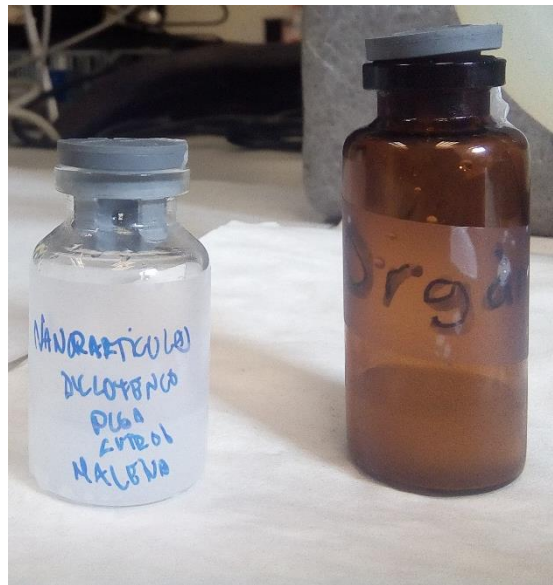


NANOPARTÍCULES BIODEGRADABLES PER AL TRACTAMENT DE LA INFLAMACIÓ OCULAR



Obsessionem

RESUM

“Nanopartícules pel tractament de la inflamació ocular” és el títol del meu treball de recerca. Vaig sentir molt atreta pel títol, perquè, per una banda, desconeixia la nanociència i la nanotecnologia i volia adquirir més coneixements sobre aquestes. Per altre banda, el meu camp d'interès principal en els estudis és la infermeria i el treball estava relacionat amb l'administració d'un medicament per tractar una afecció ocular.

Els objectius plantejats en aquest treball són diverses: en primer lloc, elaborar les nanopartícules de diclofenac per tal de verificar si la hipòtesi és certa o no. En segon lloc, conèixer les dues ciències. Per últim, comprovar el potencial de formulacions com a gotes oftàlmiques.

Els resultats del treball són les nanopartícules elaborades han complert els requisits (la mida, l'índex de polidispersió i el potencial zeta) i també foren esterilitzades. Aquestes després foren aplicades als ous fèrtils. De totes les proves de HET-CAM test han donat com poc irritant.

Després de realitzar totes les pràctiques, les conclusions són: en primer lloc, la meva hipòtesi és certa; he pogut sintetitzar unes nanopartícules amb fàrmac antiinflamatori, en aquest cas diclofenac, per tal de ser més fàcilment absorbible pel teixit ocular. Va ser possible incloure el diclofenac dins les nanopartícules tal com es veu en la pràctica realitzada d'elaboració de nanopartícules de diclofenac. No he pogut concloure si l'absorció del diclofenac és superior a la d'altres fàrmacs perquè no he pogut fer l'experimentació “in vivo” amb conills.

ABSTRACT

"Nanoparticles for the treatment of eye inflammation" is the title of my research. I was really attracted to the title because, on the one hand, I was ignorant of nanoscience and nanotechnology and wanted to gain more knowledge about them. On the other hand, my main field of interest in studies is nursing and the work was related to the administration of a drug to treat an eye condition.

The objectives set out in this work are diverse: first, to develop diclofenac nanoparticles in order to verify whether the hypothesis is true or not. Secondly, to know the two sciences. Lastly, check the potential of formulations like ophthalmic drops.

The results of the work are that the nanoparticles that have been made have met the requirements (size, polydispersion index and zeta potential) and were also sterilized. These were then applied to the fertile eggs. Of all the HET-CAM tests they have found to be little irritating.

After completing all the practices, the conclusions are: first, my assumption is true; I was able to synthesize nanoparticles with an anti-inflammatory drug, in this case diclofenac, in order to be more easily absorbed by the eye tissue. It was possible to include diclofenac inside the nanoparticles as seen in the practice of diclofenac nanoparticle preparation. I could not conclude if the absorption of diclofenac is higher than that of other drugs because I could not do the "in vivo" experiment with rabbits.

