figura 4.10. Disminució progressiva de la senyal d'intensitat de l'aigua D_2O (^1H NMR) en funció de l'augment de gradient.

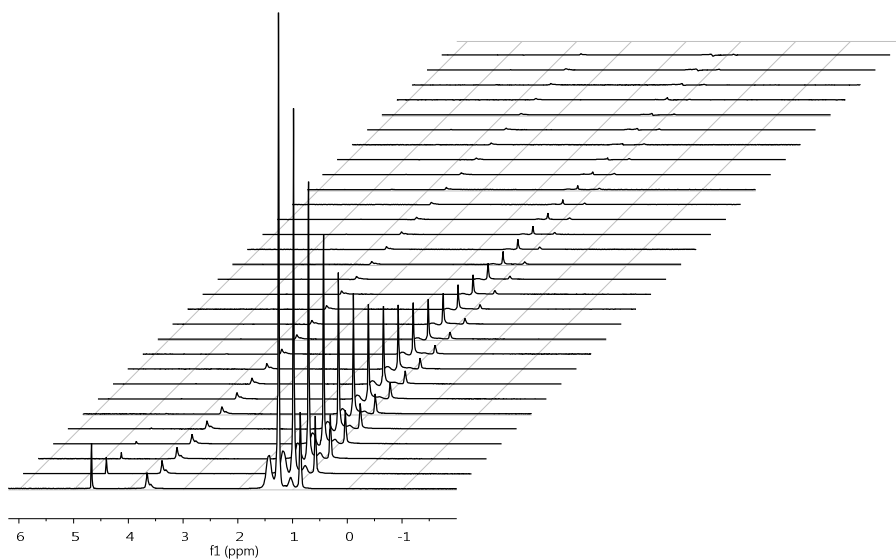


Figura 4.11. Disminució progressiva de la senyal d'intensitat de l'hexadecà (^1H NMR) en funció de l'augment de gradient.

A partir de l'ajust per regressió de la intensitat del pic (IG) en funció del gradient al quadrat (G^2) (Figura 4.12) es van obtenir els coeficients de difusió de l'aigua, D_w i de l'hexadecà D_o de les microemulsions.

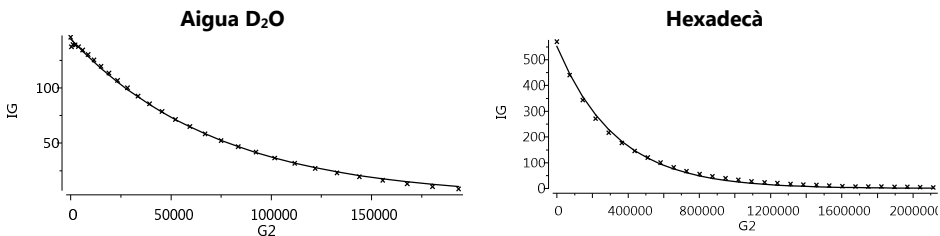


Figura 4.12. Representació de la caiguda de la intensitat (IG) en funció del gradient al quadrat (G^2) per l'aigua D_2O i l'hexadecà, respectivament. La línia contínua mostra l'ajust per regressió dels valors experimentals obtinguts.

S'ha de mencionar que el coeficient de difusió obtingut per l'hexadecà és un coeficient de difusió aparent, ja que en l'assignació de pics s'ha de tenir en compte que el grup funcional CH_3 també està present en el component tensioactiu de la mostra.

Així mateix, per tal d'evaluar els coeficients de difusió de l'aigua i de l'hexadecà en termes d'estructura va ser necessari determinar els coeficients de difusió de l'aigua i de l'hexadecà purs a cada temperatura estudiada.

La Figura 4.13 mostra els coeficients de difusió de l'aigua i de l'hexadecà purs a les diferents temperatures en les que es van realitzar les mesures.

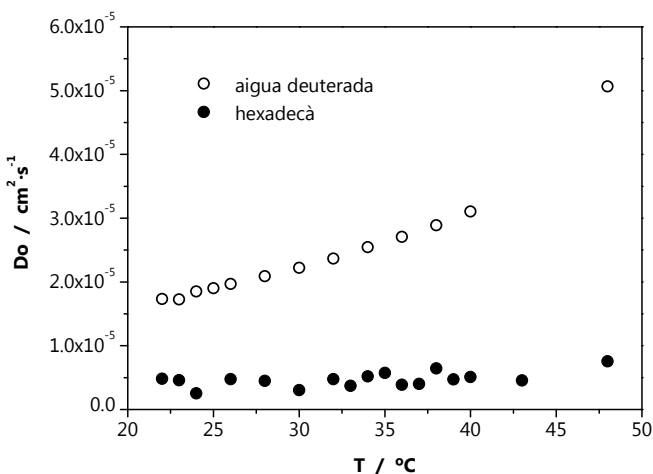


Figura 4.13. Coeficients de difusió de l'aigua deuterada i de l'hexadecà purs (D_o^{aigua} , $D_o^{hexadecà}$) en funció de la temperatura.

Es van determinar els coeficients de difusió relatius de l'aigua i del hexadecà (oli) presents en les microemulsions a una temperatura determinada, dividint els respectius coeficients de difusió de l'aigua i de l'hexadecà (oli) en les microemulsions, (D_w , D_o), pels coeficients de difusió dels mateixos, purs, (D_o^{aigua} , $D_o^{hexadecà}$).

La Figura 4.14b mostra els coeficients de difusió relatius de l'aigua (D/D_o)_{aigua} i de l'hexadecà (D/D_o)_{hexadecà} en funció del contingut d'aigua de les microemulsions del sistema aigua/Brij30/hexadecà, amb una relació Ros 0.67. A la Figura 4.14 també s'ha representat el diagrama de fases del sistema en funció de la temperatura i del contingut d'aigua amb les composicions caracteritzades per RMN senyalades en punts de color negre.

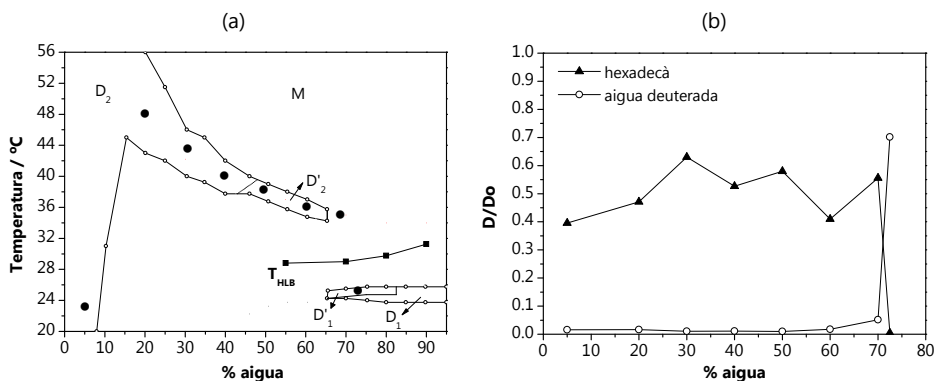


Figura 4.14. (a) Indicacions de les composicions de les microemulsions (●) caracteritzades per RMN en el corresponent diagrames de fases del sistema aigua/Brij30/hexadecà, Ros=0.67. (b) Coeficients de difusió relatius (D/D_o) de l'aigua (○) i de l'hexadecà (▲) de les microemulsions indicades en (a).

A concentracions d'aigua inferiors al 70% (Figura 4.14b) el coeficient de difusió relatiu per l'aigua és menor que per l'hexadecà, indicant així que la fase aquosa es troba confinada i que per tant l'estructura és del tipus W/O, contràriament al que succeeix a partir del 70% d'aigua, confirmant així la inversió de l'estructura del tipus W/O al tipus O/W. D'acord amb els perfils del coeficients de difusió sembla que l'estructura de microemulsió bicontínua es podria trobar en el rang 70-73% d'aigua.

A fi de caracteritzar l'estructura de la fase D'_1 es van determinar els coeficients de difusió per les mostres del sistema amb un contingut d'aigua del 73% i del 90% en funció de la temperatura. Els resultats es mostren a la Figura 4.15. Així mateix s'indiquen els resultats del comportament fàsic en el rang estudiat. A temperatures baixes el coeficient de difusió relatiu de l'aigua és major que el corresponent per l'oli el que confirma l'estructura del tipus O/W ja deduïda prèviament pels estudis de conductivitat. A més, no s'observa diferència en els coeficients de difusió entre la regió de microemulsió D_1 i la subregió D'_1 la qual presenta birefringència al moviment per la mostra amb un contingut d'aigua del

RESULTATS I DISCUSSIÓ

73%. Així, la birefringència al moviment no es podria atribuir a estructures de microemulsions bicontínues. Per la mostra amb un contingut d'aigua del 90% es van observar perfils similars dels coeficients de difusió relatius.

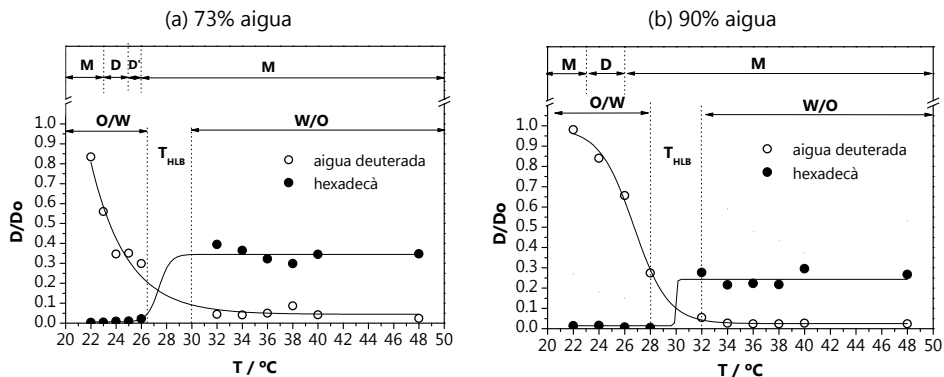


Figura 4.15. Coeficients de difusió relatius (D/D_0) de l'aigua (\circ), i de l'hexadecà (\bullet) del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, en funció de la temperatura, per a continguts d'aigua de (a) 73%, (b) 90%. (Els resultats del comportament fàsic en aquest interval de temperatures s'han representat a la part superior de les gràfiques).

Era previst que el coeficient de difusió relatiu de l'hexadecà a temperatures superiors als 30°C presentés valors més elevats, propers a 0.8-1, però com es pot observar a la Figura 4.15 es van obtenir valors molt baixos. Això podria ser degut a la inestabilitat de les mesures en aquest rang de temperatures. S'ha d'esmentar però que per tal de reduir al mínim aquest efecte abans de procedir a la mesura la mostra va ser extreta i agitada a cada temperatura. No obstant, el temps de realització de la mesura, no inferior a 20 minuts, no va permetre mitigar l'efecte.

A més, a partir dels coeficients de difusió relatius en funció de la temperatura es van poder determinar les temperatures d'inversió de fases, T_{HLB} , com la temperatura promig abans i després de que es produís el canvi bruscat dels coeficients de difusió de l'aigua i l'hexadecà.

A la Taula 4.7 s'indiquen els rangs així com el promig de les temperatures d'inversió de fases determinades per conductivitat i per espectroscopia de ressonància magnètica nuclear (DOSY 1H NMR). Els valors de T_{HLB} obtinguts per ambdues tècniques són similars.

Taula 4.7. Temperatures d'inversió de fases (T_{HLB}) determinades per conductivitat i DOSY 1H NMR pel sistema aigua/Brij30/hexadecà, Ros=0.67.

| | 73% aigua | | 90% aigua | |
|--|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | Conductivitat | DOSY 1H NMR | Conductivitat | DOSY 1H NMR |
| Rang de T_{HLB} (°C) | 27-33 | 27-30 | 27-35 | 28-32 |
| T_{HLB} promig (°C) | 30 | 28 | 31 | 30 |

Cal destacar que les mesures de conductivitat són més ràpides que les realitzades per la tècnica DOSY 1H NMR i a més permeten garantir la homogeneïtat de les mostres ja que és possible mantenir-les en agitació durant les mesures. Contràriament, en les mesures realitzades per la tècnica de RMN no és possible mantenir la mostra en agitació. Així mateix, el tractament de les dades obtingudes per aquesta darrera tècnica és més complexe en el tractament de les dades obtingudes per conductivitat. En conseqüència, la determinació de la temperatura d'inversió de fases T_{HLB} per mesures de conductivitat és més eficient que la determinació per la tècnica DOSY 1H NMR.

Els resultats obtinguts permeten concloure que per la tècnica de RMN no es detecten diferències entre les fases D_1 i D'_1 del sistema aigua/Brij30/hexadecà, per a la relació olitensioactiu Ros 0.67.

4.2.3.3. Determinació de la mida de gota de les microemulsions per dispersió dinàmica de la llum làser (DLS)

Per tal de determinar la mida de gota de les microemulsions del tipus O/W, de les regions D_1 i D'_1 del sistema aigua/Brij30/hexadecà, es van efectuar mesures per dispersió dinàmica de llum làser (DLS) d'acord amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.12 de la part experimental. Aquesta tècnica proporciona la mida de gota en termes de radi hidrodinàmic (Rh). Primer, es va comprovar que la mesura del radi hidrodinàmic era independent de l'angle de dispersió θ . D'acord amb el procediment descrit a l'apartat 3.3.12 es va determinar la mida de gota de totes les microemulsions estudiades als angles de dispersió θ de 45°, 60°, 90° i 120°. La Figura 4.16 mostra com a exemple els resultats d'una determinació per a cada una de les regions D_1 i D'_1 . El radi hidrodinàmic Rh determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" és manté constant amb l'angle per les microemulsions D_1 (fase líquida isòtropa) i D'_1 (fase líquida amb birrefringència al moviment).

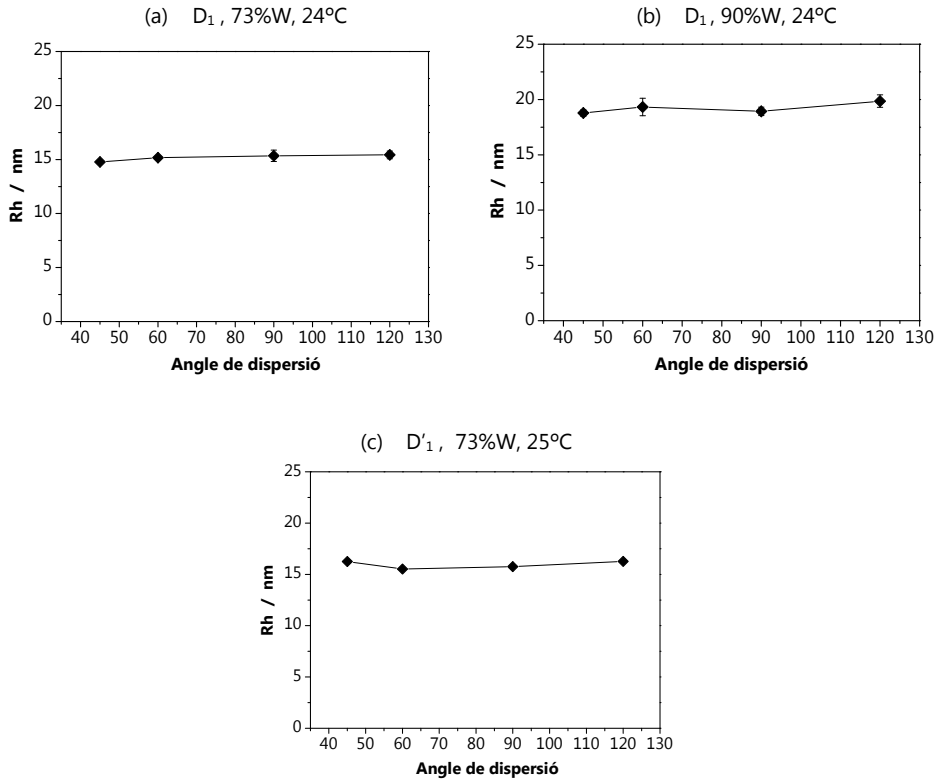


Figura 4.16. Radi hidrodinàmic (Rh) en funció de l'angle de dispersió de les microemulsions (a) D_1 , 73%W, 24°C, (b) D_1 , 90%W, 24°C, (c) D'_1 , 73%W, 25°C, del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$. (D_1 : regió monofàsica, D'_1 : regió monofàsica amb birrefringència al moviment). (La línia és una ajuda visual).

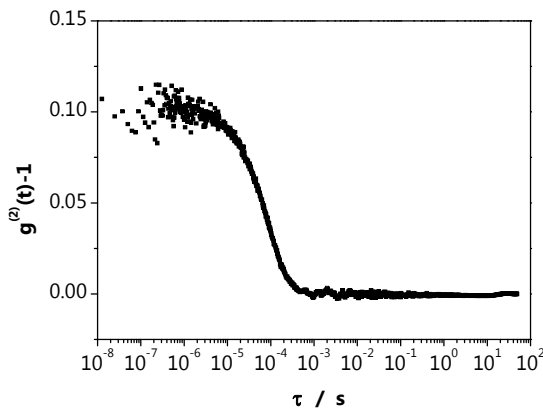


Figura 4.17. Funció d'autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ en funció del temps de residència "lag time" τ obtinguda per DLS a l'angle de dispersió θ de 60° per a la mostra de micromemulsió D_1 .

Per tal d'obtenir el radi hidrodinàmic R_h es va analitzar la funció d'autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ (Figura 4.17) mitjançant els mètodes d'anàlisi "Multi-angle" i "Cumulants", descrits a l'apartat 3.3.12.

A la Figura 4.18 es mostra com a exemple l'ajust realitzat de la funció d'autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ representat en la Figura 4.17 segons el mètode "Multi-angle" per tal d'obtenir el valor de la velocitat de caiguda "decay rate" Γ (Figura 4.19).

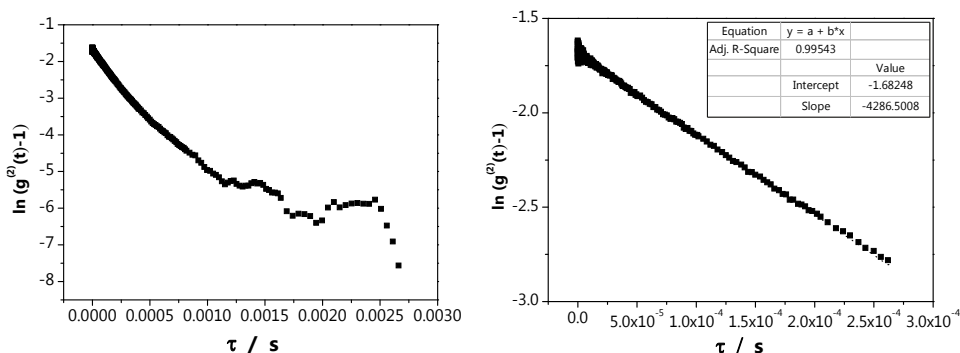


Figura 4.18. Exemple de l'anàlisi Multi-angle DLS realitzat per a la mostra de microemulsió D_1 a l'angle de 60° ; (a) Logaritme de la funció d'autocorrelació en funció del "delay time" τ , (b) Ajust realitzat per tal d'obtenir la velocitat de caiguda "decay rate" Γ .

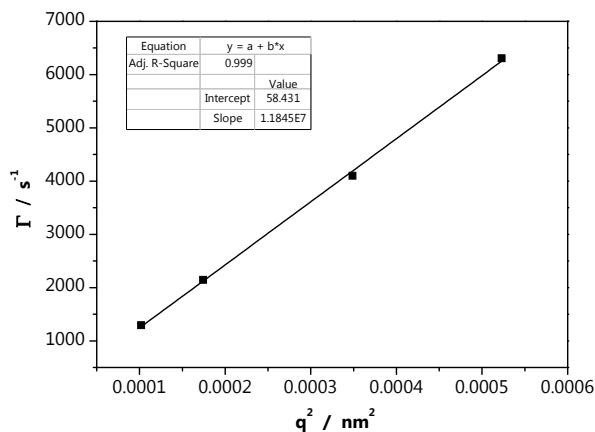


Figura 4.19. Representació de la velocitat de caiguda (decay rate) Γ en funció de q^2 . La línia contínua senyala l'ajust realitzat a fi d'obtenir el coeficient de difusió D .

La Taula 4.8 mostra els coeficients de difusió i els radis hidrodinàmics de diferents microemulsions determinats pels mètodes d'anàlisi "Multi-angle" i de "Cumulants". Com era previst els valors de radi hidrodinàmic són similars per ambdós mètodes d'anàlisi.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.8. Coeficient de difusió (D) i radi hidrodinàmic (Rh) determinat pel mètode d'anàlisi "Multi-angle" i de "Cumulants" de diferents microemulsions.

| Microemulsió | Multi-angle | | Cumulants | |
|------------------------------|------------------------|---------|-------------|------|
| | D (cm ² /s) | Rh (nm) | Rh (nm) | PDI |
| D ₁ , 73%W, 24°C | 1.5·10 ⁻⁷ | 14.9 | 15.3 ± 0.53 | 0.34 |
| D' ₁ , 73%W, 25°C | 1.3·10 ⁻⁷ | 15.9 | 15.8 ± 0.09 | 0.40 |
| D ₁ , 90%W, 24°C | 1.2·10 ⁻⁷ | 17.6 | 18.9 ± 0.40 | 0.17 |

La Figura 4.20 mostra l'evolució de la mida de gota en funció del temps de la fase de microemulsió D₁. El radi hidrodinàmic es manté invariable com a mínim 60 dies (temps d'estudi), confirmant així l'estabilitat de la fase de microemulsió.

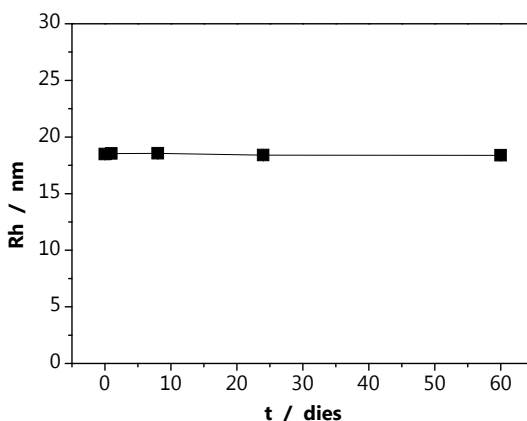


Figura 4.20. Radi hidrodinàmic (Rh) en funció del temps per a una composició del sistema aigua/Brij30/hexadecà amb Ros=0.67, 90% d'aigua, T=24°C, (D₁).

En conclusió, les determinacions realitzades per dispersió dinàmica de llum làser (DLS) de les fases inicials de microemulsió D₁ i D'₁ del sistema aigua/Brij30/hexadecà indiquen que no hi haurien diferències en quant a la mida de gota entre ambdues fases.

4.2.3.4. Determinació de la forma de les gotes de les microemulsions per dispersió estàtica de la llum làser (SLS)

Amb la finalitat de determinar la forma de les gotes de les microemulsions del tipus O/W, de les regions D₁ i D'₁. Es van realitzar mesures d'intensitat de llum dispersada a diferents angles 35-135° (SLS) d'acord amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.12.

A partir de la representació de la intensitat de llum dispersada en funció del vector de dispersió mostrat a la Figura 4.21 s'observa com les dades experimentals (símbols)

s'ajusten a geometria esfèrica en totes les composicions caracteritzades, establint així que no hi hauria diferència de forma de les gotes entre estructures inicials D_1 (fase líquida isotropa) i D'_1 (fase líquida amb birrefringència al moviment).

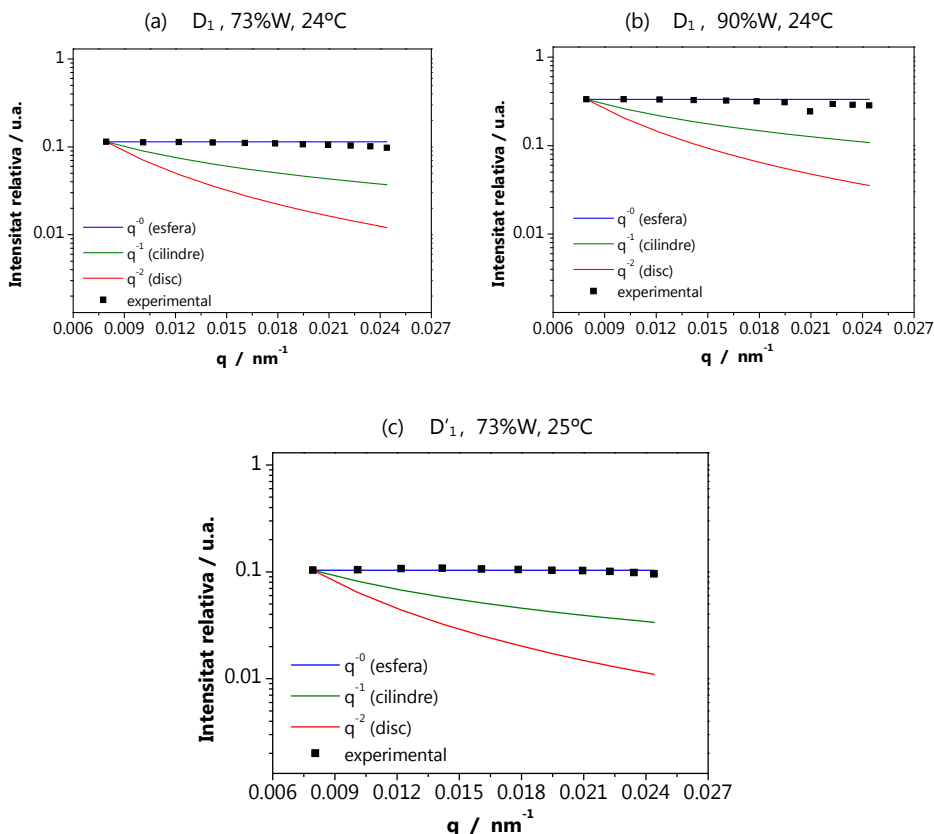


Figura 4.21. Intensitat relativa de llum dispersada en funció del vector de dispersió (q) de microemulsions (a) D_1 , 72%W, 24°C (b) D_1 , 90%W, 24°C, (c) D'_1 , 73%W, 25°C. Els símbols (■) representen les dades experimentals.

A partir de la determinació de la forma geomètrica mitjançant les mesures de dispersió estàtica de llum làser (SLS) es van poder estimar el radi de gir (R_g) i el radi promig de les gotes (R). A la Taula 4.9 es mostren els valors estimats. A efectes comparatius es mostra també el radi hidrodinàmic (R_h) determinat per dispersió dinàmica de llum làser (DLS) pel mètode d'anàlisi del "Cumulants", ja que correspon a la mida de gota assumint geometria esfèrica i distribució monomodal de les partícules.

Era d'esperar que el radi hidrodinàmic R_h fós més gran que el radi de la gota R ja que proporciona informació del radi més la capa d'aigua solvatada que acompanya la gota, però, com es pot observar a la Taula 4.9, en les tres mostres analitzades no és així.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.9. Valors de radi de gota (R), radi hidrodinàmic (Rh) i radi de gir (Rg) de microemulsions de la regió D₁ i D'₁, i de les corresponents dilucions.

| Microemulsió | Aigua | Rh (nm) | Rg (nm) | R (nm) |
|-----------------|-------|---------|---------|--------|
| D ₁ | 73% | 15.2 | 18.2 | 23.2 |
| | 90% | 18.8 | 31.0 | 40.0 |
| D' ₁ | 73% | 15.9 | 33.7 | 33.7 |

Aquest fet es podria atribuir a la dinamicitat de la fase de microemulsió en el que les gotes es mouen molt ràpidament, agregant-se i desagregant-se, situació que faria difícil la determinació de la mida de gota per DLS.

*Per tant, els resultats obtinguts per dispersió dinàmica i estàtica de llum làser permeten conclure que no hi hauria diferència en la forma ni en la mida de les gotes de les microemulsions de les fases **D₁** i **D'₁** del sistema aigua/Brij30/hexadecà.*

4.3. Formació de nano-emulsions per addició d'un segon tensioactiu a microemulsions O/W i caracterització per dispersió de llum

Tot i que en el sistema aigua/Brij30/hexadecà es formen zones de microemulsió properes a la corba de T_{HLB} (veure Figura 4.3e) l'estudi del comportament fàsic i la caracterització de les fases de microemulsió (apartat 4.2) va posar de manifest la presència de microemulsions O/W en el interval de concentracions de 65-95% d'aigua fent així inviable la preparació de nano-emulsions O/W a partir de microemulsions O/W per addició d'aigua. Per aquesta raó en aquest sistema es va considerar la següent estratègia: l'addició d'un altre component al sistema que induís un canvi de la curvatura del film interfacial de tensioactiu que forma les gotes de microemulsió de manera que es produís una desestabilització del sistema i en conseqüència la formació de nano-emulsions. Per tal de produir el canvi del film interfacial es va seleccionar un tensioactiu més hidròfil que el del sistema seleccionat.

En aquest apartat es mostren els resultats obtinguts en l'estudi de la preparació de nano-emulsions O/W per addició d'un segon tensioactiu (S2) a microemulsions de tipus O/W del sistema aigua/Brij30 (S1)/hexadecà segons el mètode descrit en l'apartat 3.3.3.2 de la part experimental.