ÍNDIX

RESUM	2
ABSTRACT.....	3
0. INTRODUCCIÓ	1
PRIMERA PART: MARC TEÒRIC.....	2
1. LA NANOCIÈNCIA I LA NANOTECNOLOGIA	3
1.1 L'ORIGEN DE LA NANOTECNOLOGIA	3
1.2 TIPUS DE NANOPARTÍCULES	5
1.2.1 NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES DE PLGA	7
1.2.1.1 FORMACIÓ DEL PLGA.....	8
1.2.1.2 PROPIETATS FÍSICOQUÍMIQUES.....	8
2.EL PROCÉS INFLAMATORI	10
2.1 INFLAMACIÓ DE L'ULL.....	10
2.1.1 ESTRUCTURA DEL GLOBUS OCULAR	10
2.1.1.1 SEGMENT ANTERIOR.....	11
2.1.1.2 SEGMENT POSTERIOR.....	12
2.1.2 L'ULL VERMELL	13
2.1.3 APLICACIONS DE LES GOTES OFTÀLMIQUES.....	14
2.1.3.1 ESTERILITZACIÓ DE LES GOTES OFTÀLMIQUES	16
3. ELS FÀRMACS ANTIINFLAMATORIS	17
3.1 ANTIINFLAMATORIS ESTEROÏDALS.....	17
3.2 ANTIINFLAMATORIS NO ESTEROÏDALS (AINEs).....	17
3.2.1 MECANISME D'ACCIÓ	17
3.2.1 DICLOFENAC	18
3.2.1.1 MECANISME ACCIÓ	19
3.2.1.2 METABOLISME	19
3.2.1.3 EFECTES SECUNDARIS	19
SEGONA PART: MARC PRÀCTIC	21
4. PRÀCTIQUES REALITZADES.....	22
4.1 EXPERIMENT 1:POTENCIAL IRRITANT OCULAR.....	23
4.2 EXPERIMENT 2: ELABORACIÓ DE NANOPARTÍCULES	29
4.3 EXPERIMENT 3:CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA.....	34
4.3.1 MIDA PROMIG I ÍNDEX DE POLIDISPERSITAT (IP)	35
4.3.2 POTENCIAL ZETA	43
4.3.3 EFICIÈNCIA D'ASSOCIACIÓ.....	47
4.4 EXPERIMENT 4: ESTERILITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES	50
5. CONCLUSIONS.....	52

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES.....	53
7. AGRAÏMENTS	58
8. ANNEXES	59

0. INTRODUCCIÓ

En un principi m'havia plantejat fer un treball sobre els antibiòtics, però després em vaig apuntar al programa Forces UB, una plataforma on assignaven un treball de recerca i un tutor. Al començament, vaig fer una ullada, i de seguida em va cridar l'atenció el treball: "Nanopartícules biodegradables per al tractament de la inflamació ocular", pel títol es podia deduir que seria un treball molt interessant, i que aprendria moltíssimes coses de la nanociència que és una ciència molt innovadora i en ple desenvolupament. També em vaig sentir molt atreta pel tema ja que el meu camp d'interès principal en els estudis és la infermeria i el treball estava relacionat amb l'administració d'un medicament per tractar una afecció ocular. Vaig tenir la gran sort de ser seleccionada i em van assignar una tutora del treball.

El problema en que es basa el treball és que quan s'administren medicaments antiinflamatoris per a tractar inflamacions oculars per via oral no són tan eficaços com per la via ocular i provoquen trastorns digestius, així com també que la seva absorció és molt petita només un 5% del medicament administrat és absorbit degut a la dificultat per travessar les membranes cel·lulars cosa que es veu beneficiada si el medicament està dins de nanopartícules.

Se'ns genera una pregunta: Seria possible dissenyar un medicament que fós de més fàcil administració i absorció?

La hipòtesi seria: Potser podem dissenyar unes nanopartícules amb el medicament a dins per tal de produir unes gotes antiinflamatòries oftàlmiques d'efecte local amb un principi actiu més fàcilment absorbibles.

PRIMERA PART: MARC TEÒRIC

1. LA NANOCIÈNCIA I LA NANOTECNOLOGIA

La nanociència és una paraula composta per nano, que en llatí Nanus significa nan, i la paraula ciència. La nanociència estudia les propietats dels objectes i fenòmens a escala nanomètrica (1-100 nanòmetres).

La nanotecnologia és la tecnologia que té com a base el coneixement científic i es dedica al disseny i manipulació de la matèria a nivell atòmic o molecular. És dedica a l'elaboració de nous materials i dispositius amb una utilitat determinada per la societat [1].

1.1 L'ORIGEN DE LA NANOTECNOLOGIA

La nanotecnologia és una ciència molt moderna. Les bases de la nanotecnologia són el descobriment dels models atòmics (Fig 1) i de la mecànica quàntica

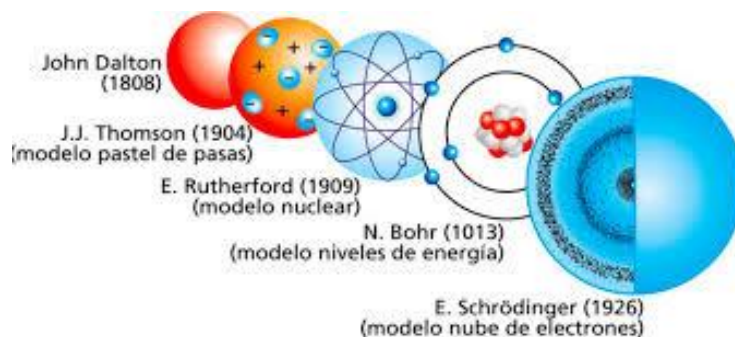


Figura 1. Models atòmics

Font: silviaarcas.fq Web: Blog de física i química

Tot va començar, quan Richard Feynman al 1959 (Fig 2), en un congrés de la societat americana de Física a Calltech, va pronunciar el discurs "*There 's Plenty of Room at the Bottom*" (Hi ha molt espai aquí a baix) en el qual descrivia un procés que permetria manipular àtoms i molècules de forma individual, mitjançant instruments de gran precisió i que no hi havia cap llei física que ho prohibís, tan sols era una qüestió de temps. Avui en dia, les seves prediccions s'ha vist que eren del tot certes.

Al 1981 l'Enginyer estatunidenc Eric Drexler (Fig 2) inspirat en el discurs de Feynman, publica a la revista "Proceedings of the National Academy of Sciences" l'article: "*Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation*" on descriu més en detall sobre el tema. El terme "nanotecnologia" va ser aplicat per primera vegada per Drexler a l'any 1986, en el seu llibre: "Motors de la creació: la propera era de la Nanotecnologia" en què descriu una màquina nanotecnològica amb capacitat d'autoreplicar, en aquest context va proposar el terme de "plaga grisa" per referir-se al que succeiria si un nanorobot autoreplicant fos alliberat a l'ambient. Tot i així, aquest mecanisme va ser criticat per el científic Ehrlich. Paul Ehrlich fou un bacteriòleg, científic alemany (Fig 2) nascut a Polònia que va obtenir el premi Nobel de Medicina al 1908, per les seves aportacions en la immunitat. Al 1878 [2]. Ell va crear la "bala màgica o salvarsán", (que podríem dir que va ser el precursor de les actuals nanopartícules), un preparat d'arsènic orgànic que va funcionar en el tractament de la sífilis i de la febre recurrent [3].

Tot i així es desconeixia aquesta ciència nanotecnològica i la primera persona que va fer arribar al gran públic el terme "nanotecnologia" fou el científic japonès Norio Taniguchi (Fig 2) a l'any 1974 en una conferència de la Societat Japonesa d'Enginyeria de Precisió on va presentar l'article "*On the Basic Concept of Nanotechnology*", en què defineix a la nanotecnologia com el processament, separació i manipulació de materials àtom per àtom o molècula per molècula.



Figura 2. a) Richard Feynman, b) Norio Taniguchi, c) Paul Ehrlich d) Eric Drexler,
Font: wikipedia

1.2 TIPUS DE NANOPARTÍCULES

Una nanopartícula és una partícula microscòpica amb una mida inferior a 100 nanòmetres (Fig 3) [4].