4.3.1. Selecció dels tensioactius

El tensioactiu (S1), Brij 30, presenta un N_{HLB} de 9-10, per tant, amb la finalitat d'afavorir la formació d'estructures de tipus oli-en-aigua O/W, es van seleccionar tensioactius (S2) amb un N_{HLB} superior. D'aquesta manera el sistema presentaria un comportament principalment hidròfil que propiciaria la formació d'estructures de fase externa aquosa. La Taula 4.10 mostra els tensioactius no iònics etoxilats utilitzats que presenten diferent longitud de la cadena hidrocarbonada així com diferent nombre d'unitats d'òxids d'etilè, amb valors de N_{HLB} en el rang de 11-13. Així mateix també es va utilitzar un tensioactiu iònic (SDS) amb un valor de N_{HLB} de 40.

Taula 4.10. Tensioactius (S2) utilitzats en la preparació de nano-emulsions O/W a partir de microemulsions O/W al sistema aigua/Brij30(S1)/hexadecà, per addició d'un segon tensioactiu S2.

| | Tensioactiu | Fòrmula | N_{HLB} |
|----|-------------------|----------------------------|-----------|
| S1 | Brij 30 | $\bar{C}_{12}\bar{E}_4$ | 9-10 |
| | C12E5 | $C_{12}E_5$ | 11.3 |
| S2 | Brij 97 | $\bar{C}_{18}\bar{E}_{10}$ | 12.4 |
| | Synperonic 13/6.5 | $\bar{C}_{13}\bar{E}_7$ | 12.5 |
| | Synperonic 91/6 | $\bar{C}_{9-11}\bar{E}_6$ | 13 |
| | CremophorEL | | 13 |
| | SDS | $C_{12}H_{25}O_4S.Na$ | 40 |

4.3.2. Formació de nano-emulsions a partir de microemulsions amb una $Ros=0.67$

L'addició d'un segon tensioactiu, S2, es va assajar en una microemulsió O/W de la regió **D₁** del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, 85% aigua, a 24°C. La composició s'ha marcat amb el símbol (x) en el diagrama de fases de la Figura 4.5 presentada anteriorment en el apartat 4.2.2. Durant l'addició es va mantenir la mostra en agitació per tal d'accelerar la cinètica del procés i afavorir així la formació de l'emulsió. L'aspecte visual de les mostres obtingudes era la d'un líquid transparent-translúcid. Es va confirmar que eren nano-emulsions (i no microemulsions) ja que al preparar les mostres addicionant tots els components alhora es va obtenir una dispersió tèrbola-lletosa.

En l'addició del tensioactiu Brij97 va ser necessària una major agitació de la mostra per tal d'obtenir una nano-emulsió. Aquest fet podria ser degut a l'elevada viscositat que aquest presenta a la temperatura de 24°C en comparació amb la resta de tensioactius assajats i que podria ser atribuïble al major nombre, n , d'unitats d'òxids d'etilè que presenta, $n=10$, en relació a la resta de tensioactius no iònics etoxilats utilitzats que presenten un nombre d'unitats d'òxids d'etilè inferior a 7.

La quantitat mínima del tensioactiu S2 addicionada a la microemulsió per obtenir les nano-emulsions (Figura 4.22) és com a màxim d'un 1% respecte el total de component tensioactiu present a la nano-emulsió obtinguda, a excepció del C₁₂E₅ que és del 3%. De tots els tensioactius assajats, el C₁₂E₅ és el menys eficient ja que es requereix una major concentració per obtenir nano-emulsions. Contràriament, el Cremophor EL, és el més eficient ja que és el que es necessita menys nombre de molècules per obtenir la nano-emulsió (Figura 4.23, Taula 4.11).

Com era previst al addicionar el tensioactiu varia lleugerament la composició inicial. A la Taula 4.12 es mostra la composició de la microemulsió inicial i les de les nano-emulsions obtingudes: A partir d'una microemulsió O/W amb un 85% d'aigua s'han formulat nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua del 82-84% per addició d'un segon tensioactiu.

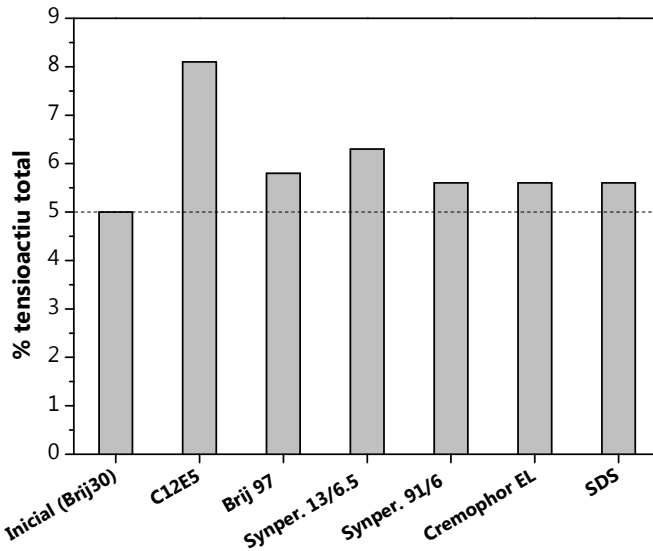
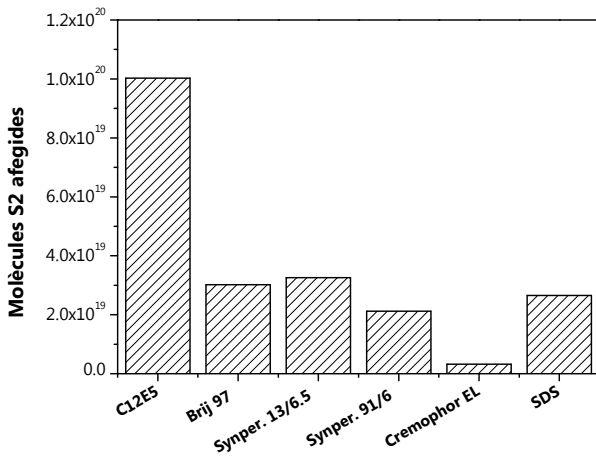


Figura 4.22. Concentració de tensioactiu total en la fase inicial (Brij30) de microemulsió per una **Ros=0.67** i en les nano-emulsions obtingudes. S'ha representat amb una línia horitzontal discontinua la quantitat de tensioactiu inicial present en el sistema.



Taula 4.11 Núm. de molècules de tensioactiu S2 afegides en l'obtenció de nano-emulsions.

| S2 | Molècules |
|-------------------|---------------------|
| C12E5 | $1.0 \cdot 10^{20}$ |
| Brij 97 | $3.0 \cdot 10^{19}$ |
| Synperonic 13/6.5 | $3.3 \cdot 10^{19}$ |
| Synperonic 91/6 | $2.1 \cdot 10^{19}$ |
| Cremophor EL | $3.2 \cdot 10^{18}$ |
| SDS | $2.7 \cdot 10^{19}$ |

Figura 4.23. Número de molècules de tensioactiu S2 incorporades a la fase de inicial de microemulsió O/W per obtenir nano-emulsions O/W en el sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà.

Taula 4.12. Composicions de la fase inicial de microemulsió de la regió D₁ del sistema aigua/Brij30/hexadecà, **Ros=0.67**, i de les nano-emulsions finals per a cada un dels tensioactius assajats.

| Sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | |
|---|--------------------------------|-----------|------------|
| Formulació | S2 | %W | Ros |
| microemulsió | - | 85.0 | 0.67 |
| nano-emulsió | C ₁₂ E ₅ | 82.3 | 0.55 |
| | Brij97 | 84.2 | 0.63 |
| | Synperonic 13/6.5 | 83.8 | 0.61 |
| | Synperonic 91/6 | 84.3 | 0.64 |
| | CremophorEL | 84.4 | 0.64 |
| | SDS | 84.4 | 0.64 |

4.3.2.1. Caracterització de les microemulsions i nano-emulsions per dispersió dinàmica de la llum làser

Una vegada obtingudes les nano-emulsions es va caracteritzar la mida de gota mitjançant dispersió dinàmica de llum làser (DLS) als angles de dispersió θ de 45°, 60°, 90°, 105° i 120°, d’acord amb el procediment descrit a l’apartat 3.3.12. de la part experimental. La Figura 4.24 mostra un exemple de la funció d’autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ obtinguda d’una mesura de la microemulsió inicial a un angle de dispersió θ determinat.

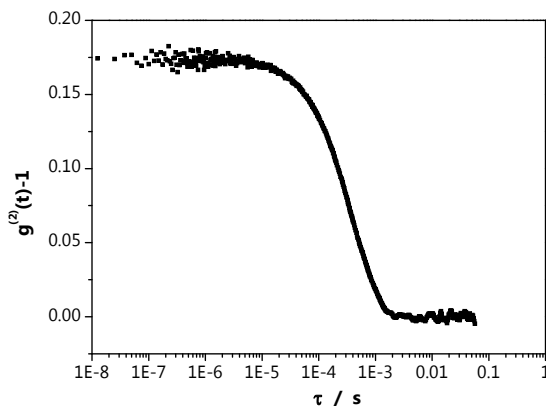


Figura 4.24. Funció d’autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ en funció del temps de residència “lag time” τ obtinguda per DLS a l’angle de dispersió θ de 45° per a la mostra inicial de micromemulsió, T=24°C.

Per tal d’obtenir el radi hidrodinàmic R_h es va analitzar la funció d’autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ mitjançant els mètodes d’anàlisi “Multi-angle” i de “Cumulants”, descrits a l’apartat 1.2.2.1 de la Introducció.

La Figura 4.25 mostra com exemple l'ajust realitzat de la funció d'autocorrelació de la llum dispersada $g^{(2)}(\tau)$ representat a la Figura 4.24 segons el mètode "Multi-angle" per tal d'obtenir el valor de la velocitat de caiguda "decay rate" Γ .

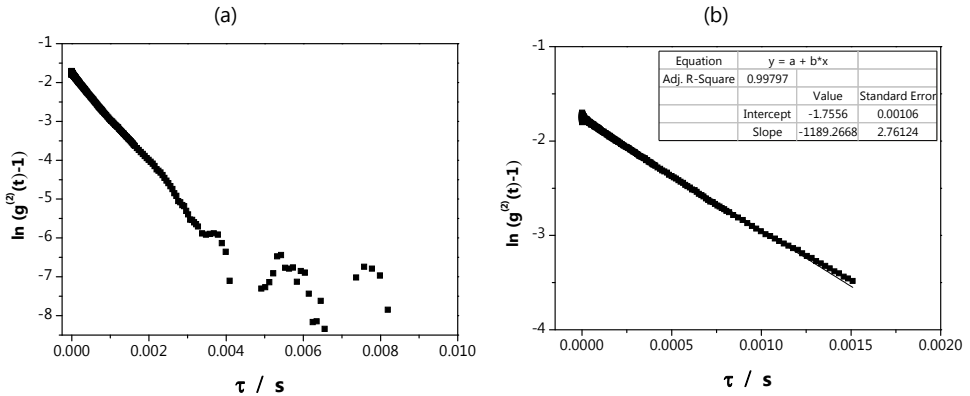


Figura 4.25. Exemple de l'anàlisi Multi-angle DLS realitzat per la mostra de microemulsió inicial ($Ros=0.67$) a l'angle de dispersió θ de 45° ; (a) Logaritme de la funció d'autocorrelació en funció del temps de residència "lag time" τ , (b) Ajust realitzat segons l'Equació 1.17 de la Introducció per tal d'obtenir la velocitat de caiguda "decay rate" Γ .

La representació de la velocitat de caiguda "decay rate" Γ , obtinguda de l'anàlisi de la funció $g^{(2)}(\tau)$ per a cada angle de mesura, en funció del vector de llum de dispersió al quadrat q^2 mostra una relació lineal entre ambdós, el pendent del qual proporciona una estimació del coeficient de difusió D , (Figura 4.26) i (Taula 4.13).

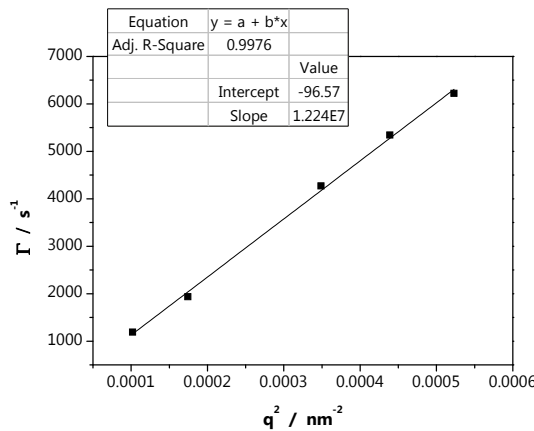


Figura 4.26. Representació de la velocitat de caiguda "decay rate" Γ en funció de q^2 . La línia contínua senyala l'ajust realitzat segons l'Equació 1.18 a fi d'obtenir el coeficient de difusió D de la gota en l'estructura inicial de microemulsió.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Es va seguir el mateix procediment per les nano-emulsions obtingudes i tal com s'indica a la Taula 4.13 presenten coeficients de difusió del mateix ordre que la fase de microemulsió inicial.

Taula 4.13. Coeficients de difusió (D) obtinguts de l'anàlisi de dades mitjançant el mètode "Multi-angle" de la microemulsió O/W del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, $T=24^{\circ}C$, i de les nano-emulsions finals obtingudes al addicionar S2 a la microemulsió.

| Sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------------|
| Formulació | S2 | D (cm ² /s) |
| microemulsió | - | $1.2 \cdot 10^{-7}$ |
| nano-emulsió | C ₁₂ E ₅ | $1.9 \cdot 10^{-7}$ |
| | Brij97 | $1.5 \cdot 10^{-7}$ |
| | Synperonic 13/6.5 | $1.5 \cdot 10^{-7}$ |
| | Synperonic 91/6 | $9.7 \cdot 10^{-8}$ |
| | CremophorEL | $1.3 \cdot 10^{-7}$ |
| | SDS | $9.1 \cdot 10^{-8}$ |

A partir del coeficient de difusió i considerant gotes amb geometria esfèrica es va obtenir el radi hidrodinàmic R_h aplicant l'equació d'Stokes-Einstein (Equació 1.21) pel mètode "Multi-angle". Els radis hidrodinàmics R_h pel mètode de "Cumulants" a un angle de dispersió θ de 90° es van obtenir de manera automàtica mitjançant el software de l'equip.

La Figura 4.27a mostra els valors de radi hidrodinàmic determinats pels mètodes d'anàlisi de "Cumulants" i "Multi-angle" de la microemulsió i de les nano-emulsions obtingudes a temps zero. Així mateix també es mostren els valors de radi hidrodinàmic determinats en funció del temps (Figura 4.27b, c, d, e) dels quals es farà referència a l'apartat 4.3.2.2. Com era d'esperar els valors són similars per ambdós mètodes en totes les mostres caracteritzades, confirmant així que la mida de gota és independent de l'angle de mesura i que no hi ha interacció entre les gotes.

Es va continuar l'anàlisi de les dades mitjançant el mètode de "Cumulants" ja que a més del radi hidrodinàmic proporciona també informació de la polidispersitat de la mostra. A la Taula 4.14 i Figura 4.28 es mostra el radi hidrodinàmic (R_h) (Figura 4.28a) i els índexs de polidispersitat (PDI) (Figura 4.28b). El R_h de les nano-emulsions obtingudes varia en funció del tensioactiu S2. La mida de gota més petita s'obté pel tensioactiu C₁₂E₅, que és el que requereix una major concentració de tensioactiu per formar la nano-emulsió. Contràriament, amb el tensioactiu iònic SDS s'obté la mida de gota més gran. Per la resta de tensioactius S2 assajats, en general, les mides de gota de les nano-emulsions obtingudes exhibeixen valors propers al de la fase inicial de microemulsió.

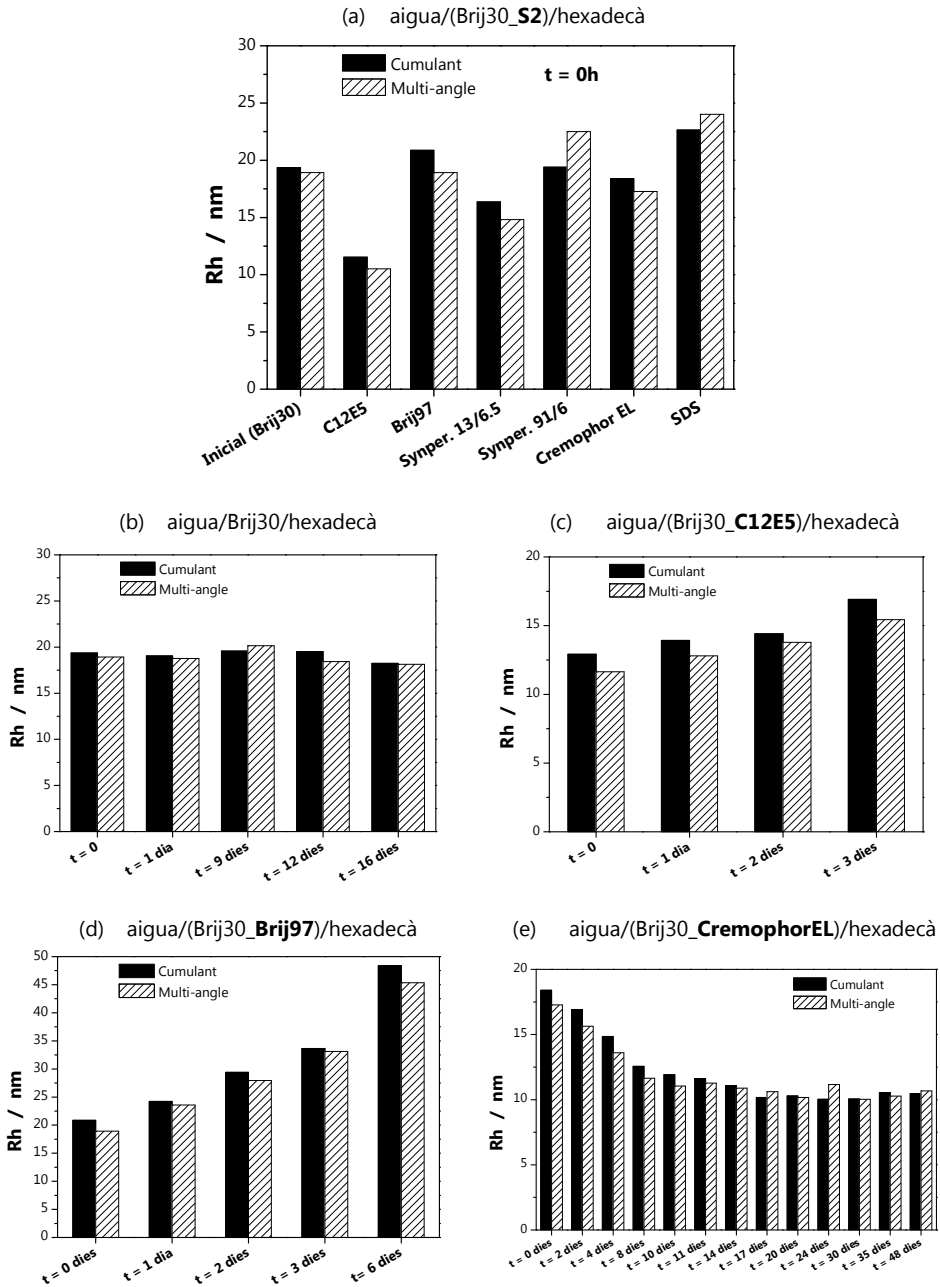


Figura 4.27. Comparació de radis hidrodinàmics, R_h , determinats pels mètodes d'anàlisi de "Cumulants" i "Multiangle" a l'angle de dispersió θ de 90° , de la microemulsió O/W inicial (a) del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $Ros=0.67$, i de les nano-emulsions obtingudes per addició d'un tensioactiu S2: ((a, c) C12E5, (a, d) Brij97, (a) (Synperonic 13/6.5, (a) Synperonic 91/6, (a, e) CremophorEL, (a) SDS), a $T=24^\circ C$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.14. Radi hidrodinàmic (Rh) i Índex de polidispersitat (PDI) obtinguts mitjançant la tècnica de DLS i el mètode d'anàlisi de "Cumulants", de l'estructura inicial de microemulsió O/W i de l'estructura final de les nano-emulsions O/W del sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà, a T=24°C.

| Sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------|------|
| Formulació | S2 | Rh (nm) | PDI |
| microemulsió | - | 19.37 ± 0.51 | 0.33 |
| nano-emulsió | C ₁₂ E ₅ | 11.53 ± 0.24 | 0.18 |
| | Brij97 | 20.87 ± 0.59 | 0.16 |
| | Synperonic 13/6.5 | 16.36 ± 0.58 | 0.23 |
| | Synperonic 91/6 | 19.40 ± 1.10 | 0.23 |
| | CremophorEL | 18.39 ± 0.55 | 0.22 |
| | SDS | 22.64 ± 0.49 | 0.62 |

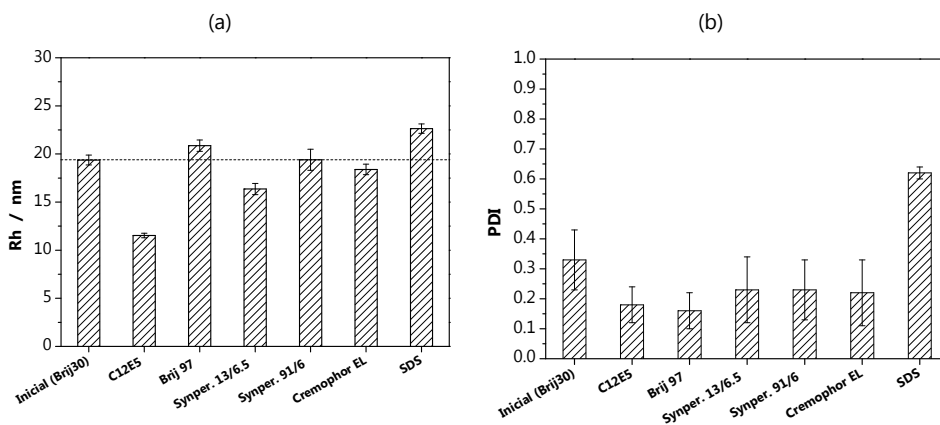


Figura 4.28. (a) Radi hidrodinàmic (Rh), i, (b) Índex de polidispersitat (PDI) obtinguts mitjançant la tècnica de DLS a l'angle de dispersió θ de 90° i pel mètode d'anàlisi de "Cumulants", de la microemulsió O/W del sistema aigua/Brij30/hexadecà, **Ros=0.67**, i de les nano-emulsions obtingudes per addició d'un tensioactiu S2 (C₁₂E₅, Brij97, Synperonic 13/6.5, Synperonic 91/6, CremophorEL, SDS), a T=24°C. (La línia horitzontal discontinua és una guia visual).

Respecte als índexs de polidispersitat, PDI, (Taula 4.14, Figura 4.28b) excepte pel SDS els valors d'aquests són inferiors a 0.25, el que indicaria que les mides de gota presenten una distribució monomodal i que en conseqüència es poden considerar nano-emulsions amb una baixa polidispersitat. S'ha de destacar que l'addició de SDS es va fer en estat sòlid ja que es presenta en aquesta forma a la temperatura de treball (24°C). Amb la finalitat de reduir la polidispersitat de la nano-emulsió es va preparar una solució de SDS en aigua i es va assajar l'addició de la solució a la fase de microemulsió. No obstant, no es va aconseguir reduir el valor de polidispersitat (resultat no mostrat). Així mateix el perfil de distribució de mides de gota obtingut per la nano-emulsió amb el SDS mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN (Figura 4.29) va evidenciar la presència de diverses poblacions

pròximes entre elles, una de les quals amb una amplada de pic considerable, fet que justificaria els valors elevats dels índexs de polidispersitat obtinguts mitjançant l'anàlisi de "Cumulants".

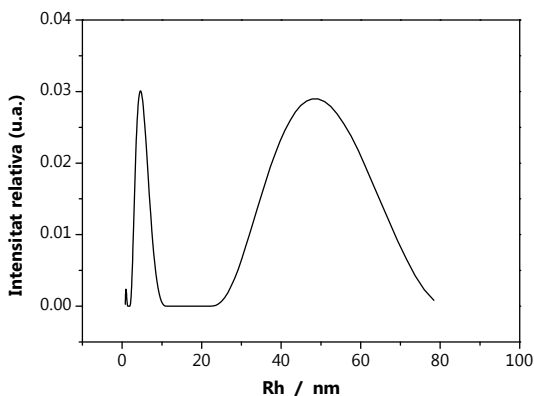
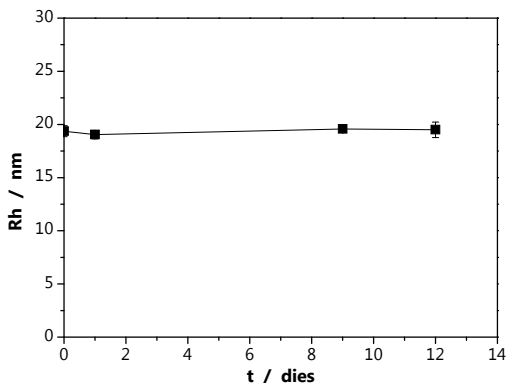


Figura 4.29. Perfil de distribució de mides de gota mitjançant l'anàlisi CONTIN a l'angle de dispersió θ de 90° de la nano-emulsió obtinguda pel sistema aigua/(Brij30_SDS)/hexadecà, $T=24^\circ\text{C}$.

4.3.2.2. Evolució de la mida de gota

Així mateix es va avaluar la variació de la mida de gota amb el temps. El radi hidrodinàmic (Figura 4.27, Figura 4.30 i Taula 4.15) i el índex de polidispersitat de la fase de microemulsió es mantenen constant amb el temps estudiat (12 dies) confirmant que era una microemulsió. No obstant, els valors dels índexs de polidispersitat (PDI) són, com ja s'ha mencionat a l'inici d'aquest apartat, superiors als valors de PDI que presenten les fases finals de nano-emulsió. S'ha de mencionar que les mesures per DLS de les fases finals de nano-emulsió van ser realitzades amb dilució amb aigua per tal d'evitar que la concentració de partícules fos massa gran i en conseqüència l'efecte de la interacció de les gotes i obtenir així una bona estimació del radi hidrodinàmic. En canvi, les fases inicials de microemulsió van ser mesurades sense dilució per tal de preservar la fase de microemulsió, ja que un canvi de composició per dilució amb aigua podria desestabilitzar-la. Tot i així, els valors de PDI es mantenen constants amb el temps (Taula 4.15).



Taula 4.15. Valors de R_h (valor promig \pm desviació estàndard) i PDI en funció del temps de la Figura 4.30.

| t (dies) | Rh (nm) | PDI |
|-----------------|-----------------|------------|
| 0 | 19.4 \pm 0.51 | 0.33 |
| 1 | 19.0 \pm 0.40 | 0.37 |
| 9 | 19.6 \pm 0.15 | 0.41 |
| 12 | 19.5 \pm 0.72 | 0.37 |

Figura 4.30. Variació de la mida de gota, R_h (valor promig \pm desviació estàndard) en funció del temps determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" a l'angle de dispersió θ de 90° de la fase inicial de microemulsió pel sistema **aigua/Brij30/hexadecà**, **Ros=0.67**, 85% aigua, $T=24^\circ\text{C}$.

La Figura 4.31a mostra dos tipus de perfils de distribució de mides de gota a $t=0$ i $t=1$ dia amb el temps per la fase inicial de microemulsió obtinguts de dues mesures realitzades mitjançant l'anàlisi CONTIN. S'observa una població de mides centrada a un radi hidrodinàmic de 20nm que estaria en concordança amb els valors obtinguts de l'anàlisi "Multi-angle" i de "Cumulants". No obstant, en alguna de les rèpliques s'observa també una segona població amb valors de radis hidrodinàmics superiors a 100nm, fet que podria justificar l'elevat índex de polidispersitat (PDI) obtingut de l'anàlisi de "Cumulants". Així mateix, la presència de distribucions de mida de gota bimodal pot ser indicatiu d'agregació de les gotes (**Aubery, 2011**). Els dos tipus de perfils de distribució de mides determinats a $t=0$ es detecten també a $t=1$ dia (Figura 4.31b).

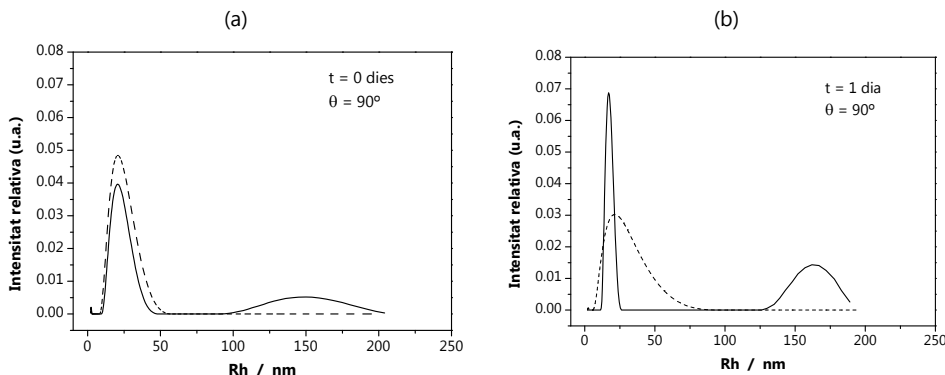


Figura 4.31. Perfils de distribució de mides de la fase inicial de microemulsió del sistema **aigua/Brij30/hexadecà**, **Ros=0.67**, $T=24^\circ\text{C}$, obtinguts mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN a partir de mesures per la tècnica de DLS a l'angle de dispersió θ de 90° a (a) $t=0$ dies, i (b) $t=1$ dia. Els perfils de línia discontinua són replicats.