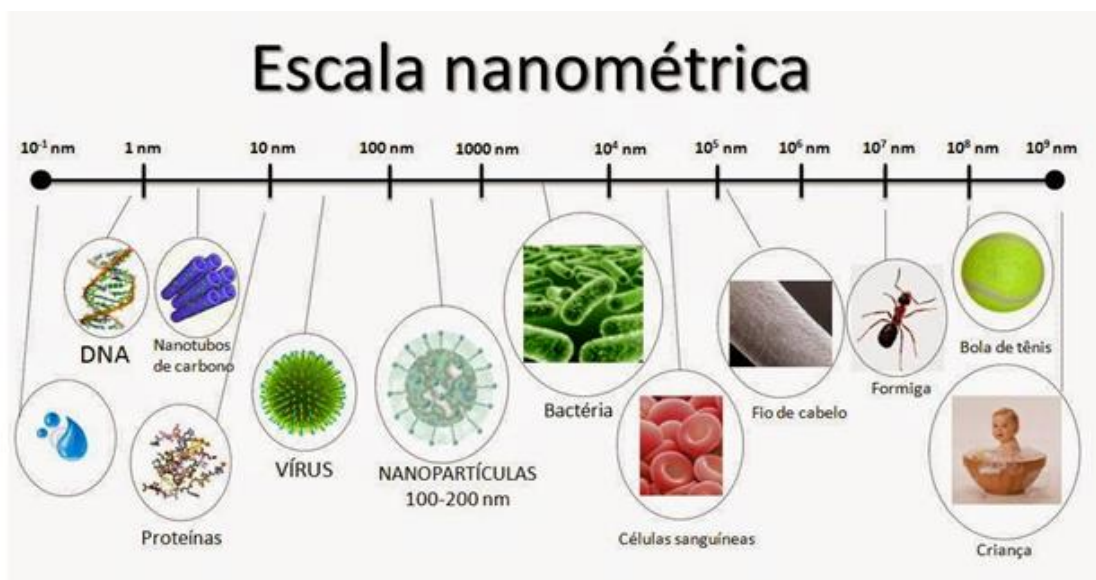


Figura 3. Escala nanomètrica

Font: Cándice Felippi. Web: Mate Natu

Segons les propietats físiques i químiques, la morfologia i la mida que presenten les nanopartícules, es poden classificar en:

- **Nanopartícules a base carbó:** formes esfèriques, el·lipsoïdals o tubulars. Constituïdes principalment per dos materials, el nanotub de carboni (CNT) que a la vegada es pot subdividir en nanotubs de carboni de paret simple (SWNT) o de paret múltiple (MWNT), i els ful·lerens. Presenten major resistència i baix pes moleculars, elàstics i bona conductivitat elèctrica.
- **Nanopartícules de ceràmica:** sòlids inorgànics formades per òxids, carburs, carbonats i fosfats. Alta capacitat a la calor.
- **Nanopartícules metàl·liques:** es preparen amb predecessors de metalls. Es poden sintetitzar de moltes maneres.
- **Nanopartícules semiconductores:** aquestes nanopartícules es formen amb metalls o no metalls. Ofereixen propietats electròniques, òptiques, magnètiques i catalítiques. S'utilitzen en aplicacions biomèdiques.
- **Nanopartícules polimèriques:** són nanopartícules de base orgànica i depenent del mètode de preparació, aquestes tenen estructures en forma de nanocàpsula o nanoesfera. Les nanosferes tenen una estructura similar a la d'una matriu i els compostos actius i el polímer es dispersen uniformement, mentre que en les nanocàpsules els compostos actius estan confinats i envoltats per una coberta de polímer.

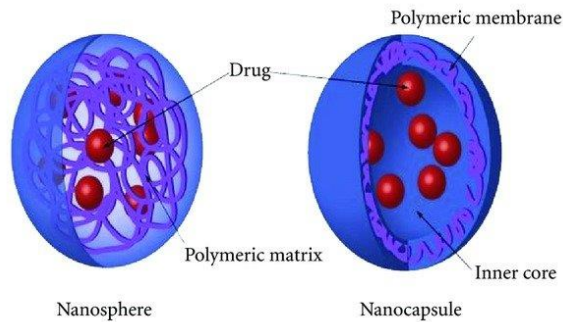


Figura 4. Nanosfera i nanocapsula

Font: John Christoforidis. Web: ResearchGate

- **Nanopartícules lipídiques:** són generalment de forma esfèrica amb un diàmetre que varia de 10 a 100 nm. Consisteixen un nucli sòlid fet de lípids i una matriu que conté molècules lipòfiles solubles i on el nucli extern d'aquestes nanopartícules està estabilitzat per surfactants i emulsionants.