El mateix perfil de distribució de mides de gota s'observa a angles inferiors i superiors a 90° i en l'evolució amb el temps (Figura 4.32).

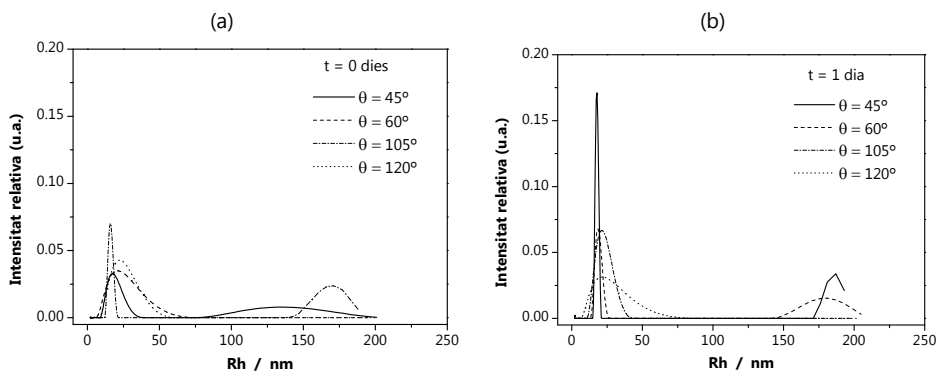


Figura 4.32. Perfils de distribució de mides de la fase inicial de microemulsió del sistema aigua/Brij30/hexadecà, $\mathbf{Ros=0.67}$ i $T=24^\circ\text{C}$, obtinguts mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN a partir de mesures per la tècnica de DLS a l'angle de dispersió θ de 45° , 60° , 105° i 120° , (a) $t=0$ dies, i (b) $t=1$ dia.

El radi hidrodinàmic de les nano-emulsions obtingudes amb l'addició dels tensioactius **Synperonic 13/6.5** i **Synperonic 91/6** (Figura 4.33, Taula 4.16) varia poc durant les primeres 6h, no obstant, transcorregudes 20h es va observar visualment cremat a la mostra i a més la mida de gota ja no era mesurable per DLS.

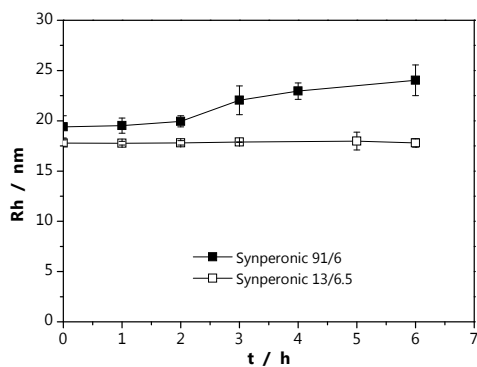


Figura 4.33. Variació de la mida de gota, Rh, (valor promig \pm desviació estàndard) en funció del temps, determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" a l'angle de dispersió θ de 90° de les nano-emulsions obtingudes pels sistemes aigua/(Brij30_ **Synperonic 13/6.5**)/hexadecà, i aigua/(Brij30_ **Synperonic 91/6**)/hexadecà, a $T=24^\circ\text{C}$.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.16. Valors de Radi hidrodinàmic (valor promig \pm desviació estàndard) i Índex de polidispersitat (PDI) en funció del temps determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" a l'angle de dispersió θ de 90° de les nano-emulsions obtingudes a T=24°C per addició del tensioactiu S2 (Synperonic 13/6.5 i Synperonic 91/6) a la microemulsió del sistema aigua/Brij30_S2/hexadecà.

| t (hores) | aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | |
|-----------|----------------------------|------|-----------------|------|
| | Synperonic 13/6.5 | | Synperonic 91/6 | |
| | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI |
| 0 | 17.8 \pm 0.31 | 0.20 | 19.4 \pm 1.10 | 0.21 |
| 1 | 17.8 \pm 0.19 | 0.13 | 19.5 \pm 0.76 | 0.21 |
| 2 | 17.8 \pm 0.23 | 0.19 | 20.0 \pm 0.56 | 0.28 |
| 3 | 17.9 \pm 0.03 | 0.17 | 22.0 \pm 1.43 | 0.31 |
| 5 | 18.0 \pm 0.89 | 0.34 | 23.0 \pm 0.82 | 0.22 |
| 6 | 17.8 \pm 0.42 | 0.26 | 24.0 \pm 1.53 | 0.40 |

En el perfil de distribució de mides obtinguts amb el mètode d'anàlisi CONTIN (Figura 4.34) s'observa una població de gotes de mides al voltant de 20nm (Rh) i una segona població de gotes amb radis hidrodinàmics superiors als 100nm. Aquesta segona població de mides de gota superiors es va fent més gran amb el temps i es va desplaçant cap a valors de radi superiors, però al cap de 6h ja no s'observa aquesta segona població ja que la mida està fora del límit de detecció de l'aparell. Aquest efecte suggereix que la desestabilització de les nano-emulsions podria ser deguda a l'efecte de la maduració d'Ostwald en el que la mida de les gotes petites van disminuint amb el temps i la mida de les gotes grans va augmentant.

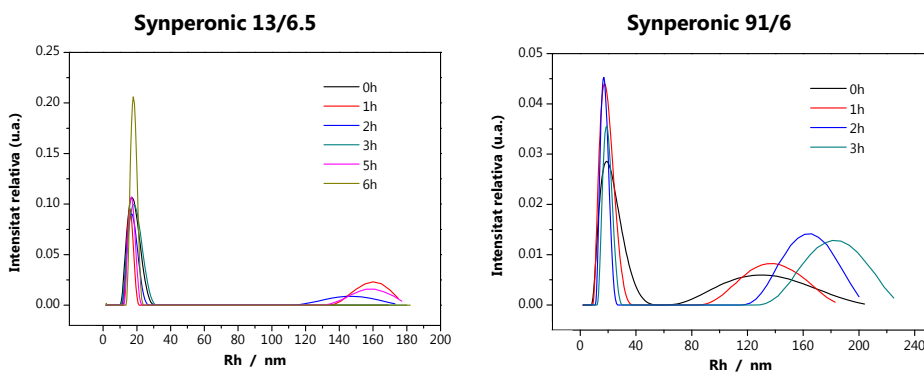


Figura 4.34. Perfil de distribució de mides de gota en funció del temps a l'angle de dispersió θ de 90° determinat pel mètode d'anàlisi CONTIN de les nano-emulsions obtingudes a T=24°C per addició de tensioactiu S2 (Synperonic 13/6.5 i Synperonic 91/6) al sistema aigua/Brij30/hexadecà.

Els índexs de polidispersitat (PDI) en funció del temps determinats pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" (Taula 4.16) de la nano-emulsió obtinguda pel sistema aigua/(Brij30_Synperonic 91/6)/hexadecà presenten valors en el rang 0.2-0.3. A les 6h s'observa un augment del PDI possiblement com a conseqüència de l'augment de la

inestabilitat de la mostra. Això estaria d'acord amb els resultats mostrats prèviament de l'anàlisi CONTIN.

Les nano-emulsions obtingudes amb els sistemes aigua/(Brij30_**CremophorEL**)/hexadecà, aigua/(Brij30_**C12E5**)/hexadecà i aigua/(Brij30_**Brij97**)/hexadecà (Figura 4.35) van ser mesurables per la tècnica DLS durant un període de temps superior a 24h, contràriament al descrit prèviament amb els dos sistemes anteriors, aigua/(Brij30_**Synperonic 13/6.5**)/hexadecà i aigua/(Brij30_**Synperonic 91/6**)/hexadecà (Figura 4.33).

La mida de gota de les nano-emulsions obtingudes per addició de C₁₂E₅ i Brij97 a la fase de microemulsió augmenta amb el temps (Figura 4.35a,b) (Taula 4.17). Això es podria atribuir a una desestabilització de les nano-emulsions per maduració d'Ostwald. Contràriament, la mida de gota de les nano-emulsions obtingudes per addició del CremophorEL (Figura 4.35c, Taula 4.17) a la fase de microemulsió disminueix amb el temps de 18 a 10nm fins a assolir un valor pràcticament constant a partir dels 15 dies que es manté com a mínim fins gairebé 80 dies. Això podria ser degut a un efecte cinètic del procés d'emulsificació. És a dir, l'emulsificació es produiria de manera més lenta amb el CremophorEL que amb la resta de tensioactius assajats. A més, el radi hidrodinàmic que s'obté (≈ 10 nm) és el més petit obtingut de les nano-emulsions preparades per dilucions de microemulsions per addició de tensioactiu.

Els índexs de polidispersitat, PDI, de les nano-emulsions obtingudes són baixos, però en general, es detecta una tendència ascendent amb el temps, probablement degut als efectes de desestabilització que produeixen canvis en la mida de gota.

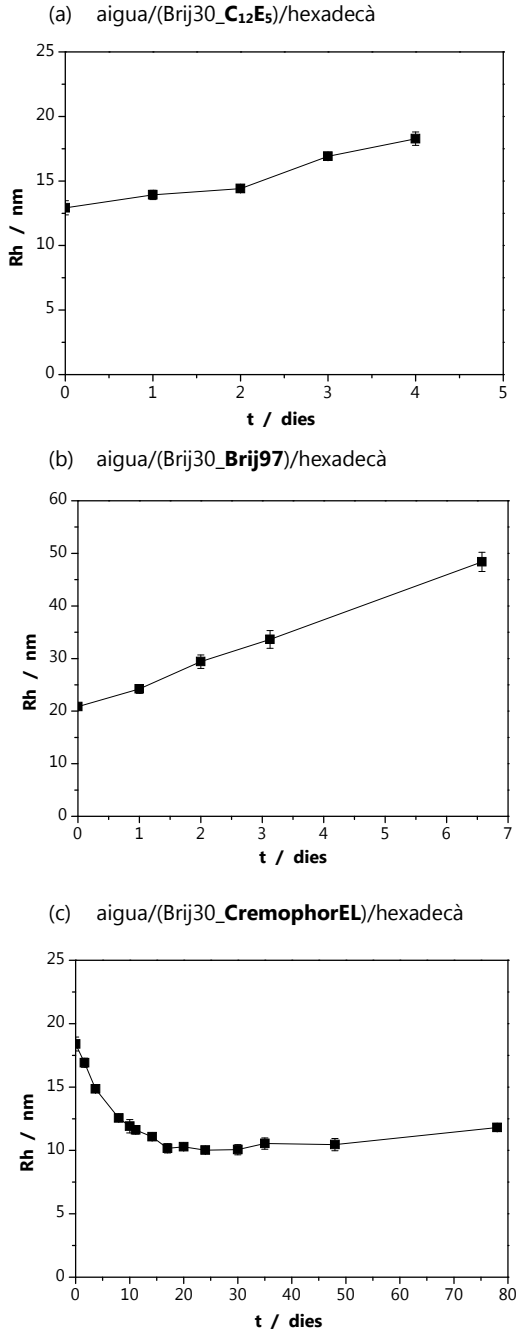


Figura 4.35. Variació de la mida de gota, Rh (valor promig \pm desviació estàndard) en funció del temps, a l'angle de dispersió θ de 90° determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" de les nano-emulsions obtingudes amb en els sistemes: (a) aigua/(Brij30_ **C₁₂E₅**)/hexadecà, Ros=0.55 (b) aigua/(Brij30_ **Brij97**)/hexadecà, Ros=0.63, (c) aigua/(Brij 30_ **CremophorEL**)/hexadecà, Ros=0.64. T=24°C.

Taula 4.17. Valors de Radi hidrodinàmic (valor promig ± desviació estàndard) i Índex de polidispersitat (PDI) en funció del temps a l'angle de dispersió θ de 90° determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" de les nano-emulsions obtingudes a temperatura constant 24°C pels sistemes aigua/(Brij30_ C₁₂E₅)/hexadecà, Ros=0.55, aigua/(Brij30_Brij97)/hexadecà, Ros=0.63, i aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà, Ros=0.64. (n.d.: no determinat)

| t (dies) | aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | | | |
|----------|--------------------------------|------|-------------|------|--------------|------|
| | C ₁₂ E ₅ | | Brij 97 | | Cremophor EL | |
| | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI |
| 0 | 12.9 ± 0.17 | 0.17 | 20.9 ± 0.59 | 0.23 | 18.4 ± 0.55 | 0.16 |
| 1 | 13.9 ± 0.18 | 0.37 | 24.2 ± 0.83 | 0.24 | n.d | n.d |
| 2 | 14.4 ± 0.35 | 0.35 | 29.4 ± 1.29 | 0.36 | 16.9 ± 0.36 | 0.16 |
| 3 | 16.9 ± 0.88 | 0.46 | 33.6 ± 1.68 | 0.39 | n.d | n.d |
| 4 | 18.3 ± 0.81 | 0.23 | n.d | n.d | 14.9 ± 0.29 | 0.16 |
| 7 | n.d | n.d | 48.4 ± 1.83 | 0.42 | n.d | n.d |
| 8 | n.d | n.d | n.d | n.d | 12.6 ± 0.21 | 0.21 |
| 10 | n.d | n.d | n.d | n.d | 11.9 ± 0.52 | 0.31 |
| 11 | n.d | n.d | n.d | n.d | 11.6 ± 0.33 | 0.20 |
| 14 | n.d | n.d | n.d | n.d | 11.1 ± 0.29 | 0.30 |
| 17 | n.d | n.d | n.d | n.d | 10.2 ± 0.36 | 0.28 |
| 20 | n.d | n.d | n.d | n.d | 10.3 ± 0.17 | 0.37 |
| 24 | n.d | n.d | n.d | n.d | 10.0 ± 0.23 | 0.37 |
| 30 | n.d | n.d | n.d | n.d | 10.1 ± 0.40 | 0.38 |
| 35 | n.d | n.d | n.d | n.d | 10.5 ± 0.44 | 0.31 |
| 48 | n.d | n.d | n.d | n.d | 14.5 ± 0.48 | 0.38 |
| 78 | n.d | n.d | n.d | n.d | 11.8 ± 0.32 | 0.34 |

4.3.3. Formació de nano-emulsions a partir de microemulsions O/W amb una Row=0.2

Una vegada confirmada la formació de nano-emulsions O/W per addició d'un segon tensioactiu S2 a una fase de microemulsió O/W, es va assajar la formació de nano-emulsions pel mateix procediment i sistema però per una relació oli-aigua Row de 0.2 i partint d'una concentració de tensioactiu lleugerament més elevada amb la finalitat d'obtenir mides de gota inferiors i una major estabilitat.

Per aquest assaig es van seleccionar els tensioactius S2, **CremophorEL** i **Brij97**, i es van addicionar a la fase de microemulsió O/W (regió D₁) del sistema aigua/Brij30/hexadecà, amb una Row de 0.2, i un contingut d'aigua de 72.4%, a temperatura constant de 24°C. La composició inicial de la microemulsió està marcada amb el símbol (●) en el diagrama de fases de la Figura 4.3e del apartat 4.1.2 del apartat de Resultats i discussió.

La Figura 4.36 mostra el camí recorregut durant el procés d'emulsificació. El punt 1 senyala la composició inicial dins de la fase de microemulsió i el punt 2 situat en la regió multifàsica del diagrama de fases indica la composició de la nano-emulsió obtinguda.

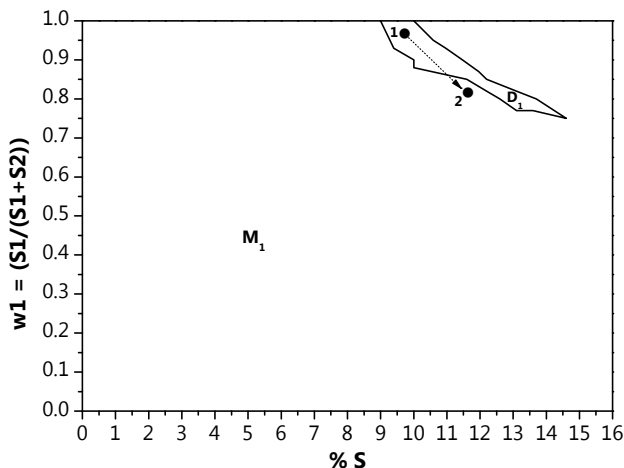


Figura 4.36. Diagrama de fases en funció de la fracció massica de Brij30 (w_1) i del contingut de tensioactiu total (S) pel sistema **aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà**, **Row=0.2**, $T=24^\circ\text{C}$. La fletxa discontinua senyala el camí recorregut durant el procés d'emulsificació. (D_1 : fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions, d'estructura O/W, M_1 : fase multifàsica d'estructura O/W).

Es van obtenir nano-emulsions amb l'addició del tensioactiu CremophorEL però no amb l'addició del Brij97. Les composicions de la fase inicial de microemulsió de la regió D_1 i de la fase final de nano-emulsió s'il·lustren a la Taula 4.18.

Taula 4.18. Composicions de la fase inicial de microemulsió O/W i de la fase final de nano-emulsió O/W pel sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà, $T=24^\circ\text{C}$.

| Sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | |
|---|-------------|-----------|------------|
| Formulació | S2 | %W | Ros |
| microemulsió | - | 72.4 | 0.66 |
| nano-emulsió | CremophorEL | 70.5 | 0.61 |

4.3.3.1. Caracterització de les microemulsions i nano-emulsions per dispersió dinàmica de la llum làser

Es van caracteritzar les microemulsions del sistema aigua/Brij30/hexadecà amb una relació Row de 0.2 i les nano-emulsions obtingudes, per dispersió dinàmica de la llum làser a l'angle de dispersió de 90° .

El radi hidrodinàmic, Rh, de la nano-emulsió que s'obté és lleugerament superior al de la microemulsió inicial (Taula 4.19). En referència a l'índex de polidispersitat, PDI, la nano-emulsió final presenta un valor menor que el de la microemulsió inicial i a més presenta un valor inferior a 0.2, indicant que és una fase amb baixa polidispersitat. Els valors obtinguts estan d'acord amb els resultats prèviament mostrats a la Taula 4.14, tant de la fase inicial de microemulsió amb una Row de 0.2 com de les nano-emulsions per addició de tensioactiu.

Taula 4.19. Radi hidrodinàmic (Rh) i Índex de polidispersitat (PDI) obtinguts mitjançant la tècnica de DLS a l'angle de dispersió θ de 90° i el mètode d'anàlisi de "Cumulants", de l'estructura inicial de microemulsió O/W i de l'estructura final de nano-emulsió del sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà, T=24°C, Row=0.2.

| Sistema aigua/(Brij30_S2)/hexadecà | | | |
|------------------------------------|-------------|-------------|------|
| Formulació | S2 | Rh (nm) | PDI |
| microemulsió | - | 16.1 ± 0.34 | 0.48 |
| nano-emulsió | CremophorEL | 17.9 ± 0.40 | 0.16 |

La Figura 4.37 mostra la distribució de mides de gota a temps zero i a un dia per la fase inicial de microemulsió obtingudes mitjançant l'anàlisi CONTIN. S'observa una població centrada a un radi hidrodinàmic d'aproximadament 20nm que podria correspondre amb el valor de Rh obtingut pel mètode d'anàlisi de "Cumulants", i una segona població a Rh superiors a 150nm que podria justificar l'elevat índex de polidispersitat obtingut pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" (Taula 4.19). Com ja s'ha comentat anteriorment la distribució bimodal de la mida de gota podria ser degut a agregació de les gotes.

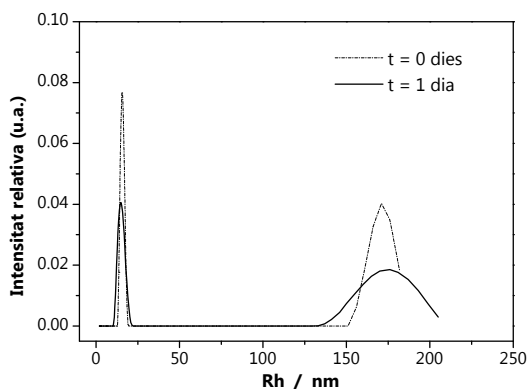


Figura 4.37. Perfils de distribució de mides de gota a l'angle de dispersió θ de 90° de la fase inicial de microemulsió del sistema aigua/Brij30/hexadecà, Row=0.2, T=24°C, a t=0 dies i t=1 dia, obtinguts mitjançant el mètode de l'anàlisi CONTIN a partir de mesures per DLS a l'angle de dispersió de 90°.

4.3.3.2. Evolució de la mida de gota

Es va avaluar la mida de gota en funció del temps (Figura 4.38, Taula 4.20). Durant els primers 6 dies la mida de gota es manté pràcticament constant, però a partir dels 8 dies la mida de gota disminueix amb el temps.

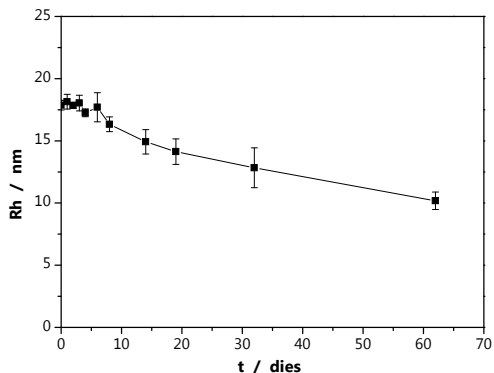


Figura 4.38. Variació de la mida de gota, Rh (valor promig ± desviació estàndard) en funció del temps a l'angle de dispersió θ de 90° determinat pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" de la nano-emulsió obtinguda pel sistema aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà, **Row=0.2**, T=24°C.

Taula 4.20. Valors de Radi hidrodinàmic (valor promig ± desviació estàndard) i Índex de polidispersitat (PDI) en funció del temps a l'angle de dispersió θ de 90° determinats pel mètode d'anàlisi de "Cumulants" de la nano-emulsió obtinguda amb una **Row=0.2** i T=24°C pel sistema aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà.

| t (dies) | Rh (nm) | PDI |
|-----------------|----------------|------------|
| 0 | 17.9 ± 0.39 | 0.16 |
| 1 | 18.1 ± 0.59 | 0.19 |
| 2 | 17.9 ± 0.23 | 0.20 |
| 3 | 18.0 ± 0.63 | 0.30 |
| 4 | 17.3 ± 0.32 | 0.31 |
| 6 | 17.7 ± 1.17 | 0.27 |
| 8 | 16.3 ± 0.59 | 0.21 |
| 14 | 14.9 ± 0.98 | 0.33 |
| 19 | 14.1 ± 1.02 | 0.40 |
| 32 | 12.8 ± 1.60 | 0.42 |
| 62 | 10.2 ± 0.71 | 0.38 |

Les dades obtingudes de les mesures de dispersió dinàmica de la llum làser també es van analitzar pel mètode d'anàlisi "Multi-angle". Els radis hidrodinàmics en funció del temps determinats pels mètodes d'anàlisi de "Cumulants" i "Multi-angle" són molt semblants (Figura 4.39), corroborant així la correcta estimació dels valors de Rh obtinguts.

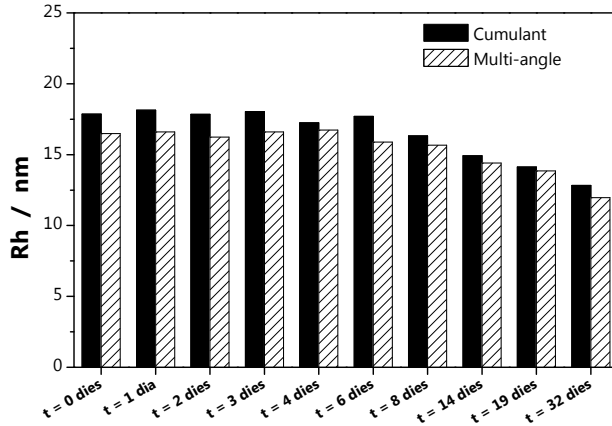


Figura 4.39. Comparació de radis hidrodinàmics, Rh, determinats pels mètodes d'anàlisi de "Cumulants" i "Multi-angle" a l'angle de dispersió θ de 90° de la nano-emulsió obtinguda pel sistema aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà, **Row=0.2**, $T=24^\circ\text{C}$.

La Figura 4.40 mostra els perfils de distribució de mides de gota en funció del temps determinats mitjançant el mètode d'anàlisi CONTIN de la nano-emulsió obtinguda amb el sistema aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà. S'observa una població centrada a 20nm que podria correspondre amb el valor obtingut amb el mètode d'anàlisi de "Cumulants" (Taula 4.20). Es percep també una segona població a Rh superiors a 150nm.

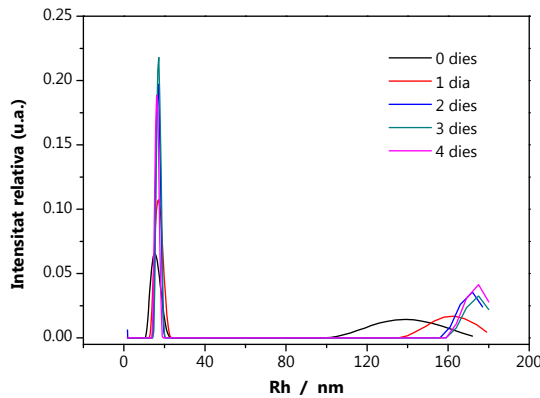


Figura 4.40. Perfil de distribució de mides de gota en funció del temps, a l'angle de dispersió θ de 90° determinat pel mètode d'anàlisi CONTIN de la nano-emulsió obtinguda pel sistema aigua/(Brij30_CremophorEL)/hexadecà a temperatura constant, 24°C , **Row=0.2**.

Conclusions d'aquest apartat

- *Es van formar nano-emulsions tipus O/W sense inversió de fase a temperatura constant per addició d'un segon tensioactiu a microemulsions O/W per un procediment no descrit fins ara.*
- *Es va determinar la concentració mínima de tensioactiu (S2) requerida per formular les nano-emulsions i es va posar de manifest que entre tots els tensioactius assajats el CremophorEL era el més eficient.*

4.4. Formació de nano-emulsions per addició d'aigua a mescles binàries oli/tensioactiu, microemulsions W/O i O/W

Un altre objectiu de la present tesi doctoral era estudiar la influència de la composició inicial d'aigua, les diferents fases que es formen durant el procés d'emulsificació així com els aspectes cinètics en les propietats i la mida de gota de les nano-emulsions O/W formulades per addició d'aigua a temperatura constant (mètode PIC). Es van seleccionar sistemes dels quals es tenia una descripció prèvia del comportament fàsic, ja que era d'esperar que el coneixement de les diferents fases presents durant el procés d'emulsificació des de la composició inicial a la dispersió final permetrien esbrinar quines són les fases determinants de la mida de gota de les nano-emulsions resultants. Es troba descrit a la literatura que el fet que hi hagi una seqüència de fases afavoreix la formació de nano-emulsions i hi han indicis que la darrera fase que es forma es la que determina la mida de gota de la nano-emulsió final (**Forgiarini, 2001**), (**Usón, 2004**), (**Sadurní, 2005**). Amb la finalitat de confirmar aquests indicis es va realitzar un estudi sistemàtic de formació de nano-emulsions per addició d'aigua per un mateix sistema.

Els tensioactius dels sistemes seleccionats van ser tensioactius de grau tècnic no iònics de tipus etoxilat/propioxietilenat (PEO-PPO). Es van abreviar com PPO-PEO-3 i PPO-PEO-5, en el que els números 3 i 5 indiquen el nombre de mols d'òxid d'etilè. La Taula 4.21 mostra els sistemes seleccionats per a realitzar l'estudi.

Es va estudiar la influència del component oliós (miristat d'isopropil, esqualà) en el sistema aigua/PPO-PEO-5/oli, la influència del tensioactiu (PPO-PEO-3, PPO-PEO-5) en el sistema aigua/tensioactiu/miristat d'isopropil_parafina líquida (1:1) i l'efecte del component oliós (miristat d'isopropil, parafina líquida) en una mescla de tensioactius en el sistema aigua/PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1)/oli.

Taula 4.21. Sistemes aigua/tensioactiu/oli seleccionats.

| |
|---|
| aigua / PPO-PEO-5 / miristat d'isopropil |
| aigua / PPO-PEO-5 / esqualà |
| aigua / PPO-PEO-3 / miristat d'isopropil_parafina líquida (1:1) |
| aigua / PPO-PEO-5 / miristat d'isopropil_parafina líquida (1:1) |
| aigua / PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1) / miristat d'isopropil |
| aigua / PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1) / parafina líquida |

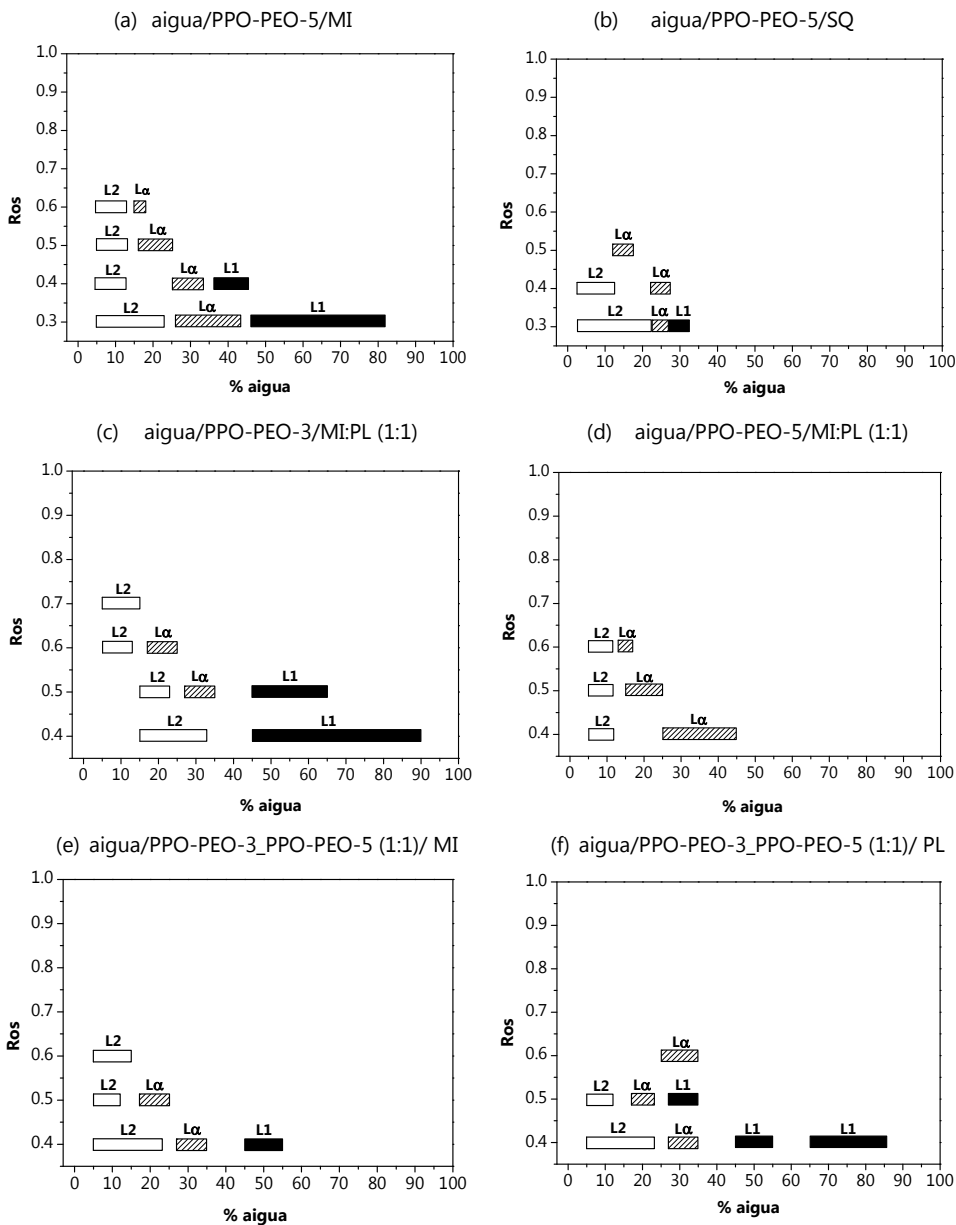


Figura 4.41. Diagrames de fases parcials en funció de la relació Ros i de la concentració d'aigua, T=25°C, pels sistemes: (a) aigua/PPO-PEO-5/MI, (b) aigua/PPO-PEO-5/SQ, (c) aigua/PPO-PEO-3/MI:PL (1:1), (d) aigua/PPO-PEO-5/MI:PL (1:1), (e) aigua/PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1)/MI, (f) aigua/PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1)/PL. (MI: miristat d'isopropil, PL: parafina líquida, SQ: esqualà). Els rectangles representen les regions monofàsiques: (L2) fase líquida isotròpica de microemulsions d'estructura W/O, (L α) fase de cristall líquid laminar, (L1) fase líquida isotròpica de microemulsions d'estructura O/W.

El comportament fàsic d'aquests sistemes s'ha representat en diagrames de fases parcials en funció de la relació Ros i del contingut d'aigua (Figura 4.41). En aquesta representació nomès s'indiquen els intervals de composicions de les regions monofàsiques:

- **L₂** que correspon a una regió isòtropa i transparent de microemulsions de fase externa oliosa.
- **L_α** que correspon a una fase anisòtropa de cristall líquid laminar.
- **L₁** que correspon a una regió isòtropa i transparent de microemulsions de fase externa aquosa. S'ha de mencionar que la regió L1 del diagrama de fase parcial del sistema aigua/PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1)/PL (Figura 4.41f) correspon a una mateixa regió en el corresponent diagrama de fases ternari.

La resta del diagrama correspon a regions multifàsiques no indicades a la Figura 4.41.

Es va dur a terme un estudi sistemàtic de formació de nano-emulsions O/W per addició d'aigua a la temperatura constant de 25°C, a composicions amb diferents relacions Ros segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.3.1. Les composicions amb un aspecte lletós-gris indicatiu d'una mida de gota gran, superior a 500 nm, corresponents a macroemulsions o emulsions convencionals no es van considerar per estudis posteriors. El contingut d'aigua de les nano-emulsions va ser superior al 85%. Les nano-emulsions es van caracteritzar mitjançant la determinació del radi hidrodinàmic (mida de gota) per la tècnica de dispersió dinàmica de la llum làser (DLS).

Atès que la formació d'una dispersió transparent o translúcida pot ser indicatiu de que es tracta d'una nano-emulsió o d'una microemulsió ja que ambdós tipus de dispersions poden presentar el mateix aspecte, es va procedir a discernir entre una o altra preparant la mateixa composició seguint dos mètodes diferents. El primer mètode va consistir en l'addició d'aigua en una única addició a mescles d'oli/tensioactiu prèviament homogeneïtzades. El segon mètode va consistir en la pesada directa de tots els components i la seva homogeneïtzació, és a dir, mescla directa de tots els components. Tenint en compte que les microemulsions són sistemes que estan en equilibri termodinàmic, la seva formació no depèn del mètode de preparació sinó que es forma de manera espontània (**Danielsson, 1981**). Contràriament, les nano-emulsions són sistemes que no estan en equilibri termodinàmic i per tant la seva formació sí que depèn del mètode de preparació (**Tadros, 2004**), (**Solans, 2005**) (**Anton, 2011**). D'aquesta manera va ser possible diferenciar entre microemulsions i nano-emulsions.

A continuació es descriuen els resultats obtinguts per a la formació de nano-emulsions O/W per a cada sistema en funció dels tensioactius o olis assajats i de la composició inicial.

4.4.1. Sistemes aigua / tensioactiu no iònic etoxilat/propioxietilenat (PPO-PEO-5) / oli

Es va estudiar la formació de nano-emulsions O/W en els sistemes aigua/PPO-PEO-5/miristat d'isopropil (MI) o esqualà (SQ). En una primera etapa es va estudiar la influència de la composició inicial i el mètode d'addició de l'aigua en la formació de les nano-emulsions mantenint la relació $Ros=0.4$.

La Taula 4.22 mostra l'aspecte i el tipus de dispersió obtingut al preparar les mostres per addicions successives d'aigua i per una única addició d'aigua. Contràriament al que era d'esperar, l'addició d'aigua en una sola addició va produir un aspecte de la dispersió final més transparent i blavós que per addicions successives. Considerant que hi ha el mateix nombre de gotes l'addició de l'aigua d'un sol cop propiciaria la formació de gotes de mida més petita. S'ha de mencionar que les nano-emulsions formades eren molt inestables, ja que al cap d'uns minuts augmentava la terbolesa de les mostres.

Es pot considerar que en aquests sistemes a la temperatura de 25°C les propietats hidròfiles-lipòfiles del tensioactiu estan equilibrades ja que es formen estructures de curvatura plana ($L\alpha$) (veure Figura 4.41a), així els valors baixos de la tensió interfacial faciliten la formació de gotes petites, no obstant, una vegada formada l'emulsió es produeix fenòmens de desestabilització. La lenta addició de l'aigua en les etapes inicials de formació de les nano-emulsions facilitaria els fenòmens de desestabilització com l'Ostwald Ripening i en conseqüència la formació de gotes de mida més gran i per tant una disminució de la transparència de la dispersió final. Es referma així la idea suggerida per varis autors que la cinètica del procés d'emulsificació juga un paper important en les propietats de les nano-emulsions resultants (**Forgiarini, 2001**), (**Solans, 2012**).

Així, tenint en compte els resultats obtinguts en la formulació de nano-emulsions amb una relació Ros de 0.4, les nano-emulsions amb altres relacions Ros i per la resta de sistemes es van formular addicionant l'aigua en una sola addició amb les mostres en agitació per tal que el procés de formació de la nano-emulsió fos més ràpid que els fenòmens de desestabilització i la mida de gota fos petita.

Taula 4.22. Formació de nano-emulsions O/W en el sistema **aigua / PPO-PEO-5 / MI** a 25°C, per una relació Ros=0.4, mantenint la mostra en agitació vòrtex.

| % aigua inicial | % aigua final | Mètode d'addició d'aigua | Aspecte | Tipus de dispersió |
|----------------------------------|----------------------|---------------------------------|---|---------------------------|
| 0% (O+S) | 85% | Una única addició | Dispersió transparent-translúcida blavosa | Nano-emulsió |
| | 95% | | Dispersió transparent blavosa | Nano-emulsió |
| | 99% | | Dispersió transparent blavosa | Nano-emulsió |
| 10% (L2, microemulsió W/O) | 85% | Una única addició | Dispersió transparent-translúcida blavosa | Nano-emulsió |
| | | Addicions successives | Dispersió translúcida blanca | Nano-emulsió |
| 40% (L1, microemulsió O/W) | 85% | Addicions successives | Dispersió opaca, blanca, líquida | Emulsió convencional |
| | | Una única addició | Dispersió transparent-translúcida blavosa | Nano-emulsió |

La formació de nano-emulsions O/W en el sistema aigua/PPO-PEO-5/MI per a relacions Ros>0.4 i el sistema aigua/PPO-PEO-5/SQ en funció de la relació Ros i del contingut d'aigua es mostren a les Taules 4.23-4.25 i a la Figura 4.42. Les nano-emulsions es formen independentment de la concentració inicial d'aigua per a les relacions Ros de 0.3-0.6.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.23. Formació de nano-emulsions O/W amb un 90% d'aigua en el sistema **aigua / PPO-PEO-5 / MI** a 25°C, en funció de la concentració inicial d'aigua en una relació Ros=0.3. Aigua addicionada en una única addició.

| % aigua inicial | Aspecte després de l'addició d'aigua | Aspecte de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|----------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------|
| 0% (O+S) | Dispersió transparent líquida blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió transparent líquida blavosa | | Nano-emulsió |
| 50% (L1, microemulsió W/O) | Dispersió transparent líquida blavosa | | Nano-emulsió |

Taula 4.24. Formació de nano-emulsions O/W en el sistema **aigua / PPO-PEO-5 / MI** a 25°C, en funció de la relació Ros i de la composició inicial d'aigua. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | % aigua final | Aspecte de la dispersió | Tipus de dispersió |
|------------|----------------------------------|---------------|---|----------------------|
| 0.5 | 0% (O+S) | 95% | Dispersió transparent-translúcida blavosa | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | 95% | | Nano-emulsió |
| 0.6 | 0% (O+S) | 85% | Dispersió blanca translúcida | Nano-emulsió |
| | 10% (L1, microemulsió W/O) | | | Nano-emulsió |
| 0.7 | 0% (O+S) | 95% | Dispersió opaca blanca | Emulsió convencional |
| 0.8 | | | | |
| 0.9 | | | | |

Taula 4.25. Formació de nano-emulsions O/W amb un 90% d'aigua final en el sistema **aigua / PPO-PEO-5 / SQ** a 25°C, en funció de la relació Ros i de la concentració inicial d'aigua. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | Aspecte després de l'addició d'aigua | Aspecte després de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|-----|----------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|
| 0.3 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca líquida | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blavosa | | Nano-emulsió |
| | 30% (L1, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blavosa | | Nano-emulsió |
| 0.4 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió opaca blanca | | Emulsió convencional |
| 0.5 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |
| 0.6 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |

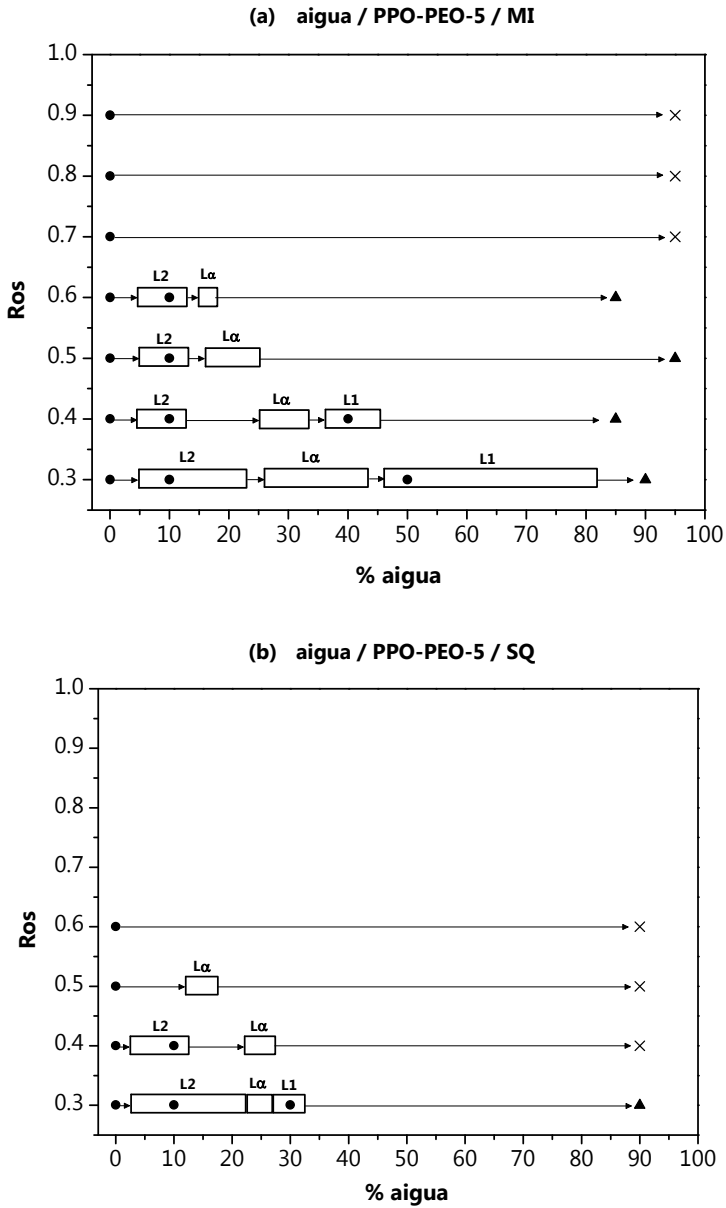


Figura 4.42. Diagrames de fases parcials, en els sistemes (a) aigua / PPO-PEO-5 / MI, i (b) aigua / PPO-PEO-3 / SQ, en funció de la relació Ros i del contingut d'aigua, T=25°C. Els símbols (●) indiquen les concentracions inicials d'aigua. (▲) formació de nano-emulsions, (×) no formació de nano-emulsions. Les fletxes indiquen el camí d'emulsificació.

En el sistema amb el miristat d'isopropil es van formar nano-emulsions en un rang de relacions Ros (0.3-0.6) més elevat que amb l'esqualà (Ros=0.3). La major polaritat del miristat d'isopropil respecte a la de l'esqualà propiciaria la formació de nano-emulsions O/W en un rang més ampli de Ros.

Es de destacar que en els dos sistemes (amb miristat d'isopropil ó esqualà) es van obtenir nano-emulsions per tres mecanismes: a) per inversió de fase més dilució de microemulsió O/W, b) per inversió de fase, ja sigui partint de mescles binàries d'oli/tensioactiu o bé partint de microemulsions de tipus W/O (L2), i c) sense inversió de fase, per dilució de microemulsions tipus O/W (L1).

Les nano-emulsions van ser caracteritzades mitjançant la determinació de la mida de gota per la tècnica de DLS segons l'apartat 3.3.12. a l'angle de dispersió de 90°. També es va avaluar l'estabilitat. La Figura 4.43 mostra la variació de la mida de gota en funció del temps de nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua del 90% obtingudes pel sistema aigua/PPO-PEO-5/MI a partir de diferents composicions inicials. Els valors de radi hidrodinàmic confirmen la formació de gotes de mida en el rang nanomètric. Així mateix la mida de gota és independent de la composició inicial. No obstant, s'ha de mencionar que la mida de gota augmenta lleugerament amb el temps.

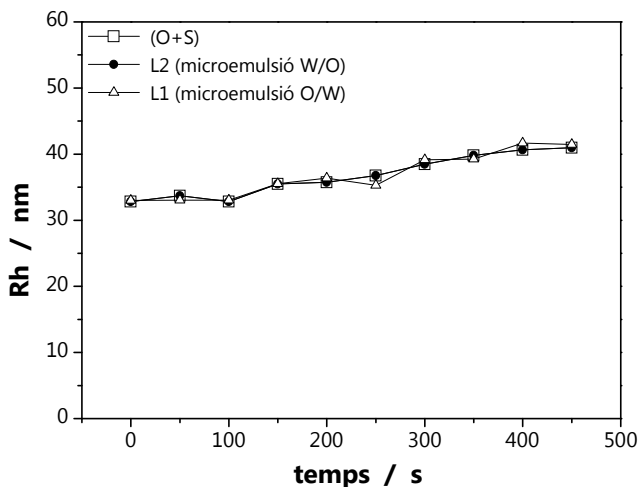
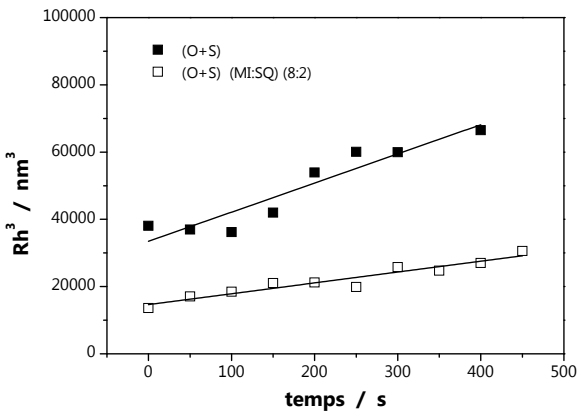


Figura 4.43. Variació de la mida de gota (Rh) en funció del temps de les nano-emulsions O/W obtingudes en el sistema aigua/PPO-PEO-5/MI per la relació Ros=0.3 i per a diferents composicions inicials.

Amb la finalitat d'augmentar l'estabilitat de les nano-emulsions es va addicionar esqualà en una relació miristat d'isopropil/esqualà 8:2, ja que es troba descrit a la literatura que en la formació de nano-emulsions tipus O/W l'addició d'un oli de menor polaritat pot disminuir els efectes de desestabilització per maduració d'Ostwald (Izquierdo, 2002).

Les nano-emulsions no es formen si no hi ha fases monofàsiques de microemulsions o de cristall líquid durant l'emulsificació.

Per a les nano-emulsions del sistema amb miristat d'isopropil amb $Ros=0.3$ i obtingudes a partir de la mescla d'oli/tensioactiu al determinar la mida de gota en funció del temps i representar Rh^3 en funció del temps es va posar de manifest que la pendent de la recta resultant és menor amb la incorporació d'esqualà (Figura 4.44), és a dir, que l'esqualà atenua la velocitat a la que es desestabilitza la nano-emulsió per maduració d'Ostwald (Taula 4.26). En conseqüència l'addició d'esqualà a la fase dispersa augmenta l'estabilitat de les nano-emulsions O/W pel sistema aigua/PPO-PEO-5/MI. No obstant, l'estabilitat d'aquestes nano-emulsions és inferior a una hora.



Taula 4.26. Velocitat de maduració d'Ostwald de les nano-emulsions.

| Composició inicial emulsificació | Velocitat maduració d'Ostwald (nm^3/min) |
|----------------------------------|--|
| O+S | 5201 |
| O+S (MI:SQ) (8:2) | 1936 |

Figura 4.44. Ajust a l'equació de Maduració d'Ostwald de les nano-emulsions O/W formades amb el sistema aigua/PPO-PEO-5/MI, $Ros=0.3$. Efecte de l'addició d'esqualà (SQ) a la fase dispersa.

És destacable que l'addició d'esqualà produeix una lleugera disminució de la mida de gota si l'emulsificació s'inicia de la barreja d'oli i tensioactiu (O+S). També es va estudiar la mida de gota i estabilitat de les nano-emulsions iniciant l'emulsificació en les regions L2 i L1 (sense i amb esqualà). Les nano-emulsions amb esqualà obtingudes a partir d'una mescla (O+S) ó de la regió L1 van presentar mida de gota similar a les obtingudes a partir de la mescla (O+S) i més petita que a partir de la regió L2. Contràriament al que era d'esperar no es va observar variació de la mida de gota amb i sense esqualà si es parteix d'una fase de microemulsió inversa (L2) (Figura 4.45).

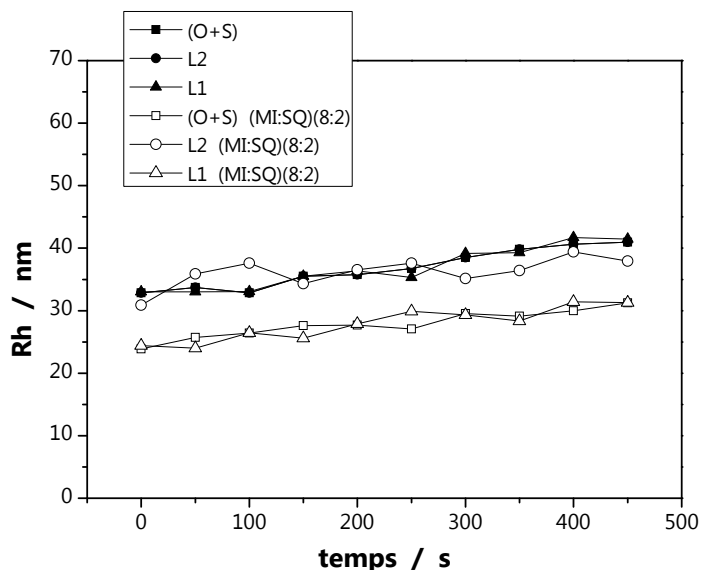


Figura 4.45. Variació de la mida de gota (Rh) en funció del temps de les nano-emulsions O/W obtingudes en el sistema aigua/PPO-PEO-5/MI per la relació Ros=0.3 i per a diferents composicions inicials. Efecte de la incorporació d'esqualà a la fase dispersa.

Les nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua del 90% formades en el sistema aigua/PPO-PEO-5/esqualà presenten valors de mida de gota (Figura 4.46) del mateix ordre que les obtingudes amb el miristat d'isopropil (Figura 4.45), tot i que la nano-emulsió obtinguda partint de la mescla inicial d'oli/tensioactiu presenta valors lleugerament superiors. Això podria ser degut a la major viscositat que presenta l'esqualà en comparació amb el miristat d'isopropil. Tenint en compte que la incorporació de l'aigua en l'emulsificació es va fer en una única addició mantenint la mostra en agitació, podria ser que no donés temps a que es formessin les diferents fases durant el procés d'emulsificació, en particular, la darrera fase probablement és la que determina la mida de gota de la nano-emulsió final que es formarà.

La mida de gota de les nano-emulsions O/W obtingudes amb l'esqualà varia menys en funció del temps, que en el cas del miristat d'isopropil, indicació d'una major estabilitat.

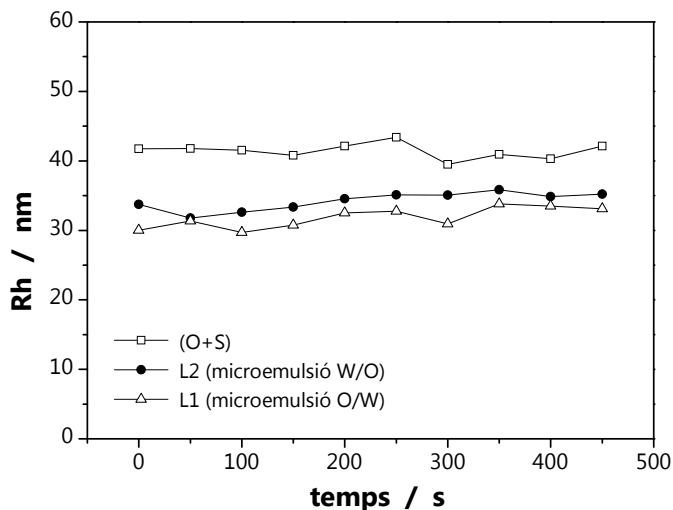


Figura 4.46. Variació de la mida de gota (Rh) en funció del temps de les nano-emulsions O/W obtingudes en el sistema aigua/PPO-PEO-5/SQ per la relació Ros=0.3 en funció de la composició inicial.

4.4.2. Sistemes aigua / tensioactiu no iònic etoxilat/propioxietilenat (PPO-PEO-5 ó PPO-PEO-3) / MI:PL (1:1)

Així mateix es va estudiar la formació de nano-emulsions O/W en el sistema amb una mescla de components oliosos ((miristat d'isopropil (MI) i parafina líquida (PL)) amb els tensioactius PPO-PEO-3 ó PPO-PEO-5. Els resultats obtinguts en la formació de nano-emulsions O/W en funció de la relació Ros i de la concentració d'aigua es mostren en les Taules 4.27-4.28 i a la Figura 4.47.

Taula 4.27. Formació de nano-emulsions O/W amb un 95% d'aigua en el sistema **aigua / PPO-PEO-3 / MI:PL (1:1)** a 25°C, en funció de la relació Ros i del contingut d'aigua inicial. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | Aspecte després de l'addició d'aigua | Aspecte de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|-----|----------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|
| 0.4 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 20% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | | Nano-emulsió |
| 0.5 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 20% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | | Nano-emulsió |
| | 50% (L1, microemulsió O/W) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | | Nano-emulsió |
| 0.6 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.7 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca (límit) | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.8 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.28. Formació de nano-emulsions O/W amb un 90% d'aigua en el sistema **aigua / PPO-PEO-5 / MI:PL (1:1)** a 25°C, en funció de la relació Ros i del contingut inicial d'aigua. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | Aspecte després de l'addició de l'aigua | Aspecte de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|------------|-------------------------------|--|---|---------------------------|
| 0.3 | 0% (O+S) | Dispersió transparent | Dispersió transparent | Microemulsió |
| 0.4 | 0% (O+S) | Dispersió transparent blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.5 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.6 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.7 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |
| 0.8 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |

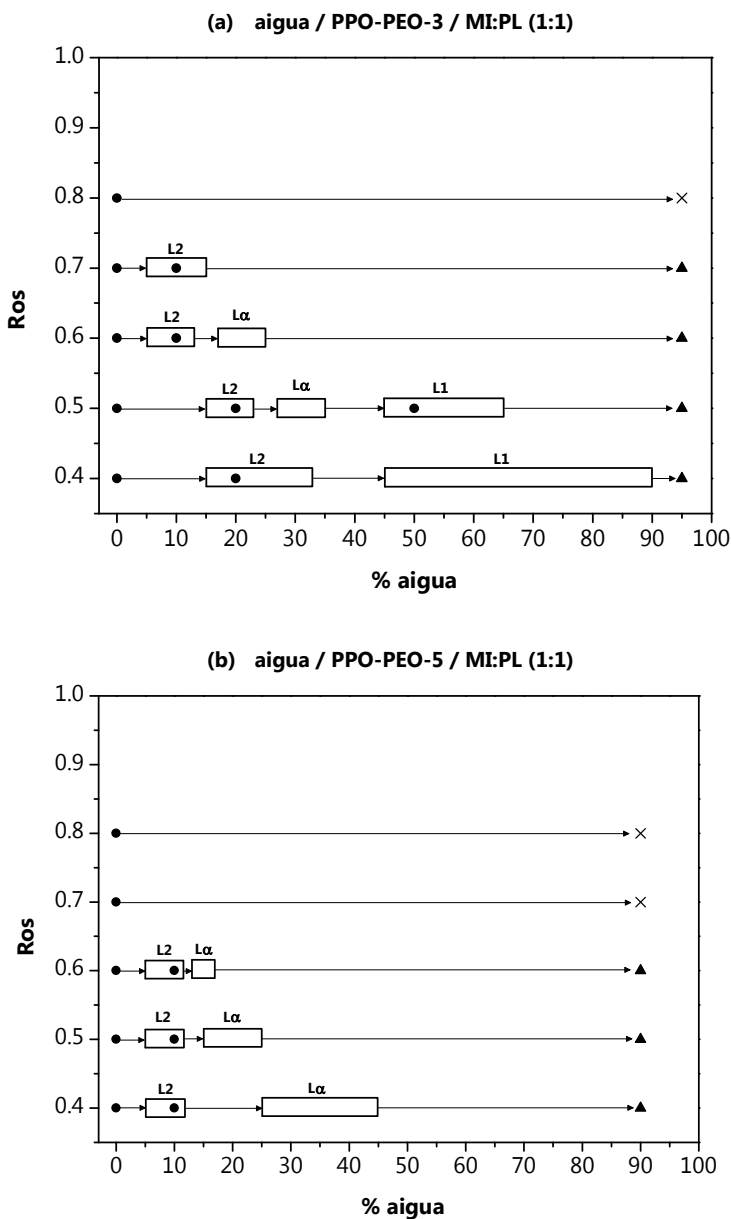


Figura 4.47. Diagrames de fases parcials pels sistemes: (a) aigua / PPO-PEO-3 / MI:PL (1:1), (b) aigua / PPO-PEO-5 / MI:PL (1:1), T=25°C. Els símbols (●) indiquen les concentracions inicials d'aigua. (▲) formació de nano-emulsions, (×) no formació de nano-emulsions. Les fletxes indiquen el camí d'emulsificació.