Totes aquestes nanopartícules tenen diverses aplicacions en el camp biomèdic com a portadores de fàrmacs i alliberament d'ARN en la teràpia del càncer [5].

1.2.1 NANOPARTÍCULES POLIMÈRIQUES DE PLGA

El *PLGA*, àcid *poli-(D,L)-làctic-co-glicòlic (PLGA)*, és un dels polímers més utilitzats per al lliurament de medicaments per la seva biodegradabilitat, el disseny i el rendiment. És un copolímer d'àcid poli-làctic (*PLA*) i àcid poli-glicòlic (*PGA*). L'àcid poli-làctic conté un α -carboni asimètric que normalment es descriu com a forma D o L.

1.2.1.1 FORMACIÓ DEL PLGA

Aquestes molècules es poden formar a partir d'un procés de polimerització per condensació d'àcid làctic i àcid glicòlic. Per a l'obtenció de co-polímers d'elevat pes molecular cal tenir com a materials de partida els dímers cíclics dels respectius àcids, en presència de catalitzadors i condicions controlades de temperatura i pressió.

1.2.1.2 PROPIETATS FISCOQUÍMIQUES

L'ús del copolímer PLGA en dispositius terapèutics ha estat aprovat per la FDA (Food and Drug Administration) degut a les seves propietats fisicoquímiques.

- **Solubilitat:** són solubles en la majoria de solucions orgàniques. En un medi aquós tenen la capacitat d'absorbir l'aigua i provocar turgència.
- **Pes molecular i viscositat intrínseca:** l'addició d'aquests biopolímers a un solvent li augmenta a aquest considerablement la viscositat; aquest paràmetre està proporcionalment relacionat amb el seu pes molecular, el qual al seu torn està definit pel grau de polimerització.
- **Temperatura de transició vítria (T_g):** la temperatura necessària per aconseguir l'estat vítri (rígid i fràgil) d'aquests biopolímers, la qual és coneguda com temperatura de transició vítria (T_g). La T_g té relació directa amb el pes molecular del biopolímer. La presència de solvents orgànics residuals o humitat en aquests sistemes pot alterar la T_g en diversos graus centígrads i arribar a un valor proper a la temperatura corporal, la qual cosa podria afectar la velocitat de degradació de les nanopartícules i per tant al perfil d'alliberament del fàrmac.

- **Degradació:** la degradació de PLA / PLGA es produeix per hidròlisi no enzimàtica de l'àcid làctic i àcid glicòlic. Aquesta hidròlisi permet que les molècules de l'àcid làctic i glicòlic s'incorporin al cicle de Krebs. Aquest cicle, forma part del procés de la respiració cel·lular en que els glúcids són degradats a CO₂ i aigua obtenint-se energia. Per tan, són molècules fàcilment biodegradables. (Fig5)

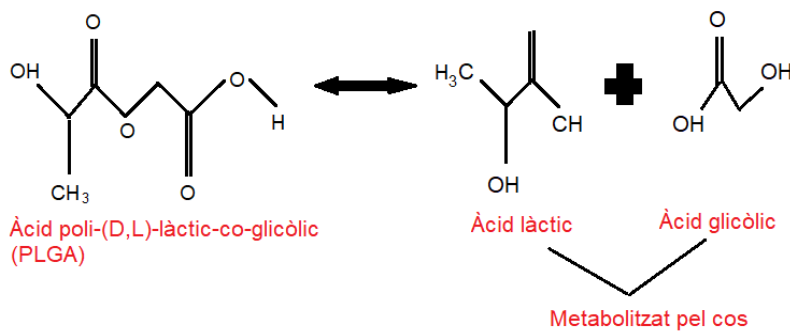


Figura 5. Estructura química del PLGA i mecanisme de degradació

Font: Creació pròpia

- **Biocompatibilitat:** el PLGA és biocompatible, biodegradable i no tòxic, per això s'usa en aplicacions mèdiques [6].