En el sistema amb el PPO-PEO-3 es van formar nano-emulsions O/W en un rang de relacions Ros (0.4-0.7) lleugerament més extens que amb el PPO-PEO-5 (0.4-0.6). Això podria estar relacionat amb l'absència de zones monofàsiques a relacions Ros elevades. El

tensioactiu PPO-PEO-3 presenta un nombre HLB de 7, lleugerament menor al nombre HLB del PPO-PEO-5 que és de 9. En conseqüència, amb el PPO-PEO-3 està lleugerament més afavorida la formació d'estructures W/O com la fase L2.

En els sistemes aigua/tensioactiu (PPO-PEO-3 ó PPO-PEO-5)/MI:PL (1:1) es van obtenir nano-emulsions O/W pels mecanismes a) inversió de fase més dilució de microemulsions O/W, i b) inversió de fase ja sigui partint de mescles binàries d'oli/tensioactiu o bé partint de microemulsions de tipus W/O (L2). Així mateix en el sistema amb el PPO-PEO-3 també es van obtenir nano-emulsions O/W pel mecanisme c) sense inversió de fase, per dilució de microemulsions tipus O/W (L1). En el sistema amb el PPO-PEO-5 no es va poder estudiar la formació de nano-emulsions O/W iniciant l'emulsificació en la regió (L1) atès que aquesta no es troba present en el interval de relacions Ros estudiat.

4.4.3. Sistemes aigua / tensioactius no iònics etoxilats/propioxietilenats (PPO-PEO-3 : PPO-PEO-5) (1:1) / oli

Es va estudiar la formació de nano-emulsions O/W en el sistema amb una mescla de tensioactius (PPO-PEO-3 i PPO-PEO-5) amb els components oliosos miristat d'isopropil o parafina líquida.

Els resultats obtinguts en la formació de nano-emulsions O/W en funció de la relació Ros i de la concentració inicial d'aigua es mostren a les Taules 4.29-4.30 i a la Figura 4.48.

Taula 4.29. Formació de nano-emulsions O/W amb un 90% d'aigua en el sistema **aigua / PPO-PEO-3 : PPO-PEO-5 (1:1) / MI** a 25°C, en funció de la relació Ros i del contingut inicial d'aigua. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | Aspecte després de l'addició d'aigua | Aspecte de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|------------|----------------------------|--------------------------------------|--|----------------------|
| 0.4 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | | Nano-emulsió |
| | 50% (L1, microemulsió O/W) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | | Nano-emulsió |
| 0.5 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.6 | 0% (O+S) | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.7 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |
| 0.8 | 0% (O+S) | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.30. Formació de nano-emulsions O/W en el sistema **aigua / PPO-PEO-3 : PPO-PEO-5 (1:1) / PL** a 25°C, en funció de la relació Ros i del contingut inicial d'aigua. Aigua addicionada en una única addició.

| Ros | % aigua inicial | % aigua final | Aspecte després l'addició d'aigua | Aspecte de la mescla de components (O+S+W) | Tipus de dispersió |
|------------|-------------------------------|----------------------|--|---|---------------------------|
| 0.3 | 0% (O+S) | 95% | Dispersió transparent blavosa | Dispersió transparent blavosa | Microemulsió |
| 0.4 | 0% (O+S) | 95% | Dispersió transparent líquida blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| | 10% (L2, microemulsió W/O) | | Dispersió transparent líquida blavosa | | Nano-emulsió |
| 0.5 | 0% (O+S) | 90% | Dispersió translúcida blanca-blavosa | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.6 | 0% (O+S) | 90% | Dispersió translúcida blanca | Tèrbol | Nano-emulsió |
| 0.7 | 0% (O+S) | 90% | Dispersió opaca blanca | - | Emulsió convencional |

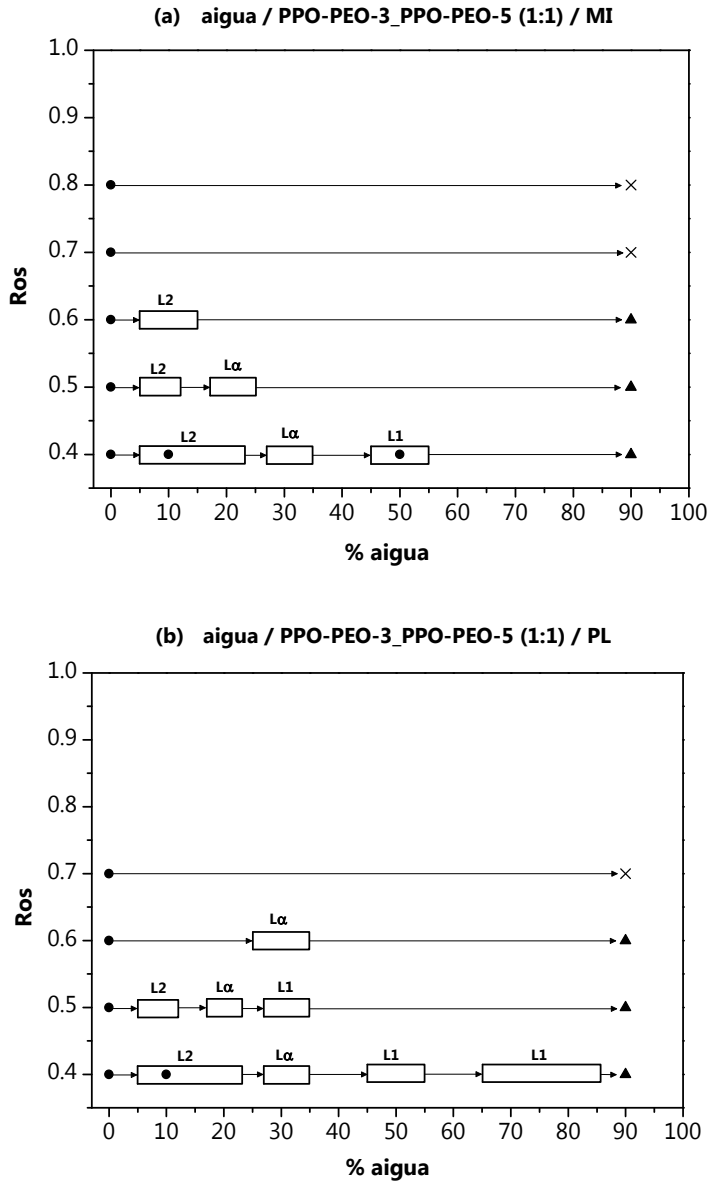


Figura 4.48. Diagrames de fases parcials pels sistemes (a) aigua / PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1) / MI, (b) aigua / PPO-PEO-3_PPO-PEO-5 (1:1) / PL, T=25°C. Els símbols (●) indiquen les concentracions inicials d'aigua. (▲) formació de nano-emulsions, (×) no formació de nano-emulsions. Les fletxes indiquen el camí d'emulsificació.

Es van formar nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua del 90% en un rang de relacions Ros de 0.4-0.6 amb els sistemes amb els olis, miristat d'isopropil i parafina líquida. Era previst que la diferent polaritat dels dos olis produís una diferència en el rang de relacions Ros en el que es formen les nano-emulsions O/W. S'ha de de mencionar que amb els dos olis les regions d'una fase, sigui la fase L2 (microemulsions W/O) o la de cristall líquid laminar ($L\alpha$) s'estenen fins la relació Ros de 0.6. Per tant, això indicaria que és necessària la presència d'una regió monofàsica d'estructura inversa o plana per a la formació de les nano-emulsions tipus O/W. En conseqüència, es confirma que sino hi ha zona monofàsica durant l'emulsificació no s'obté la nano-emulsió.

En ambdós sistemes es van obtenir nano-emulsions O/W pels mecanismes a) inversió de fase més dilució de microemulsions O/W, b) per inversió de fase ja sigui partint de mescles binàries d'oli/tensioactiu o partint de microemulsions de tipus W/O (L2), i c) per dilució de microemulsions tipus O/W (L1).

La Figura 4.49 mostra una representació esquemàtica de tres possibles mecanismes d'emulsificació proposats per aquests sistemes en la formació de nano-emulsions O/W per addició d'aigua a temperatura constant.

Segons el mecanisme (A) les nano-emulsions O/W es formen mitjançant dues etapes: una primera etapa en la que es produeix la inversió de fase d'estructura W/O a estructura O/W, seguida d'una etapa de dilució per addició d'aigua en la que el sistema no és estable termodinàmicament i es forma la nano-emulsió. En l'etapa d'inversió de fase s'observa la presència de fases de cristall líquid laminar indicatiu de que es formen estructures de curvatura plana. D'aquesta manera es pot dir que les nano-emulsions O/W obtingudes pel mecanisme (A) s'han format per combinació de dos mètodes de baixa energia, el mètode "PIC" (inversió de fases per canvi de composició) seguit del mètode de dilució de microemulsions O/W (sense inversió de fase).

En el mecanisme (B) les nano-emulsions O/W es formen mitjançant una única etapa en la que es produeix la inversió de fase d'estructura W/O a estructura O/W, en la que hi pot ser present o no la fase de cristall líquid laminar. Així, pel mecanisme (B) es formen nano-emulsions mitjançant el mètode baixa energia "PIC" (inversió de fases per canvi de composició).

En el mecanisme (C) les nano-emulsions O/W es formen mitjançant una única etapa per dilució de microemulsions del tipus O/W sense inversió de fases.

L'estudi de la formació de nano-emulsions en aquests sistemes permeten concloure que la formació de nano-emulsions O/W és necessari que l'oli i el tensioactiu estiguin ben mesclats i que durant el procés d'emulsificació es produeixin estructures de microemulsió inversa i/o de cristall líquid laminar o de microemulsió directa.

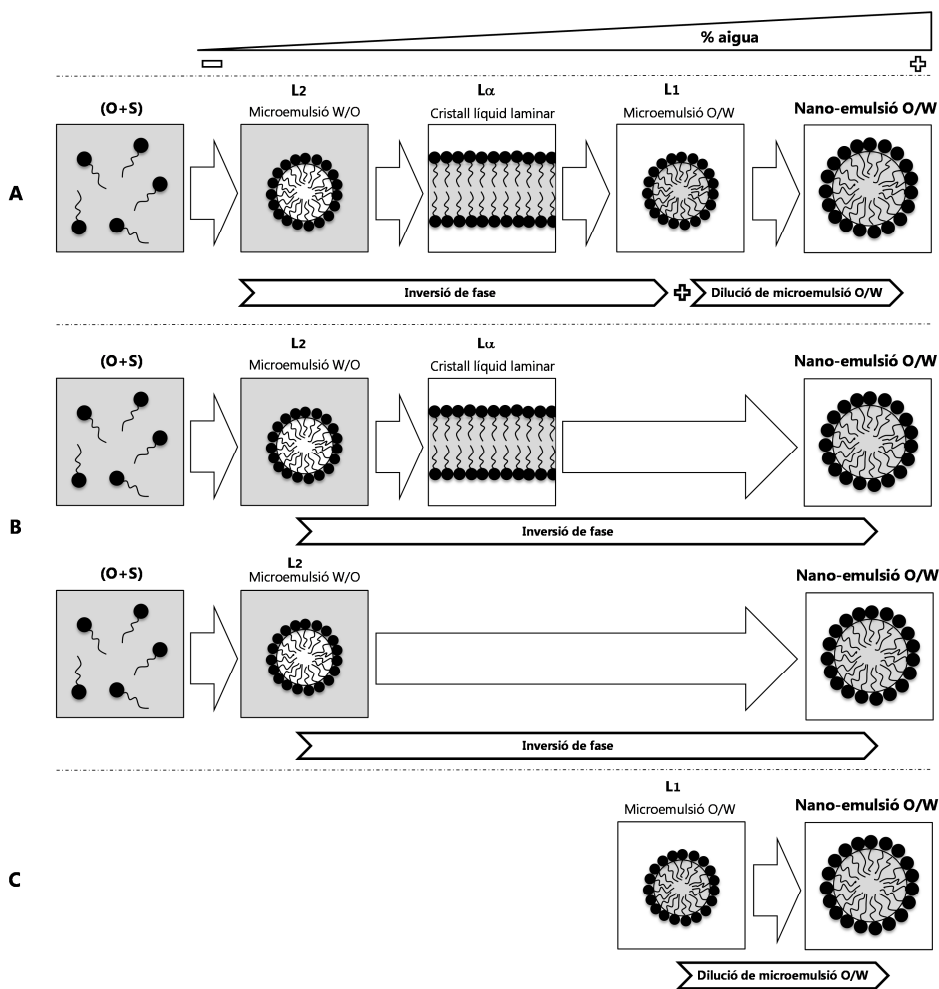


Figura 4.49. Representació esquemàtica de la formació de nano-emulsions O/W per addició d'aigua a temperatura constant: (A) inversió de fase + dilució de microemulsions O/W, (B) inversió de fase, (C) dilució de microemulsions O/W.

Com era previst es va observar que la transparència de les nano-emulsions disminuïa al augmentar la relació Ros. Considerant que hi han el mateix nombre de gotes, al augmentar el contingut d'oli la mida de les gotes augmenta i en conseqüència la mida de gota de la nano-emulsió que s'obté.

Conclusions d'aquest apartat

- *Es van formar nano-emulsions tipus O/W mitjançant mètodes de baixa energia, amb un contingut d'aigua superior al 85%, per addició d'aigua, a temperatura constant pels sistemes següents:*
 - *aigua / PPO-PEO-5 / oli (miristat d'isopropil o esqualà)*
 - *aigua / tensioactiu (PPO-PEO-3 o PPO-PEO-5) / (miristat d'isopropil : parafina líquida)*
 - *aigua / PPO-PEO-3 : PPO-PEO-5 / oli (miristat d'isopropil o parafina líquida)*
- *Les nano-emulsions O/W es van formar mitjançant varis mecanismes de baixa energia a temperatura constant per canvi de composició:*
 - A) *Inversió de fase més dilució de microemulsió O/W*
 - B) *Inversió de fase*
 - C) *Dilució de microemulsió O/W*
- *En aquests sistemes és necessari que durant el procés d'emulsificació es produeixin estructures de microemulsió inversa/directa o fases de cristall líquid laminar per a la formació de nano-emulsions O/W.*
- *El fenòmen de desestabilització predominant d'aquestes nano-emulsions O/W és per maduració d'Ostwald.*
- *Es va verificar que la mida de gota de les nano-emulsions augmenta amb la relació Ros.*

4.5. Nano-emulsions polimèriques utilitzades com a plantilla per a la formació de nanopartícules polimèriques per aplicació en biomedicina

Entre les aplicacions de les nano-emulsions són de gran interès la seva utilització com a plantilla per a l'obtenció de nanopartícules polimèriques de PLGA per aplicació en el camp de la biomedicina.

A la literatura es poden trobar treballs en els que han investigat l'efecte de la relació àcid làctic: àcid glicòlic del PLGA, així com la influència del pes molecular en les característiques de les nanopartícules que s'obtenen (Gómez-Gaete, 2007), (Mittal, 2007), (Gaignaux, 2012), no obstant, no s'ha trobat cap treball publicat fins ara en relació a la influència de la concentració del polímer PLGA en les nano-emulsions polimèriques així com en les nanopartícules polimèriques.

L'objectiu d'aquest estudi era investigar la influència de la concentració de polímer en la formació i propietats de nano-emulsions i nanopartícules polimèriques del tipus O/W. Així mateix, considerant aplicacions en el camp farmacèutic es va estudiar la influència de la concentració de PLGA en l'encapsulació i alliberació d'un principi actiu i es va avaluar la la citotoxicitat *in vitro* de les nanopartícules polimèriques sense i amb principi actiu.

El sistema seleccionat per a realitzar aquest estudi va ser el format per aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) del qual s'havia realitzat un estudi previ en relació a l'obtenció de nanopartícules polimèriques a partir de nano-emulsions.

4.5.1. Estudi del comportament fàsic del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil)

Es va estudiar el comportament fàsic del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) en funció del contingut de polímer a 25°C segons els mètodes de pesada directa i de valoració descrits a l'apartat 3.3.1.

En els diagrames de fases pseudoternaris representats a la Figura 4.50 s'observen dues regions monofàsiques independentment de la concentració de polímer en acetat d'etil:

- **L2** que correspon a una regió isòtropa i transparent de solucions micel·lars inverses o microemulsions de fase externa oliosa.
- **C.L** que correspon a una regió anisòtropa i lleugerament tèrbola que podria correspondre a una fase de cristall líquid laminar, malgrat que no va ser possible la seva confirmació per microscopia òptica amb llum polaritzada degut a la fragilitat d'aquesta fase.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Les altres zones dels diagrames de fases estan formades per les regions multifàsiques:

- **M** que correspon a una regió multifàsica.
- **M+CL** que correspon a una regió multifàsica (M) amb cristall líquid (CL) present.

S'ha de mencionar que en aquestes regions multifàsiques l'equilibri de fases no va ser estudiat.

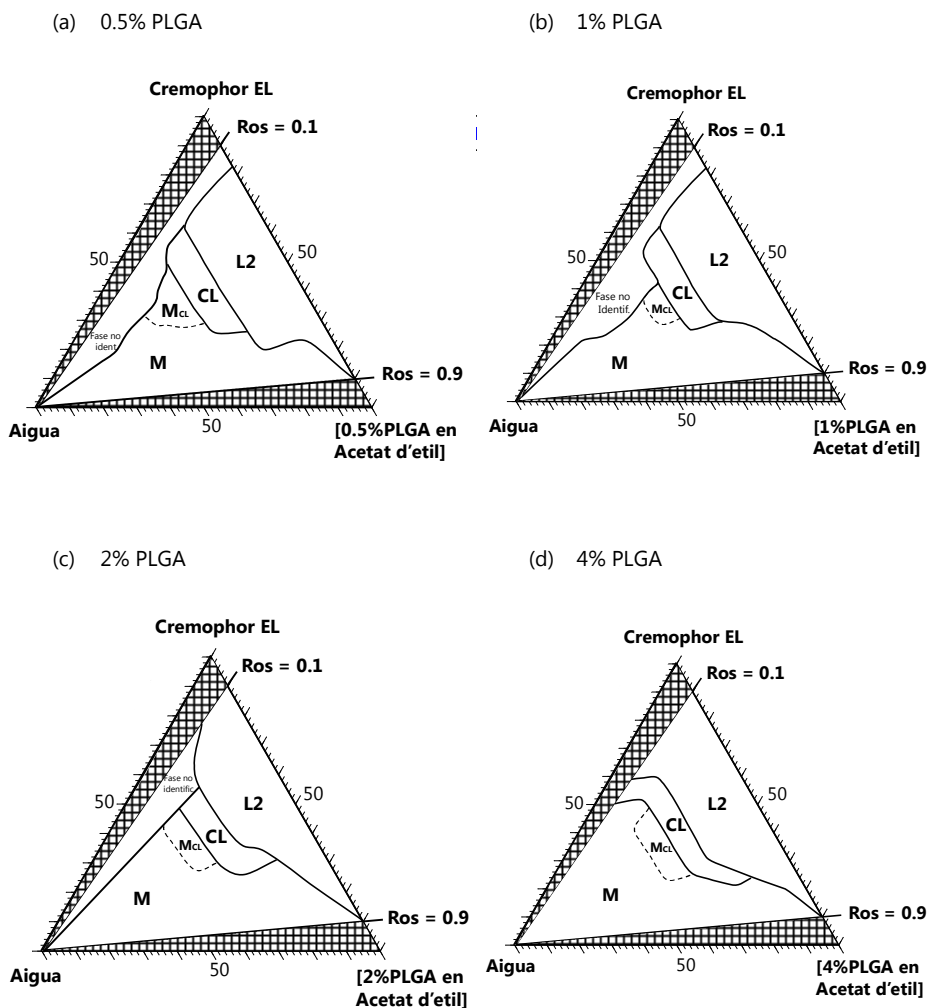


Figura 4.50. Diagrama de fases a $T=25^{\circ}\text{C}$ del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA_Acetat d'etil) en funció del contingut de polímer (a) 0.5%PLGA, (b) 1%PLGA, (c) 2%PLGA, (d) 4%PLGA (L2: fase líquida isotròpica de microemulsions d'estructura O/W, CL: fase anisòtropa lleugerament tèrbola, M: multifàsica). (La zona ratllada és una regió no estudiada).

4.5.2. Formació i caracterització de nano-emulsions polimèriques

Es va estudiar la formació de les nano-emulsions tipus O/W en funció del contingut de polímer (PLGA) del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) per addició d'aigua a barreges d'oli-tensioactiu segons s'ha descrit a l'apartat 3.3.3.1.

Es van obtenir nano-emulsions en un ampli rang de relacions Ros, entre 0.2 i 0.8 i elevat contingut d'aigua, desde 45% d'aigua fins a concentracions superiors al 90%. A la Figura 4.51 es mostra les regions de formació de les nano-emulsions O/W en funció del contingut de polímer 0.5%, 1%, 2% i 4% de PLGA en la fase oliosa. S'observa com la regió de formació de les nano-emulsions augmenta lleugerament amb el contingut de polímer.

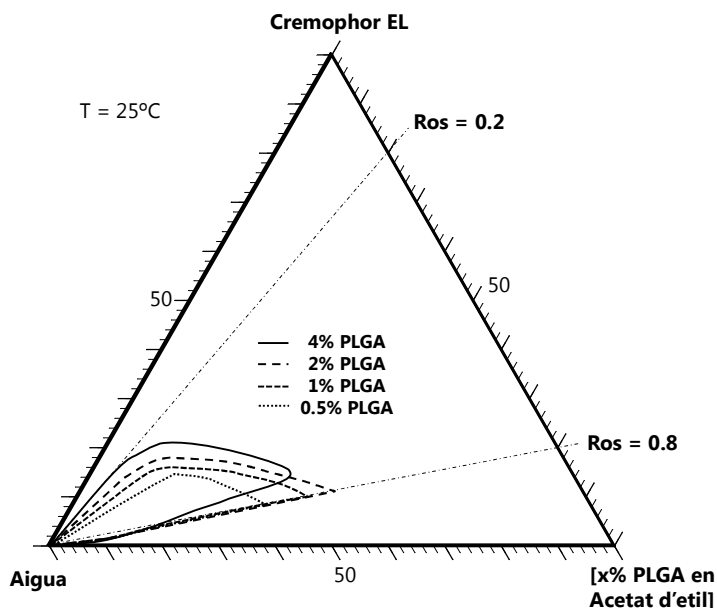


Figura 4.51. Regió de formació de les nano-emulsions O/W pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) en funció del contingut de polímer (PLGA) $x=0.5\%$, 1% , 2% , 4% PLGA en acetat d'etil, $T=25^{\circ}\text{C}$.

La Taula 4.31 mostra el mínim contingut d'aigua i el rang de relació Ros en el que es formen les nano-emulsions per a cada concentració de PLGA. Així, al augmentar el contingut de polímer en acetat d'etil augmenta el rang de relacions Ros en el que es formen les nano-emulsions.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Taula 4.31. Interval de formació de les nano-emulsions O/W pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil), a 25°C, en funció del contingut de polímer (PLGA) en la fase oliosa.

| % PLGA | Interval de formació de les nano-emulsions | |
|--------|--|-----------|
| | % aigua | Ros |
| 0.5 | > 60 % | 0.5 - 0.8 |
| 1 | > 50 % | 0.4 - 0.8 |
| 2 | > 45 % | 0.3 - 0.8 |
| 4 | > 50 % | 0.2 - 0.7 |

La observació per microscopia electrònica (Figura 4.52) de la nano-emulsió formulada en el sistema aigua/CremophorEL/[4%PLGA en acetat d'etil] amb una relació Ros 0.6 i 90% d'aigua va corroborar la formació de gotes amb un radi promig de 50 ± 12 nm, inferior al determinat per DLS (75 nm). Això és deu a que el radi determinat per DLS fa referència al radi hidrodinàmic, és a dir, al radi de la gota més l'aigua solvatada, mentre que el radi determinat per microscopia electrònica propociona valor únicament del radi de la gota.

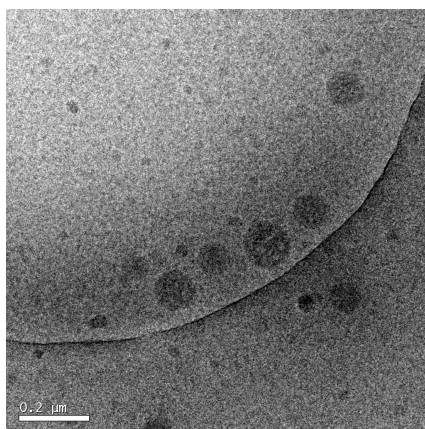


Figura 4.52. Imatge obtinguda per microscopia electrònica "Cryo-TEM" de les gotes de la nano-emulsió obtinguda del sistema aigua/CremophorEL/[4%PLGA en acetat d'etil] amb una relació Ros=0.6 i 90% aigua.

Els diagrames de fases mostrats a la Figura 4.50 indiquen que durant la formació de la nano-emulsió O/W a temperatura constant a partir de mesclures d'oli i tensioactiu es produeix inversió de fases. Es confirma d'aquesta manera la formació de nano-emulsions tipus O/W pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) a diferents concentracions de polímer, per addició d'aigua a temperatura constant i amb inversió de fase (mètode de baixa energia PIC).

A nivell visual es va observar que per una determinada relació Ros la transparència de les nano-emulsions augmentava amb el contingut d'aigua independentment del contingut de polímer, indicant així una disminució de la mida de gota. Així mateix es va observar

que per una determinada relació Ros i contingut d'aigua la transparència de les nano-emulsions disminuïa al augmentar el contingut de polímer, indicant així un augment de la mida de gota de les nano-emulsions amb el contingut de polímer. Aquestes observacions estan en concordança amb les determinacions realitzades mitjançant la tècnica de dispersió dinàmica de llum làser (DLS) de la mida de gota de les nano-emulsions (Figura 4.53, Taula 4.32). Per a les tres relacions Ros estudiades el radi hidrodinàmic de les nano-emulsions augmenta amb el contingut de polímer. Així mateix la mida de gota de les nano-emulsions augmenta lleugerament amb la relació Ros per a cada concentració de PLGA estudiada. Les nano-emulsions presenten uns valors de índex de polidispersitat (PDI) en el rang 0.3-0.6 (Taula 4.32).

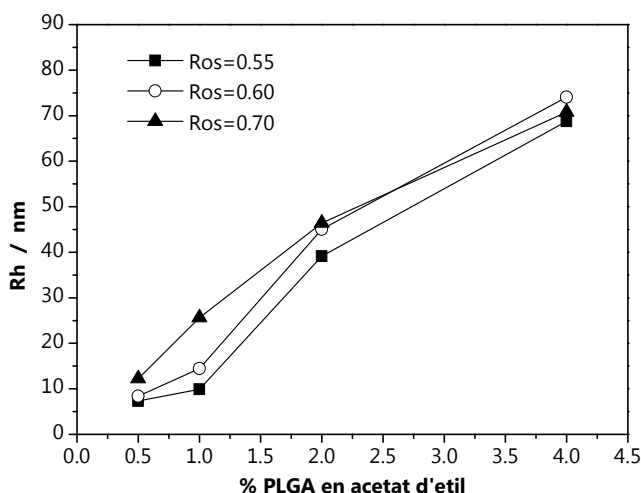


Figura 4.53. Mida de gota (Rh) determinada per la tècnica de DLS en funció del contingut de polímer (PLGA) a diferents relacions Ros de les nano-emulsions O/W obtingudes pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) amb 90% d'aigua i a 25°C.

Taula 4.32. Mida de gota (Rh) i índex de polidispersitat (PDI) determinat per DLS de les nano-emulsions O/W obtingudes pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) amb 90% d'aigua i a 25°C.

| %PLGA en acetat d'etil | Ros = 0.55 | | Ros = 0.60 | | Ros = 0.70 | |
|------------------------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI |
| 0.5% | 7.3 ± 0.18 | 0.30 | 8.4 ± 0.65 | 0.42 | 12.2 ± 0.27 | 0.51 |
| 1% | 9.9 ± 0.20 | 0.47 | 14.5 ± 0.31 | 0.58 | 25.6 ± 0.52 | 0.61 |
| 2% | 39.1 ± 1.36 | 0.57 | 45.1 ± 0.72 | 0.55 | 46.4 ± 0.33 | 0.52 |
| 4% | 68.8 ± 1.16 | 0.49 | 74.1 ± 1.59 | 0.40 | 70.8 ± 0.85 | 0.33 |

Cal destacar que en aquests sistemes s'han format nano-emulsions O/W amb una relació Ros més gran que en sistemes similars amb aplicació en el camp farmacèutic descrits a la literatura (**Sadurní, 2005**), (**Fornaguera, 2015**).

Es va seleccionar la dexametasona (DXM) com a principi actiu model per estudiar l'efecte de la concentració de PLGA en la seva encapsulació en nanopartícules polimèriques. Es va seleccionar la relació Ros 0.6 i 90% d'aigua per a la preparació de nano-emulsions i per estudis posteriors.

La DXM es va incorporar en la fase oliosa de les nano-emulsions segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.5. Després es van preparar nano-emulsions amb 0.18% de DXM en la fase oliosa amb una relació Ros 0.6, 90% d'aigua, i a diferents contingut de polímer pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) pel mètode per addició d'aigua segons el procediment descrit a l'apartat 3.3.3.1. A nivell visual les nano-emulsions tenien un aspecte transparent ó transparent/translúcid blavós depenent del contingut de polímer: a menor contingut de polímer més transparent és la mostra.

4.5.3. Formació de nanopartícules polimèriques

A continuació es van preparar les nanopartícules polimèriques a partir de les nano-emulsions pel mètode de l'evaporació del solvent descrit a l'apartat 3.3.4 representat esquemàticament a la Figura 4.54. És esperada l'obtenció de nanopartícules amb morfologia esfèrica degut a l'efecte plantilla de les nano-emulsions com està descrit a la literatura (**Anton, 2008**).

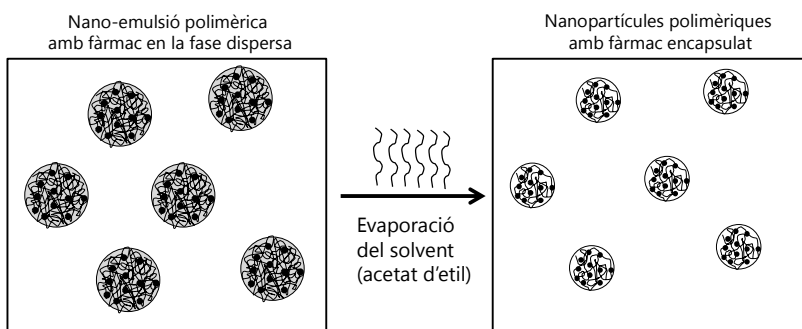


Figura 4.54. Representació esquemàtica de l'obtenció de nanopartícules polimèriques (nanoesferes) amb un fàrmac encapsulat, a partir de nano-emulsions polimèriques mitjançant l'evaporació del solvent.

La Figura 4.55 mostra una imatge per microscopia electrònica on es confirma la morfologia esfèrica de les nanopartícules polimèriques. El radi promig de les nanopartícules va ser de 25 ± 7 nm, menor, com era previst, que el determinat per la tècnica de DLS (55 ± 1 nm) (Taula 4.33).

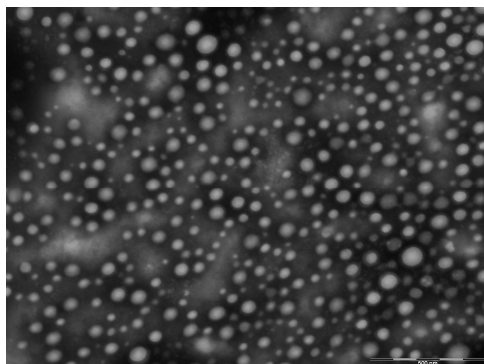


Figura 4.55. Imatge de les nanopartícules polimèriques observades per microscopia electrònica de transmissió (TEM) obtingudes per evaporació de l'acetat d'etil de les nano-emulsions en el sistema aigua/CremophorEL/(4%PLGA en acetat d'etil), Ros=0.6 i 90% aigua.

La mida de gota de les dispersions de nanopartícules determinada per DLS va ser inferior a la de les corresponents nano-emulsions utilitzades com a plantilla com a conseqüència de l'evaporació de solvent que forma la fase dispersa (Figura 4.56, Taula 4.33). Els índexs de polidispersitat (PDI) de les nanopartícules són similars als de les nano-emulsions. No obstant, les imatges obtingudes per microscopia electrònica mostren una distribució de partícules homogènia. Aquest fet indicaria que possiblement les nanopartícules s'agreguen en dispersió i en conseqüència la mida determinada per DLS proporcionaria valors superiors als determinats de la caracterització per microscopia electrònica.

Era previst que la reducció de la mida de gota de la dispersió de nanopartícules en relació a les nano-emulsions fos més gran al disminuir el contingut de polímer atès que la concentració d'acetat d'etil és més elevada. No obstant, els resultats indiquen el contrari. Això podria ser degut a que a concentracions més elevades de polímer la pressió que exerciria el contingut de la gota seria més gran i en conseqüència induiria una major evaporació de l'acetat d'etil.

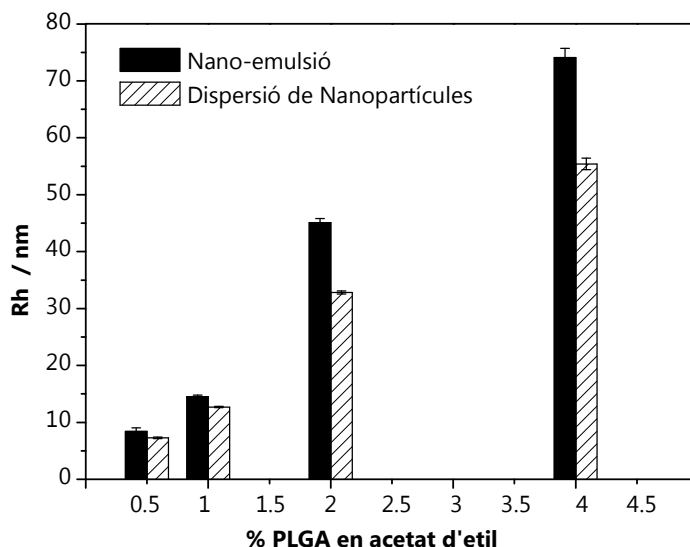


Figura 4.56. Radi hidrodinàmic (Rh) determinat per DLS en funció del contingut de polímer (PLGA) de nano-emulsions amb una relació Ros=0.6 i 90% aigua i de les dispersions de nanopartícules obtingudes per evaporació de l'acetat d'etil.

Taula 4.33. Mida de gota (Rh) i índex de polidispersitat (PDI) determinat per DLS de les nano-emulsions del sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) amb una relació Ros=0.6 i 90% aigua i de les dispersions de nanopartícules obtingudes per evaporació de l'acetat d'etil.

| %PLGA en acetat d'etil | Nano-emulsió | | Nanopartícules | |
|------------------------|--------------|------|----------------|------|
| | Rh (nm) | PDI | Rh (nm) | PDI |
| 0.5% | 8.4 ± 0.65 | 0.42 | 7.34 ± 0.13 | 0.35 |
| 1% | 14.5 ± 0.31 | 0.58 | 12.7 ± 0.13 | 0.57 |
| 2% | 45.1 ± 0.72 | 0.55 | 32.8 ± 0.27 | 0.57 |
| 4% | 74.1 ± 1.59 | 0.40 | 55.4 ± 1.02 | 0.40 |

A partir del radi hidrodinàmic de les nano-emulsions, determinat experimentalment, es va calcular el nombre de gotes de les nano-emulsions i considerant que cada gota de nano-emulsió serveix de plantilla per a la formació de la corresponent nanopartícula es va determinar el radi teòric de les nanopartícules. Els resultats es mostren a la Taula 4.34. El nombre de nanopartícules disminueix al augmentar el contingut de polímer en acetat d'etil, no obstant, aquestes són de mida més gran. La Figura 4.57 mostra de manera esquemàtica la variació de la mida i del nombre de partícules en funció del contingut de polímer en acetat d'etil.

Taula 4.34. Càlculs teòrics de varis paràmetres referents a les dispersions de nanopartícules.

| | %PLGA en acetat d'etil | | | |
|--------------------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | 0.5% | 1% | 2% | 4% |
| Nombre de gotes / mL (NE) | $8.4 \cdot 10^{16}$ | $1.6 \cdot 10^{16}$ | $5.4 \cdot 10^{14}$ | $3.1 \cdot 10^{13}$ |
| Nombre de partícules / mL (NP) | $8.4 \cdot 10^{16}$ | $1.6 \cdot 10^{16}$ | $5.4 \cdot 10^{14}$ | $3.1 \cdot 10^{13}$ |
| R teòric (NP) (nm) | 0.88 | 1.91 | 7.49 | 24.35 |
| Rh experimental (NP) (nm) | 7.3 | 12.7 | 32.8 | 55.4 |
| Rh experimental (NE) (nm) | 8.4 | 14.5 | 45.1 | 74.4 |

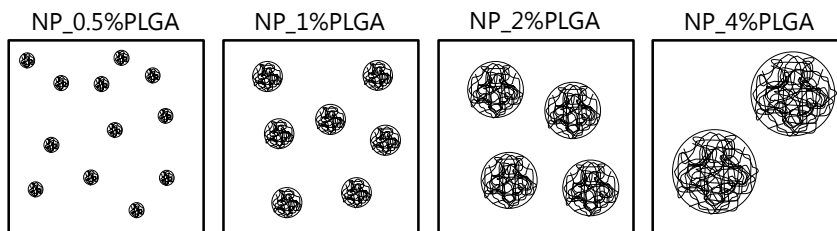


Figura 4.57. Representació esquemàtica de la variació de la mida i del nombre de nanopartícules (NP) en funció del contingut de polímer (PLGA).

Cal destacar que no es va observar variació en la mida de les nanopartícules determinada per DLS en les dispersions de nanopartícules obtingudes amb 4%PLGA en acetat d'etil, relació Ros=0.6 i 90% d'aigua formulades sense principi actiu (veure Taula 4.33) i amb principi actiu (Rh=54.04±0.4 nm). Aquest resultat ja ha estat descrit per altres autors (Zhang, 2006), (Gómez-Gaete, 2007).

4.5.4. Estabilitat de les nano-emulsions i de les dispersions de nanopartícules

Es va avaluar l'estabilitat de les nano-emulsions polimèriques així com de les corresponents dispersions de nanopartícules per les diferents concentracions de PLGA, sense i amb principi actiu (DXM), en funció del temps mitjançant la mesura de la intensitat de llum transmesa a través de la mostra a 25±3°C segons el procediment descrit a l'apartat 3.3.13. La Figura 4.58 mostra un exemple de gràfic dels resultats obtinguts en les mostres de nano-emulsió, dispersió de nanopartícules i dispersió de nanopartícules amb fàrmac encapsulat. En aquesta figura es representa el percentatge de variació de la transmitància en funció de l'alçada de la mostra per a diferents temps de mostra. En tots tres exemples s'observa la mateixa tendència. Els valors de transmitància per a cada temps es mantenen constants en tota l'alçada de la mostra, descartant així fenòmens de desestabilització per sedimentació i cremat. Així mateix, els valors de transmitància augmenten lleugerament amb el temps. Això podria ser degut al progressiu desplaçament de les gotes d'oli cap a la part superior de la mostra, no obstant això, s'ha de mencionar que aquesta variació és com a màxim del 5% durant 24h. La zona

delimitada per les línies discontinües fa referència a la mostra i es la que va ser integrada per tal d'obtenir la variació de la transmitància en funció del temps (Figura 4.59).

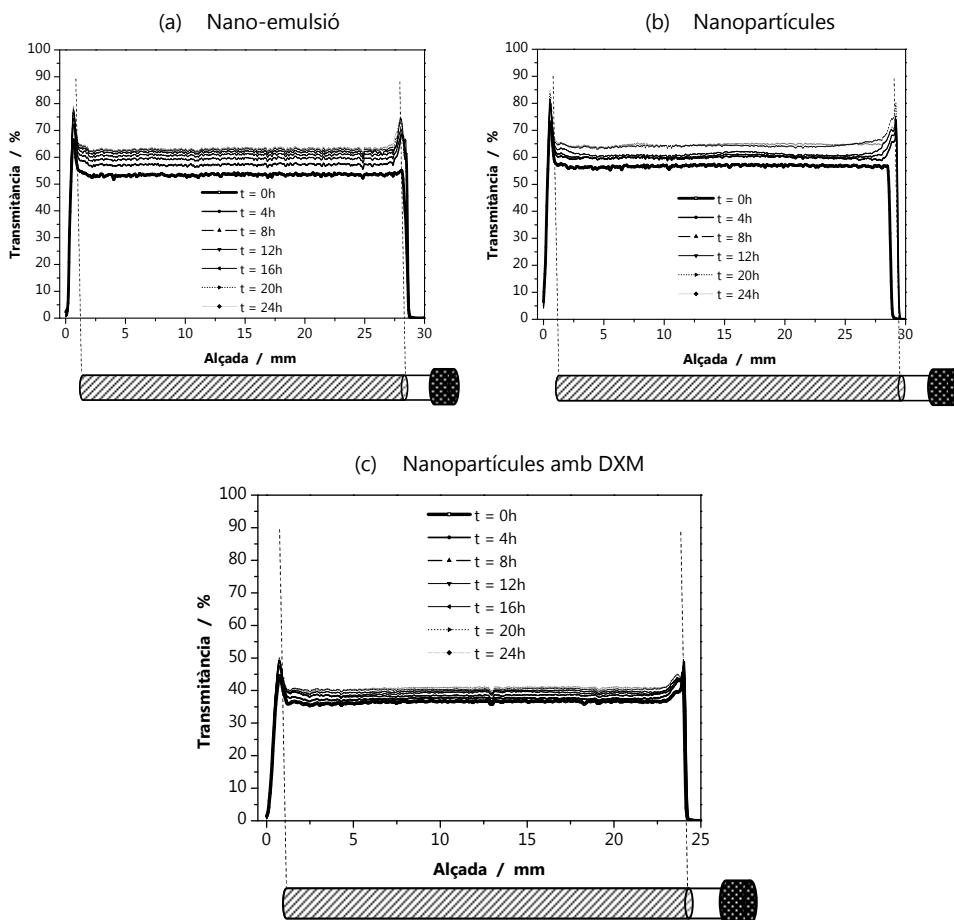


Figura 4.58. Variació de la transmitància en funció de l'alçada de la mostra a diferents temps de (a) nano-emulsió amb una relació Ros=0.6, 90% aigua, 4%PLGA en acetat d'etil, i de les corresponents (b) nanopartícules, i (c) nanopartícules amb fàrmac (DXM) encapsulat. (T=25±3°C).

La Figura 4.59 mostra la transmitància en funció del temps. La nano-emulsió i la dispersió de nanopartícules amb un major contingut de polímer (4%PLGA en acetat d'etil) són les que presenten uns valors de transmitància menors. La resta de nano-emulsions i dispersions de nanopartícules presenten valors de transmitància similars tot i que s'observa un lleuger augment de la transmitància al disminuir el contingut de polímer, tant en les nano-emulsions com en les dispersions de nanopartícules. Així mateix, independentment de la concentració de polímer en la fase dispersa el valor de transmitància és manté gairebé constant amb el temps durant com a mínim 24h.

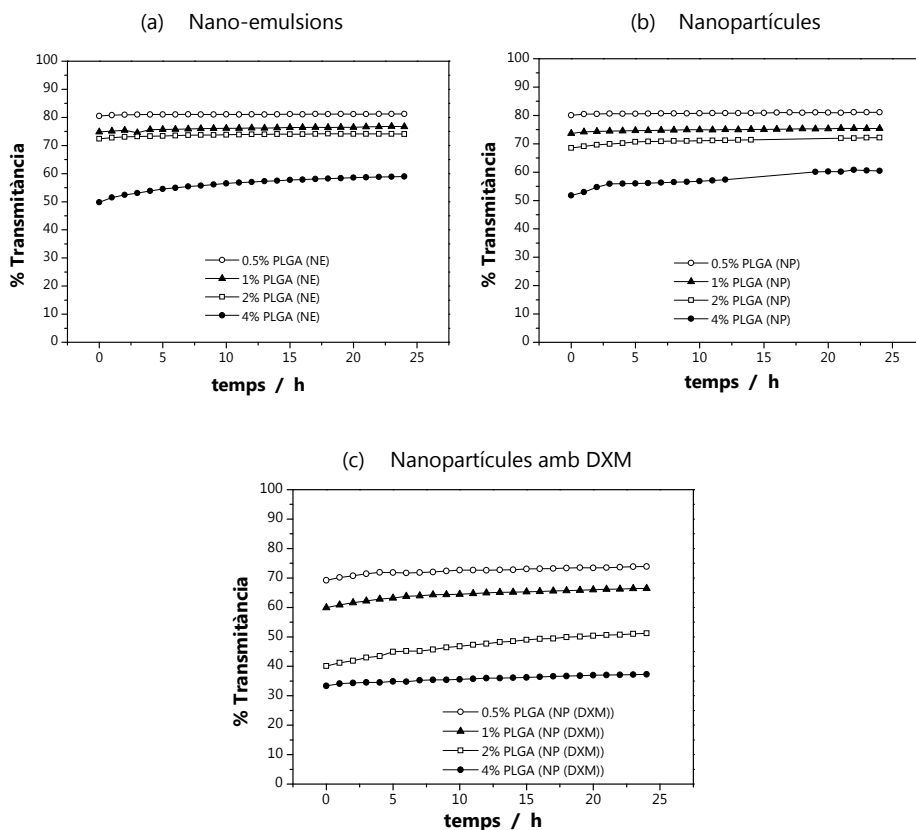


Figura 4.59. Variació de la transmittància en funció del temps per a diferents concentracions de polímer (PLGA) de les (a) nano-emulsions amb una relació Ros=0.6, 90% aigua, i de les corresponents (b) nanopartícules polimèriques, i (c) nanopartícules polimèriques amb DXM. (T=25±3°C).

Com era previst l'encapsulació d'un principi actiu (DXM) en les nanopartícules produeix una disminució de la transmittància respecte a les nanopartícules sense principi actiu (DXM) encapsulat. No obstant, les dispersions de nanopartícules amb principi actiu encapsulat també es mantenen pràcticament constants durant el temps estudiat de 24h.

4.5.5. Eficiència d'encapsulació

Es va estudiar la influència de la concentració de polímer (PLGA) en l'eficiència d'encapsulació de la dexametasona en la dispersió de nanopartícules d'acord amb el mètode indirecte de centrifugació-filtració, amb quantificació del principi actiu per HPLC, descrit a l'apartat 3.3.6. La Taula 4.35 mostra que l'eficiència d'encapsulació de la dexametasona en les nanopartícules polimèriques és independent de la concentració de polímer. S'han descrit resultats semblants a la literatura en sistemes similars en el que s'ha

utilitzat un tensioactiu semblant amb un HLB comparable (Fornaguera, 2015b). Les elevades eficiències d'emulsificació s'atribueixen al mètode de preparació de les nanopartícules. El principi actiu és incorporat en la fase oliosa abans de la formació de la nano-emulsió, d'aquesta manera quan es forma la nano-emulsió queda atrapat dins les gotes de polímer (PLGA) i solvent (acetat d'etil). Degut a la baixa solubilitat del principi actiu en aigua aquest roman dins la matriu polimèrica després de l'evaporació del solvent. D'aquesta manera la majoria del principi actiu queda encapsulat en les nanopartícules.

Uns altres paràmetres descrits són la càrrega de principi actiu "drug loading" (la quantitat de principi actiu per quantitat de polímer) i la concentració de principi actiu (la quantitat de principi actiu per quantitat de dispersió de nanopartícula). La concentració de principi actiu va ser la mateixa en totes les dispersions de nanopartícules preparades amb la finalitat de tenir la mateixa concentració terapèutica en totes les formulacions i així poder estimar l'efecte de la concentració de polímer. Tenint en compte això era d'esperar que la càrrega de principi actiu disminuís al augmentar el contingut de polímer.

Taula 4.35. Paràmetres d'encapsulació de la DXM en funció del contingut de polímer (%PLGA) en les nanopartícules polimèriques amb un contingut d'aigua del 90% i relació Ros=0.6.

| % PLGA | Eficiència d'encapsulació (%) | Càrrega principi actiu (mg DXM / g PLGA) | Concentració principi actiu (mg DXM / g disp. NP) |
|--------|-------------------------------|--|---|
| 0.5 | 89.3 ± 0.82 | 360 | 0.10 |
| 1 | 88.7 ± 0.04 | 180 | 0.10 |
| 2 | 90.1 ± 0.43 | 90 | 0.10 |
| 4 | 88.7 ± 0.24 | 45 | 0.10 |

4.5.6. Estudis d'alliberació *in vitro* d'un principi actiu desde la dispersió de nanopartícules a una solució receptora

Està documentat que les nanopartícules polimèriques formulades amb PLGA es poden biodegradar amb el temps com a conseqüència de la hidròlisi dels enllaços èsters que dona lloc a la formació de productes de degradació àcids, els àcids làctic i glicòlic, solubles en aigua, el que comporta una disminució del valor de pH en la dispersió de nanopartícules (Hussein, 2013). El fet que el polímer PLGA es degradi en àcids làctic i glicòlic garanteix la fàcil eliminació dels productes de degradació del cos humà mitjançant diferents mecanismes en els que són metabolitzats i eliminats com a diòxid de carboni i aigua. En el cas de l'àcid glicòlic també pot ser eliminat directament pels ronyons (Muthu, 2009).

Prèviament als assajos d'alliberació es va mesurar el pH en funció del temps de les dispersions de nanopartícules amb diferents concentracions de PLGA. Els resultats

mostrats a la Taula 4.36 van confirmar la no biodegradació de les partícules polimèriques com a mínim durant les primeres 50h. Així es va poder descartar un procés d'erosió de les nanopartícules durant el període de realització de l'assaig d'alliberació *in vitro* del principi actiu.

Taula 4.36. Valors de pH de les dispersions de nanopartícules en funció del temps.

| t (hores) | pH de la dispersió de nanopartícules | | | |
|-----------|--------------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| | NP_0.5%PLGA | NP_1%PLGA | NP_2%PLGA | NP_4%PLGA |
| 0 | 6.12 | 6.18 | 5.99 | 5.60 |
| 20 | 6.50 | 6.30 | 5.87 | 5.55 |
| 50 | 6.40 | 6.16 | 5.64 | 5.28 |

Un altre objectiu va ser el d'estudiar i modelitzar la difusió del principi actiu incorporat en les dispersions de nanopartícules polimèriques del tipus O/W. Els estudis de difusió es van realitzar utilitzant bosses de membranes de diàlisi i aigua milliQ com a solució receptora, d'acord amb el mètode descrit a l'apartat 3.3.7. Es va estudiar la difusió de la dexametasona (DXM) durant 30h a la temperatura constant de 25°C des d'una solució aquosa i desde dispersions de nanopartícules de tipus O/W a diferents concentracions de polímer (0.5%, 1%, 2% i 4% PLGA en acetat d'etil). Tots els experiments es van realitzar seguint condicions allunyades de la saturació (condicions "sink"). La quantificació del principi actiu es va realitzar segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.8.

A la Figura 4.60 es mostren les corbes d'alliberació de la dexametasona des de la dispersió de nanopartícules per a diferents continguts de polímer i des d'una solució aquosa amb el mateix contingut de principi actiu que en la dispersió de nanopartícules. Com era esperat, els resultats d'alliberació de la dexametasona des de les dispersions de nanopartícules mostren un perfil de cessió menor i sostingut que el perfil de cessió mostrat per la solució aquosa, ja que el principi actiu ha de difondre des de l'interior de la nanopartícula a la fase continua i posteriorment a la solució receptora (Figura 4.61b).

Els perfils d'alliberació del principi actiu des de la dispersió de nanopartícules semblen indicar que a temps infinit s'assoliria l'alliberació completa, el que significaria que no hi hauria interacció entre els diferents components presents. S'ha de destacar que en el cas de la solució aquosa no s'assoleix l'alliberació completa (100%) de la dexametasona. Això podria ser degut a la interacció de la DXM amb la membrana.

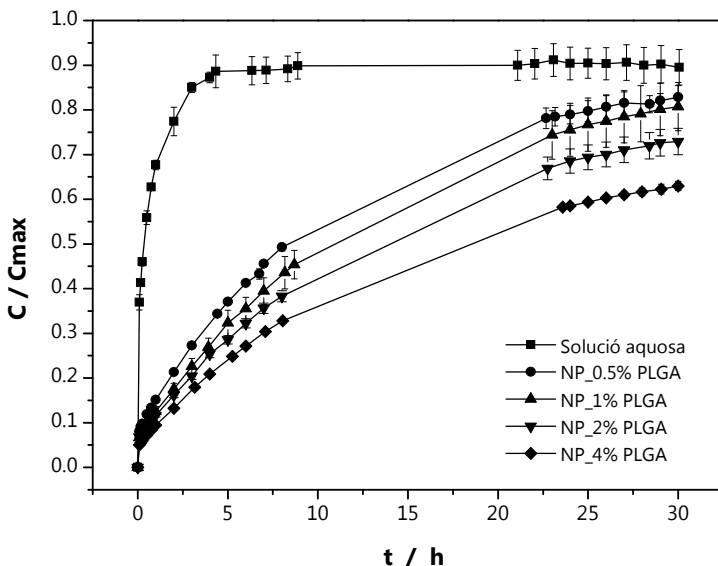


Figura 4.60. Corbes d'alliberació de la dexametasona des d'una solució aquosa i des de les dispersions de nanopartícules (NP) amb diferent contingut de polímer (PLGA) preparades a partir de nano-emulsions amb una relació Ros=0.6, 90% d'aigua i a 25°C, pel sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil). (Les línies contínues són una guia visual).

Totes les dispersions de nanopartícules assajades mostren el mateix perfil d'alliberació, no obstant, la dispersió de nanopartícules amb un major contingut de polímer (4%PLGA en acetat d'etil) és la que mostra un perfil d'alliberació més sostingut. S'ha de mencionar, com s'ha comentat prèviament, que la càrrega de principi actiu disminueix al augmentar el contingut de polímer (veure Taula 4.35) el que indicaria que el fàrmac es troba més repartit en les nanopartícules amb un 4%PLGA que en les de 0.5%PLGA. Així mateix, la mida de les nanopartícules augmenta amb el contingut de polímer, el que suggereix que el principi actiu ha de fer un recorregut major per sortir de la nanopartícula amb el 4%PLGA que amb la de 0.5%PLGA.

La Figura 4.61 mostra esquemàticament la difusió del principi actiu a través de la membrana de diàlisi quan aquest es troba en forma "lliure", és a dir, no encapsulat, o bé quan es troba encapsulat dins la nanopartícula polimèrica.

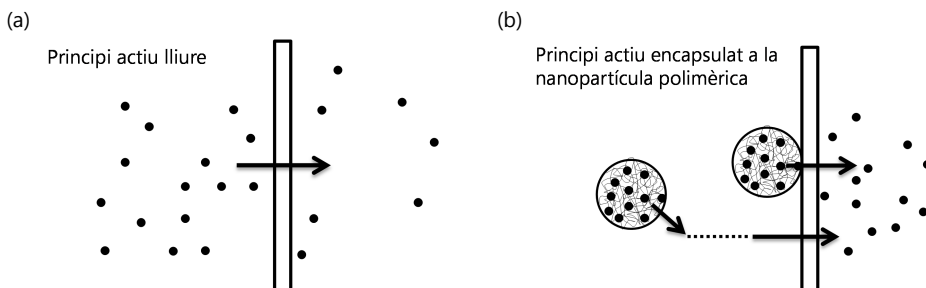


Figura 4.61. Representació esquemàtica de la difusió del principi actiu a través de la membrana de diàlisi quan (a) el principi actiu es troba "lliure", (b) el principi actiu es troba encapsulat dins la nanopartícula polimèrica. (Redibuixat i modificat de (Kumaresh, 2001)).

Els percentatges d'alliberació de la dexametasona desde la solució aquosa i des de les diferents dispersions de nanopartícules a 1h, 2h, 4h, 8h, 24h i 30h es mostren a la Taula 4.37. En cada un dels temps, el percentatge de principi actiu alliberat disminueix al augmentar la concentració de polímer de la nanopartícula.

Taula 4.37. Concentració de dexametasona (DXM) alliberada en funció del temps a 25°C des d'una solució aquosa i desde les dispersions de nanopartícules (NP_%PLGA).

| t (hores) | Concentració de DXM alliberada (%) | | | | |
|-----------|------------------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| | Solució aquosa | NP_0.5%PLGA | NP_1%PLGA | NP_2%PLGA | NP_4%PLGA |
| 1 | 67.7 % | 15.0 % | 12.4 % | 11.6 % | 9.4 % |
| 2 | 77.4 % | 21.3 % | 17.3 % | 16.2 % | 13.2 % |
| 4 | 87.2 % | 34.3 % | 26.5 % | 25.4 % | 20.9 % |
| 8 | 89.2 % | 49.3 % | 42.7 % | 38.3 % | 32.8 % |
| 24 | 90.4 % | 78.9 % | 73.4 % | 68.6 % | 58.5 % |
| 30 | 89.5 % | 82.8 % | 79.0 % | 72.9 % | 63.0 % |

Tenint en compte, com s'ha descrit anteriorment, que les dispersions de nanopartícules mostren eficiències d'encapsulació (Taula 4.35) similars independentment de la concentració de polímer, els estudis d'alliberació indicarien que el principi actiu romandria més temps encapsulat en les nanopartícules amb un major contingut de polímer, possiblement degut a la major càrrega de principi actiu "drug loading" que tenen les nanopartícules amb un menor contingut de polímer el que faria que el polímer no pogués retenir tota la quantitat de principi actiu. Aquests resultats han posat de manifest que el contingut de polímer en la dispersió de nanopartícules permet modular la difusió de la dexametasona des de la dispersió de nanopartícules.

- Ajust dels perfils d'alliberació a models matemàtics

Amb la finalitat de conèixer el mecanisme pel qual el principi actiu s'allibera de la dispersió de nanopartícules a la solució receptora es van ajustar els punts experimentals dels perfils d'alliberació als models matemàtics de Higuchi, Baker-Lonsdale, i Korsmeyer-Peppas (Taulas 4.38-4.41, Figura 4.62). Es va provar d'ajustar a cinètiques d'Ordre Cero i Ordre 1 però els resultats no es mostren ja que les dades experimentals no s'ajustaven.

Tots els punts experimentals del perfil d'alliberació s'ajusten a cada un dels models. Les Taula 4.38-4.40 mostren les equacions obtingudes dels ajustos amb els corresponents coeficients de determinació ajustats ($R_{ajustat}^2$) per tal de poder predir el model que descriu millor el perfil d'alliberació de la dexametasona des de la nanopartícula. S'ha de tenir en compte que el coeficient de determinació (R^2) tendeix a augmentar si el model presenta més paràmetres (Costa, 2001). Així quan es comparen models matemàtics amb diferents nombre de paràmetres és més significatiu utilitzar el coeficient de determinació ajustat ($R_{ajustat}^2$) que es calcula mitjançant la següent expressió:

$$R_{ajustat}^2 = 1 - \frac{(n-1)}{(n-p)}(1 - R^2) \quad (\text{Equació 4.1})$$

on n és el nombre de punts de la corba d'alliberació i p és el nombre de paràmetres del model. D'aquesta manera el millor model és aquell que presenta un valor més elevat del coeficient de determinació ajustat, $R_{ajustat}^2$.

Tots els models presenten valors de $R_{ajustat}^2$ elevats, superiors a 0.9400. No obstant, el model d'Higuchi és el que proporciona un millor ajust en les quatre corbes d'alliberació del principi actiu des de les nanopartícules amb valors superiors a 0.9980. S'han descrit resultats semblants en l'alliberació d'un principi actiu a partir de nanopartícules polimèriques preparades amb PLGA de diferents pesos moleculars (Mittal, 2007). Així, el mecanisme pel qual el principi actiu s'allibera és per difusió a través de la matriu de polímer que forma la nanopartícula. Així mateix el bon ajust al model de Baker-Lonsdale indicaria que la matriu de polímer presenta forma esfèrica, com era esperat, tenint en compte la utilització de nano-emulsions com a plantilla per a la formació de les nanopartícules polimèriques.

Taula 4.38. Ajust del perfil d'alliberació de la DXM de la dispersió de nanopartícules (NP: **4%PLGA**) a models matemàtics (R^2 ajustat: coeficient de determinació ajustat).

| Model matemàtic | Equació | R^2 ajustat |
|------------------|--|---------------|
| Higuchi | $Q = 11.62 t^{1/2}$ | 0.9985 |
| Baker-Lonsdale | $f = 0.0033 t$ | 0.9967 |
| Korsmeyer-Peppas | $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.1135 t^{0.44}$ | 0.9539 |

Taula 4.39. Ajust del perfil d'alliberació de la DXM de la dispersió de nanopartícules (NP: **2%PLGA**) a models matemàtics (R^2 ajustat: coeficient de determinació ajustat).

| Model matemàtic | Equació | R^2 ajustat |
|------------------|--|---------------|
| Higuchi | $Q = 13.58 t^{1/2}$ | 0.9987 |
| Baker-Lonsdale | $f = 0.0049 t$ | 0.9963 |
| Korsmeyer-Peppas | $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.1416 t^{0.41}$ | 0.9437 |

Taula 4.40. Ajust del perfil d'alliberació de la DXM de la dispersió de nanopartícules (NP: **1%PLGA**) a models matemàtics (R^2 ajustat: coeficient de determinació ajustat).

| Model matemàtic | Equació | R^2 ajustat |
|------------------|--|---------------|
| Higuchi | $Q = 15.02 t^{1/2}$ | 0.9987 |
| Baker-Lonsdale | $f = 0.0064 t$ | 0.9951 |
| Korsmeyer-Peppas | $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.1511 t^{0.44}$ | 0.9561 |

Taula 4.41. Ajust del perfil d'alliberació de la DXM de la dispersió de nanopartícules (NP: **0.5%PLGA**) a models matemàtics (R^2 ajustat: coeficient de determinació ajustat).

| Model matemàtic | Equació | R^2 ajustat |
|------------------|--|---------------|
| Higuchi | $Q = 15.88 t^{1/2}$ | 0.9982 |
| Baker-Lonsdale | $f = 0.0072 t$ | 0.9971 |
| Korsmeyer-Peppas | $\frac{M_t}{M_\infty} = 0.1807 t^{0.43}$ | 0.9626 |

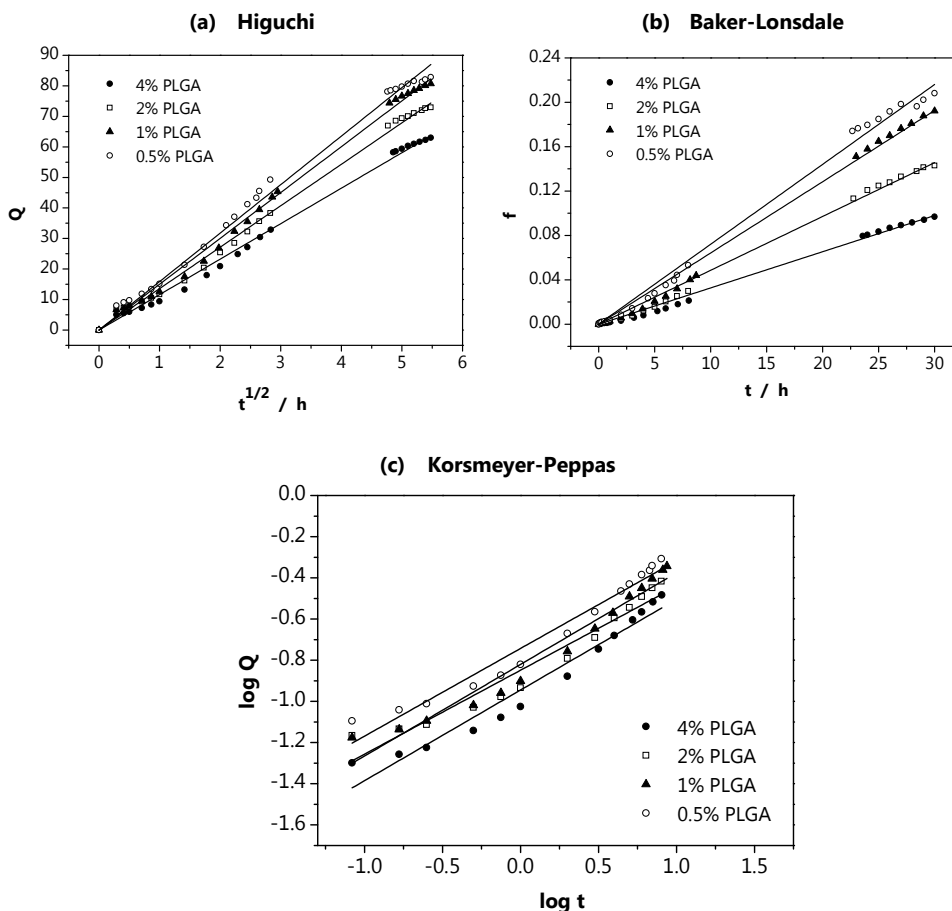


Figura 4.62. Ajustos de les corbes d'alliberació als models matemàtics de (a) Higuchi, on Q és el percentatge de principi actiu alliberat, (b) Baker-Lonsdale, on $f = (3/2)[1-(1-MT/M\infty)^{2/3}]-(MT/M\infty)$ (c) Korsmeier-Peppas. (Els símbols representen els punts experimentals).

A partir dels ajustos s'han determinat els paràmetres cinètics dels diferents models matemàtics (Taules 4.42-4.44). S'ha de mencionar que en l'ajust de les corbes d'alliberació al model de Korsmeier-Peppas s'ha considerat nomès la zona de la corba amb una fracció de principi actiu alliberat inferior a 0.6 per tal de determinar l'exponent difusional n (Costa, 2001).

Els valors de n determinats presenten valors de 0.41-0.44, molt propers a 0.5, aquest resultat confirmaria que el mecanisme de transport del principi actiu és per difusió de Fick, és a dir, al haver-hi un gradient de concentració del principi actiu aquest difondrà de la regió de major concentració a la regió de menor concentració per tal d'uniformitzar la concentració del principi actiu en la solució (Crank, 1975).

Aquests resultats estan en concordança amb resultats descrits a la literatura en els que posen de manifest que els perfils d'alliberació a partir de matrius polimèriques de principis actius altament lipòfils, com és el cas de la dexametasona, estan principalment influenciats pel mecanisme de difusió (**Arifin, 2006**).

Taula 4.42. Constant de dissolució (K_H) de **Higuchi** en funció del %PLGA.

| Concentració PLGA | K_H ($h^{1/2}$) |
|-------------------|---------------------|
| 0.5% | 15.88 |
| 1% | 15.02 |
| 2% | 11.70 |
| 4% | 11.62 |

Taula 4.43. Constant d'alliberació (k) del model de **Baker-Lonsdale** en funció del %PLGA.

| Concentració PLGA | k (h^{-1}) |
|-------------------|------------------|
| 0.5% | 0.0072 |
| 1% | 0.0064 |
| 2% | 0.0033 |
| 4% | 0.0033 |

Taula 4.44. Exponent difusional (n) i constant cinètica (k) del model de **Korsmeyer-Peppas** en funció del %PLGA.

| Concentració PLGA | n | k (h^{-n}) |
|-------------------|------|------------------|
| 0.5% | 0.42 | 0.1807 |
| 1% | 0.44 | 0.1511 |
| 2% | 0.41 | 0.1238 |
| 4% | 0.44 | 0.1135 |

La Figura 4.63 mostra l'ajust dels perfils d'alliberació teòrics als perfils d'alliberació experimentals.

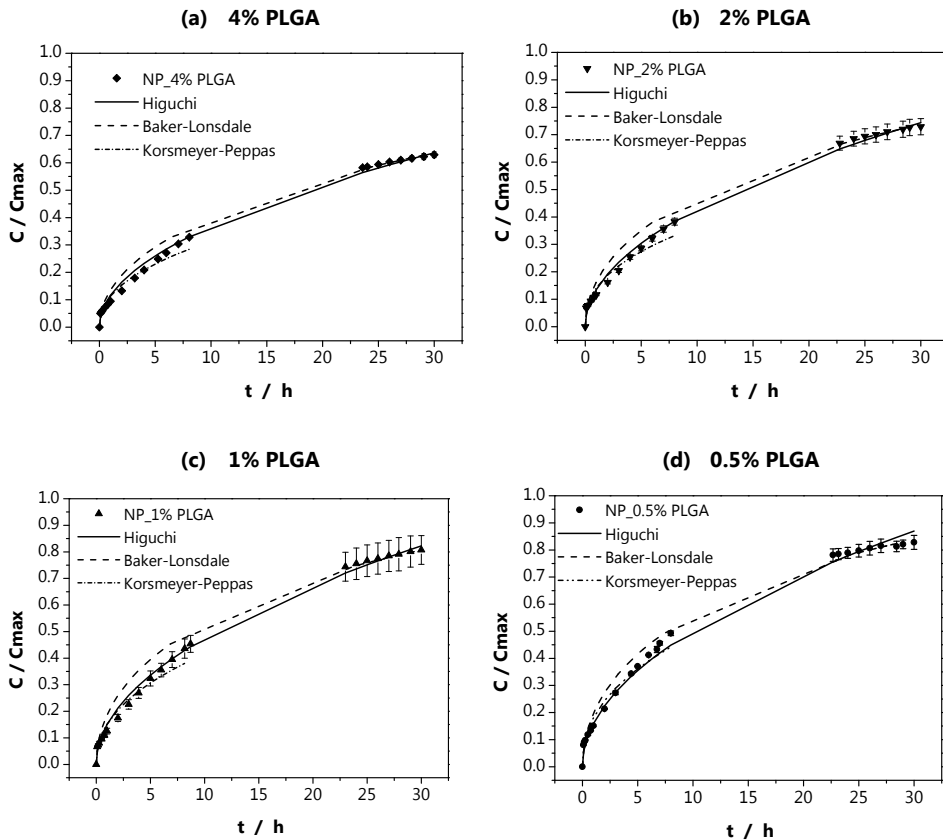


Figura 4.63. Ajustos dels perfil d'alliberació teòrics als perfils d'alliberació experimentals de la DXM present a les dispersions de nanopartícules a una solució receptora, en funció del contingut de PLGA: (a) 4% PLGA, (b) 2% PLGA, (c) 1% PLGA, (d) 0.5% PLGA. (Els símbols indiquen els resultats experimentals).

- **Estimació de l'eficiència d'alliberació**

Un paràmetre important en la caracterització d'un perfil d'alliberació és l'eficiència de d'alliberació (Khan&Rhodes, 1972) ja que és una manera ràpida de comparar entre perfils d'alliberació d'un gran nombre de formulacions i a més és un paràmetre que es pot relacionar amb dades *in vivo* (Khan, 1975), (Costa, 2001). Es defineix com l'àrea sota la corba d'alliberació (Figura 4.64) fins a un determinat temps, t , expressat com el percentatge de l'àrea descrit per una alliberació del 100% en el mateix temps:

$$\text{Eficiència d'alliberació} = \frac{\int_0^t y \cdot dt}{y_{100} \cdot t} \cdot 100\% \quad (\text{Equació 4.2})$$

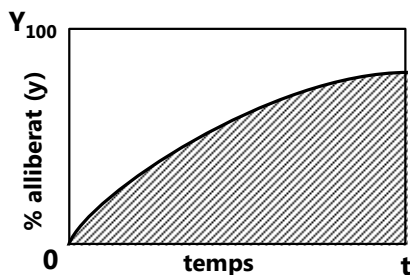


Figura 4.64. Alliberació d'un principi actiu des d'una forma farmacèutica (Redibuixat i adaptat de (Khan, 1975)).

Les eficiències d'alliberació, determinades a 2h, 4h, 8h, 24h i 30h, es van calcular mitjançant el mètode numèric d'integració dels trapezis (Anderson, 1998). Tal com es mostra a la Taula 4.45 l'eficiència d'alliberació del principi actiu augmenta amb el contingut de polímer.

Taula 4.45. Eficiències d'alliberació de la dexametasona des de les dispersions de les nanopartícules polimèriques determinades a partir de les corbes d'alliberació.

| Concentració PLGA | Eficiències d'alliberació | | | | |
|----------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 2h | 4h | 8h | 24h | 30h |
| 0.5% | 15% | 22% | 29% | 52% | 58% |
| 1% | 12% | 17% | 27% | 48% | 55% |
| 2% | 10% | 14% | 21% | 38% | 43% |
| 4% | 9% | 13% | 20% | 37% | 42% |

4.5.7. Assajos de citotoxicitat *in vitro* de les nanopartícules polimèriques

La determinació de la citotoxicitat de les nanopartícules es de gran interès per tal de poder saber si són aptes per aplicacions biomèdiques. Existeixen diferents tipus d'assajos per determinar la citotoxicitat (Riss, 2011), no obstant, el més ampliament utilitzat és el mètode colorimètric MTT, que és el que es va realitzar en el present treball. Es va estudiar la citotoxicitat *in vitro* de les partícules polimèriques amb i sense principi actiu encapsulat segons el mètode descrit a l'apartat 3.3.9. Els assajos es van realitzar en cèl·lules HeLa i es van determinar els percentatges de viabilitat cel·lular després de la incubació amb dispersions de nanopartícules amb una concentració de PLGA de 0.03 i 0.24 mg·mL⁻¹ (0.5% i 4% PLGA en acetat d'etil, respectivament) amb i sense fàrmac encapsulat. Els resultats es mostren a la Figura 4.65 i la Taula 4.46. Les dispersions de nanopartícules presenten una viabilitat superior al 70%. Aquests resultats estan en concordança amb estudis en els que han formulat nanopartícules de PLGA amb dexametasona encapsulada en sistemes similars (Fornaguera, 2015b). No es detecten diferències significatives en el

RESULTATS I DISCUSSIÓ

percentatge de viabilitat de les cèl·lules HeLa entre nanopartícules amb o sense principi actiu encapsulat, el que indicaria que el principi actiu no presentaria efecte citotòxic. Per tant, la citotoxicitat de les nanopartícules polimèriques preparades seria deguda només al tensioactiu utilitzat ja que la resta de components utilitzats són biocompatibles. Una manera de pal·liar això seria rentar les nanopartícules de tensioactiu, malgrat que això implicaria una etapa addicional i en conseqüència un major cost econòmic. Una altra manera seria preparar les nanopartícules amb un major contingut d'aigua i una relació Ros més elevada per tal de reduir la quantitat de tensioactiu. Observant la regió de formació de les nano-emulsions per aquest sistema (Figura 4.51) això es podria dur a terme.

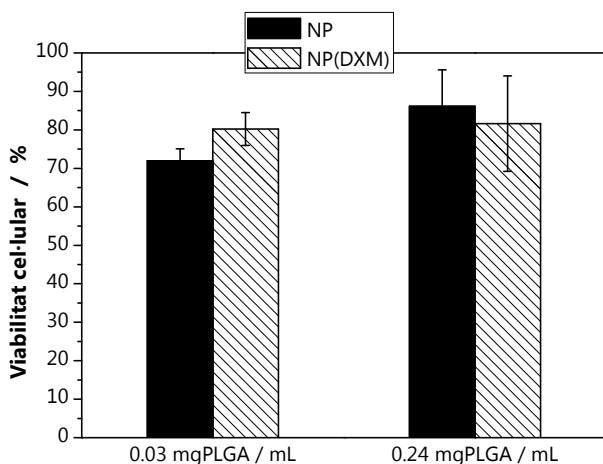


Figura 4.65. Percentatge de viabilitat de les cèl·lules HeLa després de la incubació amb dispersions de nanopartícules sense principi actiu (NP) i amb principi actiu (NP(DXM)) en funció del contingut de polímer (PLGA).

Taula 4.46. Percentatge de viabilitat de les cèl·lules HeLa en les dispersions de nanopartícules sense principi actiu (NP) i amb principi actiu (NP(DXM)) en funció del contingut de polímer.

| Mostra | 0.03 mgPLGA / mL | 0.24 mgPLGA / mL |
|----------|------------------|------------------|
| NP | 72.0 ± 3.10 | 86.1 ± 9.50 |
| NP (DXM) | 80.2 ± 4.28 | 81.6 ± 12.42 |

Conclusions d'aquest apartat

- Es van formar nano-emulsions polimèriques amb inversió de fase (confirmada per l'estudi del comportament fàsic) per addició d'aigua a temperatura constant (mètode PIC) amb el sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) amb diferents continguts de polímer PLGA en acetat d'etil.
- La regió de formació de les nano-emulsions augmenta lleugerament amb el contingut de polímer en acetat d'etil. La mida de gota també augmenta amb el contingut de polímer.
- Es van formar nanopartícules polimèriques amb diferents concentracions de polímer, sense i amb principi actiu encapsulat utilitzant nano-emulsions com a plantilla.
- La transparència de les nano-emulsions i de les dispersions de nanopartícules amb i sense fàrmac disminueix al augmentar el contingut de polímer.
- La mida de les nanopartícules polimèriques sense principi actiu augmenta amb el contingut de polímer.
- EL nombre de partícules per mL de dispersió disminueix al augmentar el contingut de polímer.
- El percentatge d'encapsulació no varia amb el contingut de polímer.
- L'alliberació del fàrmac a partir de les dispersions de nanopartícules és més sostingut que a partir de la solució aquosa, i l'eficiència d'alliberació del principi actiu disminueix al augmentar el contingut de polímer.
- El mecanisme pel qual el fàrmac s'allibera de la nanopartícula es per difusió de Fick.
- La citotoxicitat de les nanopartícules amb i sense fàrmac és deguda al tensioactiu. Es podria disminuir la concentració de tensioactiu augmentant la relació Ros.

Aquest treball d'investigació mostra per primera vegada l'efecte del contingut del polímer (PLGA) en la formació i de nano-emulsions polimèriques i en dispersions de nanopartícules obtingudes emprant les nano-emulsions com a plantilla. Els resultats obtinguts d'alliberació i citotoxicitat juntament amb la mida indiquen que aquestes nanopartícules polimèriques podrien ser d'interès per aplicacions biomèdiques.

Capítol 5

Conclusions

En la present tesi s'ha estudiat la formació de nano-emulsions O/W en sistemes aigua/tensioactiu no iònic/component oliós per mètodes de baixa energia a temperatura constant. Així mateix s'ha estudiat la formació de nanopartícules polimèriques utilitzant nano-emulsions com a plantilla. Els resultats obtinguts han permès arribar a les següents conclusions:

Comportament fàsic de sistemes aigua/tensioactiu/component oliós i caracterització de fases de microemulsió

- Les temperatures d'inversió de fases calculades a partir dels coeficients de difusió en funció de la temperatura mitjançant la tècnica de Ressonància Magnètica Nuclear (DOSY 1H NMR) han estat similars a les calculades a partir dels perfils del conductivitat en funció de la temperatura.
- L'estudi del comportament fàsic ha permès detectar fases de microemulsió O/W properes però lleugerament inferiors a les temperatures d'inversió de fases en el sistema aigua/Brij30/hexadecà per a relacions oli-aigua ($R_{ow}=0.2$) i per a relacions oli-tensioactiu ($R_{os}=0.63-0.70$). En aquest sistema s'han identificat microemulsions isòtropes i birefringents al moviment.
- La caracterització d'aquestes microemulsions per la tècnica de Ressonància Magnètica Nuclear (DOSY 1H NMR) i per la tècnica de dispersió dinàmica i estàtica de la llum làser (DLS i SLS) no han permès detectar diferències en els coeficients de difusió, mides i formes de les gotes entre microemulsions isòtropes i les birefringents al moviment.
- La caracterització de les microemulsions per la tècnica de dispersió estàtica de llum làser (SLS) han evidenciat geometria esfèrica de les gotes de microemulsió.

Formació de nano-emulsions per addició d'un segon tensioactiu a microemulsions O/W

- S'han format nano-emulsions O/W sense inversió de fases a temperatura constant per un procediment descrit per primera vegada que consisteix en l'addició d'un segon tensioactiu més hidròfil que indueix un augment de la curvatura del film interfacial que forma les gotes de microemulsió el que provoca una desestabilització del sistema i en conseqüència la formació de nano-emulsions.
- Les nano-emulsions s'han preparat amb l'addició mínima del segon tensioactiu i amb varis tipus de tensioactius. En el sistema aigua/Brij30/hexadecà l'addició de 1-3% de tensioactiu a microemulsions O/W amb un 85% d'aigua a 24°C ha permès formar nano-emulsions amb un de radi hidrodinàmic de 20 nm.

CONCLUSIONS

- Les mides de gota de les nano-emulsions obtingudes han estat semblants a les mides de gota de les microemulsions inicials, excepte amb l'addició del tensioactiu pur C₁₂E₅ en que les mides de gota han estat menors.
- Els índexs de polidispersitat de les nano-emulsions obtingudes han estat inferiors que el de la microemulsió inicial, excepte amb l'addició del tensioactiu iònic SDS probablement degut a interacció entre les gotes.

Formació de nano-emulsions per addició d'aigua

- L'estudi de la formació de nano-emulsions O/W en sistemes aigua/tensioactiu no iònic/component oliós per addició d'aigua a mesclures binàries i ternàries ha permès identificar les fases que determinen les propietats i característiques de les nano-emulsions.
- En sistemes amb tensioactius no iònics etoxilats/propoxietilenats i component oliosos no polars (esqualà, parafina líquida) i semi polars (miristat d'isopropil) s'han format nano-emulsions O/W amb un contingut d'aigua superior al 85%, per a relacions Ros en el rang 0.3-0.7 a la temperatura de 25°C amb uns valors de radi hidrodinàmic de 25-40nm.
- En aquests sistemes el mètode òptim per obtenir les nano-emulsions ha estat l'addició d'aigua en una única addició. Les nano-emulsions d'aquests sistemes es desestabilitzen en minuts i el fenomen de desestabilització predominant és per maduració d'Ostwald.
- Per a la formació de nano-emulsions és necessari que durant l'emulsificació es formin fases de microemulsió directa /inversa i/o fases de cristall líquid laminar.
- S'ha posat de manifest que la formació de nano-emulsions O/W per addició d'aigua es produeix mitjançant tres possibles mecanismes: a) Inversió de fase seguit de dilució de microemulsió O/W, b) Inversió de fase, c) Dilució de microemulsió O/W.

Formació de nano-emulsions polimèriques

- S'han obtingut nano-emulsions polimèriques en el sistema aigua/CremophorEL/(PLGA en acetat d'etil) amb un contingut d'aigua des del 45% fins a concentracions superiors al 90% i en un ampli rang de relacions oli-tensioactiu (Ros=0.2-0.8) en funció del contingut de polímer.
- Les nano-emulsions s'han format per addició d'aigua a composicions binàries tensioactiu/component oliós i s'ha comprovat que el mecanisme de formació es per inversió de fases (PIC)
- Les nano-emulsions obtingudes presenten uns valors de radi hidrodinàmic en el rang de 7-75 nm i amb uns índexs de polidispersitat de 0.3-0.6, per relacions oli-

tensioactiu ($Ros=0.55-0.70$).

- La regió de formació de les nano-emulsions augmenta lleugerament amb el contingut de polímer en acetat d'etil. La mida de gota també augmenta amb el contingut de polímer.

Formació de nanopartícules polimèriques utilitzant nano-emulsions com a plantilla

- S'han preparat nanopartícules polimèriques sense i amb principi actiu encapsulat utilitzant nano-emulsions O/W com a plantilla mitjançant el mètode de l'evaporació de solvent a la temperatura de 25°C
- El radi hidrodinàmic de les dispersions de nanopartícules polimèriques sense principi actiu encapsulat augmenta amb el contingut de polímer i es troba en el rang de 7-55nm.
- L'encapsulació del principi actiu produeix una disminució de la transparència de les dispersions de nanopartícules però no modifica la mida de les nanopartícules.
- Els percentatges d'encapsulació del principi actiu és elevat, al voltant del 90%, i no varia amb el contingut de polímer.
- L'alliberació del principi actiu de les dispersions de nanopartícules a una solució receptora a la temperatura de 25°C és més sostinguda que a partir de la solució aquosa, i l'eficiència d'alliberació del principi actiu és més lenta al augmentar la concentració de polímer.
- L'ajust dels perfils d'alliberació a tres models matemàtics (Higuchi, Baker-Lonsdale, Korsmeyer-Peppas) ha permès confirmar que el mecanisme pel qual el principi actiu s'allibera de la dispersió de nanopartícules és per difusió de Fick.
- Les dispersions de nanopartícules amb una concentració de PLGA de 0.03 i 0.24 mg·mL⁻¹ (0.5% i 4% PLGA en acetat d'etil, respectivament) presenten una viabilitat superior al 70%.
- Les nanopartícules polimèriques formulades amb un polímer biocompatible i biodegradable i amb un solvent de baixa toxicitat preparades a partir de nano-emulsions poden ser d'interès per aplicacions biomèdiques.

Capítol 6

Bibliografia

A

- Alayoubi, A.Y.; Anderson, J.F.; Satyanarayanajois, S.D.; Sylvester, P.W.; Nazzal, S., **2013**. Concurrent delivery of tocotrienols and simvastatin by lipid nanoemulsions potentiates their antitumor activity against human mammary adenocarcinoma cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 385–392.
- Anderson, N.H.; Bauer, M.; Boussac, N.; Khan-malek, R.; Munden, P.; Sardaro, M., **1998**. An evaluation of fit factors and dissolution efficiency for the comparison of in vitro dissolution profiles. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17, 811–822.
- Antalek, B., **2002**. Using pulsed gradient spin echo NMR for chemical mixture analysis: How to obtain optimum results. *Concepts Magn. Reson. Part A Bridg. Educ. Res.* 14, 225–258.
- Anton, N.; Benoit, J.-P.; Saulnier, P., **2008**. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J. Control. Release* 128, 185–199.
- Anton, N.; Vandamme, T.F., **2009**. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int. J. Pharm.* 377, 142–147.
- Anton, N.; Vandamme, T., **2011**. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. *Pharm. Res.* 28, 978–985.
- Arifin, D.Y.; Lee, L.Y.; Wang, C.H., **2006**. Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58, 1274–1325.
- Ash, M. and I. (Ed.), **2004**. Handbook of Green Chemicals, Second. ed. Synapse Information Resources, Inc.
- Aubery, C.; Solans, C.; Sanchez-dominguez, M., **2011**. Tuning High Aqueous Phase Uptake in Nonionic Water-in-Oil Microemulsions for the Synthesis of Mn-Zn Ferrite Nanoparticles: Phase Behavior, Characterization, and Nanoparticle Synthesis. *Langmuir* 27, 14005–14013.

B

- Becher, P., **1972**. Emulsiones: teoría y práctica, Blumeor. ed.
- Benita, S.; Levy, M.Y., **1993**. Submicron Emulsions as Colloidal Drug Carriers for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. *J. Pharm. Sci.* 82, 1069–1079.
- Bhatt, P.; Madhav, S., **2011**. A DETAILED REVIEW ON NANOEMULSION DRUG DELIVERY SYSTEM. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2, 2482–2489.
- Binks, B.P., **1998**. Modern Aspects of Emulsion Science.

BIBLIOGRAFIA

- Botet, R., **2012**. The "ouzo effect", recent developments and application to therapeutic drug carrying. *J. Phys. Conf. Ser.* 352, 012047.
- Bouchemal, K.; Briançon, S.; Perrier, E.; Fessi, H., **2004**. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int. J. Pharm.* 280, 241–251.
- Bozeya, A.; Al-Bawab, A.; Friberg, S.E.; Miller, C.A., **2013**. Spontaneous Emulsification and Phase Equilibria in the System Water, Ethanol, and Benzene. *J. Dispers. Sci. Technol.* 34, 1429–1436.

C

- Calderó, G.; García-Celma, M.J.; Solans, C., **2011**. Formation of polymeric nano-emulsions by a low-energy method and their use for nanoparticle preparation. *J. Colloid Interface Sci.* 353, 406–411.
- Claridge, T., **2009**. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry, Second. ed. Elsevier.
- Costa, P.; Sousa, J.M., **2001**. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13, 123–133.
- Crank, J., **1975**. The mathematics of diffusion. Oxford University Press.

D, E

- Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Prétat, V., **2012**. PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications. *J. Control. Release* 161, 505–522.
- Danielsson, I.; Lindman, B., **1981**. The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces* 3, 391–392.
- Deminière, B.; Colin, A.; Leal Calderon, F.; Bibette, J., **1998**. Vieillessement par coalescence et durée de vie d'une émulsion concentrée. *Phys. Theor. Chem.* 163–165.
- Desgouilles, S.; Vauthier, C.; Bazile, D.; Vacus, J.; Grossiord, J.L.; Veillard, M.; Couvreur, P., **2003**. The Design of Nanoparticles Obtained by Solvent Evaporation: A Comprehensive Study. *Langmuir* 19, 9504–9510.
- Dissolution test for solid dosage forms, **2008**. . In: European Pharmacopoeia 6.0. pp. 266–275.
- El-Aasser, M.; Lack, C.; Choi, Y.; Min, T.; Vanderhoff, J.; Fowkes, F., **1984**. Interfacial Aspects of Miniemulsions and Miniemulsions Polymers. *Colloids and Surfaces* 12, 79–97.

F

- Fanun, M. (Ed.), **2009**. Microemulsions: properties and applications. *Surfactant Sci. Ser.* 144.
- FDA, **2012**. Guidance for Industry, ICH.
- Fernandez, P.; André, V.; Rieger, J.; Kühnle, A., **2004**. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 251, 53–58.
- Forgiarini, A.; Esquena, J.; González, C.; Solans, C., **2001**. Formation of Nano-emulsions by Low-energy Emulsification Methods at Constant Temperature. *Langmuir* 17, 2076–2083.
- Formulation, **2016a**. Turbiscan: The reference for stability analysis. *Formulation*.
- Formulation, **2016b**. Smart solutions for dispersions characterisation. *Formulation*.
- Fornaguera, C.; Dols-perez, A.; Calderó, G.; García-celma, M.J.; Camarasa, J.; Solans, C., **2015a**. PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood – brain barrier. *J. Control. Release* 211, 134–143.
- Fornaguera, C.; Llinàs, M.; Solans, C.; Calderó, G., **2015b**. Design and in vitro evaluation of biocompatible dexamethasone-loaded nanoparticle dispersions, obtained from nano-emulsions, for inhalatory therapy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 125, 58–64.
- Fraga, M.; Bruxel, F.; Lagranha, V.L.; Teixeira, H.F.; Matte, U., **2011**. Influence of phospholipid composition on cationic emulsions/DNA complexes: physicochemical properties, cytotoxicity, and transfection on Hep G2 cells. *Int. J. Nanomedicine* 6, 2213–2220.
- Frisken, B.J., **2001**. Revisiting the method of cumulants for the analysis of dynamic light-scattering data. *Appl. Opt.* 40, 4087–4091.

G

- Gaignaux, A.; Réeff, J.; Siepmann, F.; Siepmann, J.; De Vriese, C.; Goole, J.; Amighi, K., **2012**. Development and evaluation of sustained-release clonidine-loaded PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 437, 20–8.
- Gallarate, M.; Chirio, D.; Bussano, R.; Peira, E.; Battaglia, L.; Baratta, F.; Trotta, M., **2013**. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. *Int. J. Pharm.* 440, 126–134.
- Ganachoud, F.; Katz, J.L., **2005**. Nanoparticles and nanocapsules created using the Ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. *Chemphyschem* 6, 209–16.
- Gelderblom, H.; Verweij, J.; Nooter, K.; Sparreboom, A., **2001**. Cremophor EL: The

BIBLIOGRAFIA

- drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur. J. Cancer* 37, 1590–1598.
- Ghoulam, M. Ben; Moatadid, N.; Graciaa, A.; Lachaise, J., **2004**. Quantitative Effect of Nonionic Surfactant Partitioning on the Hydrophile - Lipophile Balance Temperature. *Langmuir* 20, 2584–2589.
- Gómez-Gaete, C.; Tsapis, N.; Besnard, M.; Bochot, A.; Fattal, E., **2007**. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 331, 153–159.
- Graciaa, A.; Lachaise, J.; Sayous, J.; Grenier, P.; Yiv, S.; Schechter, R.; Wade, W., **1983**. The partitioning of complex surfactant mixtures between oil/water/microemulsion phases at high surfactant concentrations. *J. Colloid Interface Sci.* 93, 474–486.
- Griffin, W.C., **1954**. Calculation of HLB values of non-ionic surfactants. *J. Soc. Cosmet. Chem.*
- Guinier, A., **1939**. La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann Phys* 12, 161–237.

H, I, J

- Heunemann, P.; Prevost, S.; Grillo, I.; Marino, C.M.; Meyer, J.; Gradzielski, M., **2011**. Formation and structure of slightly anionically charged nanoemulsions obtained by the phase inversion concentration (PIC) method. *Soft Matter* 7, 5697–5710.
- Higuchi, T., **1963**. Mechanism of Sustained- Action Medication. *J. Pharm. Sci.* 52, 1145–1149.
- Hussein, A.S.; Abdullah, N.; Ahmadun, F.-R., **2013**. In vitro degradation of poly (D, L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with linamarin. *IET Nanobiotechnology* 7, 33–41.
- Instruments, M., **2011**. Dynamic light scattering: Common terms defined. *Malvern Guid.* 1–6.
- Instruments, L.S., **2015**. LS Spectrometer User ' s Manual.
- Israelachvili, J.N.; Mitchell, D.J.; Ninham, B.W., **1976**. Theory of self-assembly of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2* 72, 1525.
- Izquierdo, P.; Esquena, J.; Tadros, T.F.; Dederen, C.; Garcia, M.J.; Azemar, N.; Solans, C., **2002**. Formation and Stability of Nano-emulsions Prepared Using the Phase Inversion Temperature Method. *Langmuir* 18, 26–30.
- Izquierdo, P.; Esquena, J.; Tadros, T.F.; Dederen, J.C.; Feng, J.; García-Celma, M.J.; Azemar, N.; Solans, C., **2004**. Phase Behavior and Nano-emulsion Formation by the Phase Inversion Temperature Method. *Langmuir* 20, 6594–6598.
- Johnson, C., **1999**. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles

and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34, 203–256.

Joscelyne, S.M.; Trägårdh, G., **2000**. Membrane emulsification — a literature review. *J. Memb. Sci.* 169, 107–117.

K

Kabalnov, A.; Wennerstrom, H., **1996**. Macroemulsions Stability: The oriented Wedge Theory Revisited. *Langmuir* 12, 276–292.

Kahlweit, M.; Strey, R.; Haase, D.; Kunieda, H.; Schmeling, T.; Faulhaber, B.; Borkovec, M.; Eicke, H.F.; Busse, G.; Eggers, F.; Funck, T.; Richmann, H.; Magid, L.; Soderman, O.; Stilbs, P.; Winkler, J.; Dittrich, A.; Jahn, W., **1987**. How to Study Microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 118, 436–453.

Katsumoto, Y.; Ushiki, H.; Graciaa, A.; Lachaise, J., **2000a**. Evolutionary Behavior of Miniemulsion Phases: I. Hard Sphere Interaction and Bound water on Miniemulsion Droplets. *J. Phys. Condens. Matter* 12, 249–264.

Katsumoto, Y.; Ushiki, H.; Mendibourne, B.; Graciaa, A.; Lachaise, J., **2000b**. Evolutionary behaviour of miniemulsion phases: II. Growth mechanism of miniemulsion droplets. *J. Phys. Condens Matter* 12, 3569–3583.

Khan, K. a, **1975**. The concept of dissolution efficiency. *J. Pharm. Pharmacol.* 27, 48–49.

Komaiko, J.S.; McClements, D.J., **2016**. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: a review of available methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 330–352.

Koppel, D.E., **1972**. Analysis of Macromolecular Polydispersity in Intensity Correlation Spectroscopy: The Method of Cumulants. *J. Chem. Phys.* 57, 4814–4820.

Koroleva, M.Y.; Yurtov, E. V., **2012**. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. *Russ. Chem. Rev.* 81, 21–43.

Korsmeyer, R.W.; Gurny, R.; Doelker, E.; Buri, P.; Peppas, N.A., **1983**. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int. J. Pharm.* 15, 25–35.

Kreuter, J., **2007**. Nanoparticles-a historical perspective. *Int. J. Pharmaceutics* 331, 1–10.

Kumaresh, S.S.; Tejjraj, M.A.; Anandrao, R.K.; Rudzinski, W.E., **2001**. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release* 70, 1–20.

Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C., **2010**. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 75, 1–18.

Kunieda, H.; Shinoda, K., **1982**. Phase Behavior in Systems of Nonionic Surfactant / Water / Oil around the Hydrophile - Lipophile - Balance - Temperature. *J. Dispers. Sci. Technol.* 3, 233–244.

Kunieda, H.; Ishikawa, N., **1985a**. Evaluation of the Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) of Nonionic Surfactants. II. Commercial-Surfactant Systems. *J. Colloid and Interface Sci.* 107, 122–128.

BIBLIOGRAFIA

- Kunieda, H.; Ishikawa, N., **1985b**. Evaluation of the Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) . II. Commercial-Surfactant Systems. *J. Colloid Interface Sci.* 107, 122–128.
- Kunieda, H.; Shinoda, K., **1985c**. Evaluation of the Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) of Nonionic Surfactants. I. Multisurfactant Systems. *J. Colloid Interface Sci.* 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.
- Kunz, D.; Thurn, A.; Burchard, W., **1983**. Dynamic light scattering from spherical particles. *Colloid Polym. Sci.* 261, 635–644.

L

- Lai, P.; Daear, W.; Löbenberg, R.; Prenner, E.J., **2014**. Overview of the preparation of organic polymeric nanoparticles for drug delivery based on gelatine, chitosan, poly (D, L-lactide-co-glycolic acid) and polyalkylcyanoacrylate. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 118, 154–163.
- Landreau, E.; Aguni, Y.; Hamaide, T.; Chevalier, Y., **2009**. Preparation of nanoemulsion by spontaneous emulsification and stabilization with poly(caprolactone)-b-poly(ethylene oxide) block copolymers. In: *Emulsion Sci. Technol.* Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 191–207.
- Li, X.; Anton, N.; Zuber, G.; Zhao, M.; Messaddeq, N.; Hallouard, F.; Fessi, H.; Vandamme, T.F., **2013**. Iodinated α -tocopherol nano-emulsions as non-toxic contrast agents for preclinical X-ray imaging. *Biomaterials* 34, 481–491.
- Libster, D.; Aserin, a; Garti, N., **2006**. A novel dispersion method comprising a nucleating agent solubilized in a microemulsion, in polymeric matrix II. Microemulsion characterization. *J. Colloid Interface Sci.* 302, 322–9.
- Lifshitz, I.M.; Slyozov, V.V., **1961**. The kinetics of precipitation from supersaturated solid solutions. *J. Phys. Chem. Solids* 19, 35–50.
- Lindman, B.; Stilbs, P.; Moseley, M.E., **1981**. Fourier transform nmr self-diffusion and microemulsion structure. *J. Colloid Interface Sci.* 83, 569–582.
- Liu, H.; Wang, Y.; Lang, Y.; Yao, H.; Dong, Y.; Li, S., **2009**. Bicontinuous Cyclosporin A Loaded Water-AOT/Tween 85-Isopropylmyristate Microemulsion: Structural Characterization and Dermal Pharmacokinetics In Vivo. *J. Pharm. Sci.* 98, 1167–1176.

M

- Maali, A.; Hamed Mosavian, M.T., **2013**. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). *J. Dispers. Sci. Technol.* 34, 92–105.
- Maestro, A.; Solè, I.; González, C.; Solans, C.; Gutiérrez, J.M., **2008**. Influence of the phase

- behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. *J. Colloid Interface Sci.* 327, 433–439.
- Makadia, H.K.; Siegel, S.J., **2011**. Poly lactic-co-glicolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers (Basel)*. 3, 1377–1397.
- Márquez, N.; Graciaa, A.; Lachaise, J.; Salager, J., **2002**. Partitioning of Ethoxylated Alkylphenol Surfactants in Microemulsion - Oil - Water Systems: Influence of Physicochemical Formulation Variables. *Langmuir* 18, 6021–6024.
- Mason, T.G.; Wilking, J.N.; Meleson, K.; Chang, C.B.; Graves, S.M., **2006**. Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties. *J. Phys. Condens. Matter*.
- McClements, D.J., **2010**. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *Soft Matter* 7, 2297–2316.
- McClements, D.J., **2013**. Nanoemulsion-based oral delivery systems for lipophilic bioactive components: nutraceuticals and pharmaceuticals. *Ther. Deliv.* 4, 841–857.
- Mei, Z.; Liu, S.; Wang, L.; Jiang, J.; Xu, J.; Sun, D., **2011**. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method. *J. Colloid Interface Sci.* 361, 565–572.
- Meyer, T.; Waidelich, D.; Frahm, A., **2002**. Polyoxyethylene- Δ 9,11-didehydrostearate and glycerol-polyoxyethylene- Δ 9,11-didehydrostearate: Two new components of the non-ionic emulsifier Cremophor® EL. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30, 263–271.
- Miller, C.A., **1988**. Spontaneous Emulsification Produced by Diffusion - A Review. *Colloids and Surfaces* 29, 89–102.
- Mittal, G.; Sahana, D.K.; Bhardwaj, V.; Ravi Kumar, M.N. V, **2007**. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J. Control. Release* 119, 77–85.
- Morales, D.; Gutiérrez, J.M.; García-Celma, M.J.; Solans, C., **2003**. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. *Langmuir* 19, 7196–7200.
- Morales, D.; Solans, C.; Gutiérrez, J.M.; Garcia-Celma, M.J.; Olsson, U., **2006**. Oil/Water Droplet Formation by Temperature Change in the Water/C16E6/Mineral Oil System. *Langmuir* 22, 3014–3020.
- Muthu, M., **2009**. Nanoparticles based on PLGA and its co-polymer: An overview. *Asian J. Pharm.* 3, 266.

N, O, P

- Nakajima, H.; Tomomasa, S.; Okabe, M., **1993**. Preparation of nanoemulsions. Recueil des résumés. Premier congrès mondial de l'emulsion, Paris. 1, 63.
- Nakajima, H., **1997**. Microemulsions in Cosmetics. In: Solans, C., Kunieda, H. (Eds.),

BIBLIOGRAFIA

- Surfactant Science Series. Marcel Dekker, New York, pp. 175–197.
- Noor El-Din, M.R.; Al-Sabagh, a. M., **2012**. Preparation of Water-in-Hexane Nanoemulsions Using Low Energy Emulsification Method. *J. Dispers. Sci. Technol.* 33, 68–74.
- Olsson, U.; Shinoda, K.; Lindman, B., **1986**. Change of the Structure of Microemulsions with Hydrophile-Lipophile balance of Nonionic Surfactant As Revealed by NMR Self-Diffusion Studies. *J. Phys. Chem.* 90, 4083–4088.
- Ontiveros, J.F.; Bouton, F.; Durand, M.; Pierlot, C.; Quellet, C.; Nardello-Rataj, V.; Aubry, J.-M., **2015**. Dramatic influence of fragrance alcohols and phenols on the phase inversion temperature of the Brij30/n-octane/water system. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 478, 54–61.
- Orthaber, D.; Bergmann, A.; Glatter, O., **2000**. SAXS experiments on absolute scale with Kratky systems using water as a secondary standard. *J. Appl. Crystallogr.* 33, 218–225.
- Pan, H.; Yu, L.; Xu, J.; Sun, D., **2014**. Preparation of highly stable concentrated W/O nanoemulsions by PIC method at elevated temperature. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 447, 97–102.
- Pecora, R., **2000**. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *J. Nanoparticle Res.* 2, 123–131.
- Petersen, S.; Kinawy, O.S. El; Helmdach, L.; Ulrich, J., **2012**. Parameter Selection of Emulsification Processes: Conditions for Nano- and Macroemulsions. *Chem. Eng. Technol.* 35, 1604–1608.
- Pons, T.; Uyeda, H.T.; Medintz, I.L.; Mattoussi, H., **2006**. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. *J. Phys. Chem. B* 110, 20308–20316.
- Price, W., **1997**. Pulsed-field gradient nuclear magnetic resonance as a tool for studying translational diffusion: Part 1. Basic theory. *Concepts Magn. Reson.* 299–336.
- Provencher, S., **1982a**. Contin: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations. *Comput. Phys. Commun.* 27, 229–242.
- Provencher, S., **1982b**. A constrained regularization method for inverting data represented by linear algebraic or integral equations. *Comput. Phys. Commun.* 27, 213–227.

R

- Rahbari, R.; Sheahan, T.; Modes, V.; Collier, P.; Macfarlane, C., **2009**. A novel L1 retrotransposon marker for HeLa cell line identification. *Biotechniques* 46, 277–284.
- Rao, J.; McClements, D.J., **2010**. Stabilization of Phase Inversion Temperature Nanoemulsions by Surfactant Displacement. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 7059–

7066.

- Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L., **2011**. Chapter 12: Citotoxicity Testing: Measuring Viable Cells, Dead Cells, and Detecting Mechanism of Cell Death. In: Stoddart, M.J. (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*. Springer Science, pp. 103–114.
- Roger, K.; Cabane, B.; Olsson, U., **2010**. Formation of 10-100 nm Size-Controlled Emulsions through a Sub-PIT Cycle. *Langmuir* 26, 3860–3867.
- Roger, K.; Cabane, B.; Olsson, U., **2011**. Emulsification through Surfactant Hydration: The PIC Process Revisited. *Langmuir* 27, 604–611.

S

- Sadurní, N.; Solans, C.; Azemar, N.; García-Celma, M.J., **2005**. Studies on the formation of O/W nano-emulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 438–445.
- Safety Assessment of Alkyl PEG/PPG Ethers as Used in Cosmetics, **2013**. . *Cosmet. Ingrid. Rev.*
- Schnablegger, H.; Singh, Y., **2013**. The SAXS guide. Anton Paar GmbH.
- Scriven, L.E., **1976**. Equilibrium bicontinuous structure. *Nature* 263, 125–126.
- Ševčíková, P.; Kašpárková, V.; Vltavská, P.; Krejčí, J., **2012**. On the preparation and characterization of nanoemulsions produced by phase inversion emulsification. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 410, 130–135.
- Shakeel, F.; Shafiq, S.; Haq, N.; Alanazi, F.K.; Alsarra, I.A., **2012**. Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *Expert Opin. Drug Deliv.*
- Sherer, W.; Syverton, J.T.; Gey, G.O., **1953**. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 97, 695–710.
- Shinoda, K.; Saito, H., **1968**. The Effect of Temperature on the Phase Equilibria and the Types of Dispersions of the Ternary System Composed of Water, Cyclohexane, and Nonionic Surfactant. *J. Colloid Interface Sci.* 26, 70–74.
- Shinoda, K.; Saito, H., **1969**. The Stability of O/W Type Emulsions as Functions of Temperature and the HLB of Emulsifiers: The Emulsification by PIT-method. *J. Colloid Interface Sci.* 30, 258–263.
- Shinoda, K.; Takeda, H., **1970**. The effect of added salts in water on the hydrophile-lipophile balance of nonionic surfactants: The effect of added salts on the phase inversion temperature of emulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 32, 642–646.
- Sitnikova, N.L.; Sprik, R.; Wegdam, G.; Eiser, E., **2005**. Spontaneously Formed trans - Anethol/Water/Alcohol Emulsions: Mechanism of Formation and Stability. *Langmuir* 21, 7083–7089.

BIBLIOGRAFIA

- Solans, C.; Pons, R.; Zhu, S.; Davis, H.T.; Evans, D.F.; Nakamura, K.; Kunieda, H., **1993**. Studies on Macro- and Microstructures. *Langmuir* 9, 1479–1482.
- Solans, C.; Kunieda, H., **1997**. Industrial Applications of Microemulsions. *Surfactant Sci. Ser.*
- Solans, C.; Esquena, J.; Forgiarini, A.; Usón, N.; Morales, D.; Izquierdo, P.; Azemar, N.; Celma, M.J.G., **2003**. Nano-emulsions: Formation, Properties, and Applications. In: Shah, D.O. (Ed.), Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution. Marcel Dekker, New York, pp. 525–554.
- Solans, C.; Izquierdo, P.; Nolla, J.; Azemar, N.; Garcia-Celma, M.J., **2005**. Nano-emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 10, 102–110.
- Solans, C.; Solé, I., **2012**. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17, 246–254.
- Solè, I.; Maestro, A.; Gonzalez, C.; Solans, C.; Gutiérrez, J.M., **2006**. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. *Langmuir* 22, 8326–8332.
- Solè, I.; Solans, C.; Maestro, A.; Gonzalez, C.; Gutierrez, J.M., **2012**. Nano-emulsions obtained by dilution of microemulsions. *J. Colloid Interface Sci.* 376, 133–139.
- Sonneville-Aubrun, O.; Simonnet, J.T.; L'Alloret, F., **2004**. Nanoemulsions: A new vehicle for skincare products. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109, 145–149.
- Sonneville-Aubrun, O.; Babayan, D.; Bordeaux, D.; Lindner, P.; Rata, G.; Cabane, B., **2009**. Phase transition pathways for the production of 100 nm oil-in-water emulsions. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 11, 101–110.
- Soppimath, K.S.; Aminabhavi, T.M.; Kulkarni, A.R., **2001**. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Control. release* 70, 1–20.
- Sul, H.Y.; Jung, J.Y.; Kang, Y.T., **2011**. Thermal conductivity enhancement of binary nanoemulsion (O/S) for absorption application. *Int. J. Heat Mass Transf.* 54, 1649–1653.
- Sun, H.; Liu, K.; Liu, W.; Wang, W.; Guo, C.; Tang, B.; Gu, J.; Zhang, J.; Li, H.; Mao, X.; Zou, Q.; Zeng, H., **2012**. Development and characterization of a novel nanoemulsion drug-delivery system for potential application in oral delivery of protein drugs. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5529–43.

T

- Tadros, T.F.; Vincent, B., **1983**. Encyclopedia of Emulsion Technology, Marcel Dek. ed.
- Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C., **2004**. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 108-109, 303–318.
- Tadros, T.F., **2013**. Emulsion Formation, Stability, and Rheology. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

- Taisne, L.; Cabane, B., **1998**. Emulsification and Ripening following a Temperature Quench. *Langmuir* 14, 4744–4752.
- Tal-Figiel, B.; Figiel, W., **2008**. Micro and Nanoemulsions in Cosmetic and Pharmaceutical Products. *J. Dispers. Sci. Technol.*
- Taylor, P.; Ottewill, R.H., **1994**. The Formation and Ageing Rates of Oil in Water Miniemulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 88, 303–316.

U, V, W, Y, Z

- Usón, N.; García, M.J.; Solans, C., **2004**. Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 250, 415–421.
- Vauthier, C.; Bouchemal, K., **2009**. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. *Pharm. Res.* 26, 1025–1058.
- Vitale, S.A.; Katz, J.L., **2003**. Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: "The ouzo effect." *Langmuir* 19, 4105–4110.
- Vold, R.L.; Waugh, J.S.; Klein, M.P.; Phelps, D.E., **1968**. Measurement of Spin Relaxation in Complex Systems. *J. Chem. Phys.* 48, 3831.
- Walstra, P., **1993**. Principles of emulsion formation. *Chem. Eng. Sci.* 48, 333–349.
- Wang, L.; Mutch, K.J.; Eastoe, J.; Heenan, R.K.; Dong, J., **2008**. Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process. *Langmuir* 24, 6092–6099.
- Winsor, P.A., **1948**. Hydrotrophy, solubilization and related emulsification processes. *Trans Faraday Soc* 44, 376–398.
- Wu, D.; Chen, A.; C, J., **1995**. An Improved Diffusion-Ordered Spectroscopy Experiment Incorporating Bipolar-Gradient Pulses. *J. Magn. Reson. Ser. A* 115, 260–264.
- Ye, Z.; Squillante, E., **2013**. The development and scale-up of biodegradable polymeric nanoparticles loaded with ibuprofen. *Colloids Surfaces, A Physicochem. Eng. Asp.* 422, 75–80.
- Yu, L.; Li, C.; Xu, J.; Hao, J.; Sun, D., **2012**. Highly Stable Concentrated Nanoemulsions by the Phase Inversion Composition Method at Elevated Temperature. *Langmuir* 28, 14547–14552.
- Zhang, Z.; Grijpma, D.W.; Feijen, J., **2006**. Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone. *J. Control. Release* 111, 263–270.

Capítol 7

Glossari

Abreviacions

| | |
|------------------------|---|
| ACN | Acetonitril |
| BPPSTE | “Bipolar pulse pair stimulated echo” |
| C12E5 | Penta etilenglicol mono-n-dodecil éter |
| CL | Cristall líquid |
| D₂O | Aigua deuterada |
| DLS | Dispersió dinàmica de la llum làser “dynamic light-scattering” |
| DMEM | Medi de cultiu Eagle modificat de Dulbecco |
| DMSO | Dimetil sulfòxid |
| DOSY | “Diffusion Ordered Spectroscopy” |
| DXM | Dexametasona |
| E.E. | Eficiència d’encapsulació |
| FBS | Suero fetal boví |
| HLB | Balanç hidròfil-lipòfil del tensioactiu |
| HPLC | Cromatògraf de líquids d’alta resolució “High-performance liquid chromatography” |
| INCI | Nomenclatura internacional d’ingredients cosmètics |
| MI | Miristat d’isopropil |
| MTT | bromur de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difiniltetrazoli |
| MWCO | Pes molecular límit “molecular weight cut-off” |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleòtid |
| N_{HLB} | Nombre del balanç hidròfil-lipòfil |
| NP | Nanopartícula o dispersió de nanopartícules |
| PDI | Índex de polidispersitat |
| PFGE | Seqüència de pulsos eco d’espí amb gradients “Pulsed-field gradient spin-echo” |
| PIC | Inversió de fases per canvi de composició “Phase Inversion Composition” |
| PL | Parafina líquida |

GLOSSARI

| | |
|----------------------|--|
| PLGA | Àcid (Poli(D,L-làctic-co-glicòlic) |
| R | Radi |
| R_g | Radi de gir |
| R_h | Radi hidrodinàmic |
| RMN | Ressonància Magnètica Nuclear |
| Ros | Relació oli/tensioactiu |
| Row | Relació oli/aigua |
| S.I. | Sistema Internacional |
| SAXS | Dispersió de raigs-X a angles petits "Small angle X-ray scattering" |
| SDS | Dodecil Sulfat de Sodi |
| SLS | Dispersió estàtica de la llum làser "static light-scattering" |
| SQ | Esqualà |
| U | Unitats |

Símbols romans

| | |
|--------------------------------------|--|
| (D/Do)_o | Coefficient de difusió relatiu de l'oli |
| (D/Do)_w | Coefficient de difusió relatiu de l'aigua |
| D_o^{aigua} | Coefficient de difusió de l'aigua pura |
| D_o^{oli} | Coefficient de difusió de l'oli pur |
| ¹H | Espectre de protó en RMN |
| B_o | Camp magnètic |
| D | Coefficient de difusió |
| D'₁ | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'oli |
| D'₂ | Fase líquida birrefringent al moviment amb curvatura preferencial de la pel·lícula interfacial del tensioactiu cap a l'aigua |
| D₁ | Fase líquida isòtropa de solucions micel·lars o microemulsions d'estructura O/W |
| D₂ | Fase líquida isòtropa i transparent de solucions micel·lars o microemulsions d'estructura W/O |

| | |
|-----------------------------|---|
| Do | Coefficient de difusió de l'oli a la mostra |
| Dw | Coefficient de difusió de l'aigua a la mostra |
| E | Òxid d'etilè |
| G | Gradient |
| h | hores |
| He-Ne | Heli-Neó |
| I | Intensitat de llum dispersada |
| Io, IG | Intensitat de la senyal en RMN |
| K | Graus Kelvin |
| k | Constant d'alliberació del model Baker-Lonsdale |
| k_B | Constant de Boltzmann |
| K_H | Constant de dissolució d'Higuchi |
| K_n | Cumulants |
| Lα | Cristall líquid laminar |
| M | Multifàsic |
| M∞ | Quantitat de principi actiu alliberat a temps infinit |
| m_a | Massa del component A |
| m_b | Massa del component B |
| M_{CL} | Multifàsic amb presència de cristall líquid |
| M_t | Quantitat de principi actiu alliberat un temps t determinat |
| n | Índex de refracció del medi |
| n | Exponent difusional del model de Korsmeyer-Peppas |
| N_{HLB} | Nombre HLB del tensioactiu |
| NP | Dispersió de Nanopartícules |
| NP(DXM) | Nanopartícules amb Dexametasona encapsulada |
| O | Oli |
| O/W | Estructura oli-aigua |
| P(q) | Factor de forma |

GLOSSARI

| | |
|------------------------------------|---|
| Pt | Platí |
| q | Vector de llum de dispersió |
| Q | Percentatge de principi actiu alliberat |
| R(θ) | Rayleigh ratio |
| R_{adj}² | Coefficient de determinació ajustat |
| R_{ab} | Fracció màssica |
| S | Tensioactiu |
| s | segons |
| S(q) | Factor d'estructura |
| t | Temps |
| T | Temperatura |
| T_{HLB} | Temperatura d'inversió de fases |
| W | Aigua |
| W/O | Estructura aigua-oli |

Símbols grecs

| | |
|------------|---|
| τ | Temps de retard "Lag time" |
| Γ | Velocitat de caiguda de la funció d'autocorrelació del camp elèctric "Decay rate" |
| λ | Longitud d'ona |
| θ | Angle de dispersió de la llum incident |
| η | Viscositat |
| δ | Duració dels gradients en RMN |
| Δ | Separació entre els gradients en RMN |
| γ | Constant de radi giromagnètic |
| σ_R | Variança promig |