2.EL PROCÉS INFLAMATORI

Quan les cèl·lules del nostre cos es danyen, a més de moltes altres reaccions, produeixen una substància química anomenada l'àcid araquidònic. Llavors els isoenzims COX-1 i COX-2 converteixen l'àcid araquidònic en prostaglandina H2, que entre altres funcions, provoca augment de temperatura, inflamació, dolor, etc. (Fig6)

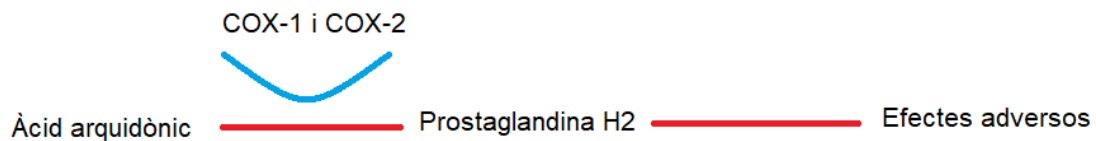


Figura 6. Mecanisme d'acció del COX-1 i COX-2 Font: Creació pròpia

2.1 INFLAMACIÓ DE L'ULL

Per a comprendre el procés d'inflamació de l'ull hem de conèixer la seva estructura.

2.1.1 ESTRUCTURA DEL GLOBUS OCULAR

Els dos globus oculars presenten una forma esfèrica d'aproximadament 2,5 cm de diàmetre. És l'òrgan que permet els éssers humans captar amb nitidesa tota la informació visual externa, ja que, a l'interior seu hi conté les cèl·lules fotoreceptores (cèl·lules que capten la llum). Després, s'encarrega de convertir tota la informació en impulsos nerviosos i seran enviats cap al cervell on es farà el processament [7].

La part externa de l'ull està composta per dos segments: el segment anterior (cornea, iris, cristal·lí i l'esclera banyats per l'humor aquós) i el segment posterior (coroides, retina i nervi òptic banyats per l'humor vitri) (Fig 7).

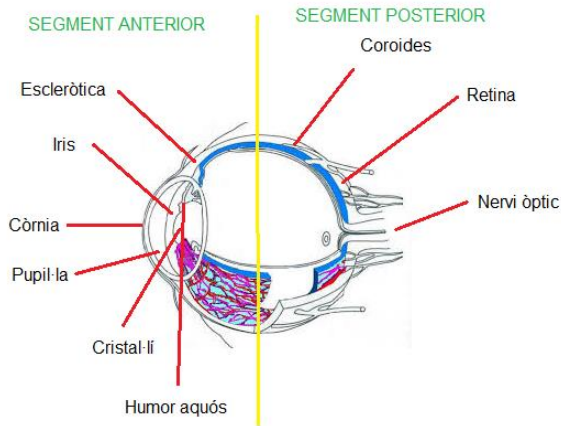


Figura 7. Globus ocular

Font: creació pròpia

2.1.1.1 SEGMENT ANTERIOR

- **Còrnia** la seva funció fonamental és la de protecció, tenint en compte la seva forma transparent i cupular. A banda d'això, també filtra i refracta la llum que capta cap a totes les altres estructures de l'ull.
- **L'escleròtica o esclera** és una membrana blanca que envolta i protegeix la part interna del globus ocular. La part anterior d'aquest s'estén a partir de la còrnia, àrea frontal visiblement per nosaltres i s'acaba cap enrere, cobrint tota la part posterior del l'ull.
- **L'iris** és una estructura muscular amb la forma d'un disc on té un orifici central anomenat pupil·la. Per tant, durà a terme la miosi (moviments de contraccions) o la midriasi (moviments de dilatació), en funció de la llum que li arribi des de l'exterior. Quan hi ha molta llum en el l'ambient, la pupil·la es tanca, i s'obre quan baixa la lluminositat. D'aquesta manera es controla l'entrada de la llum al l'ull. El color dels ulls depèn de la aparença de l'iris. La **pupil·la** és l'obertura que hi ha al centre de l'iris, de color negre i forma circular. En funció de com sigui d'intens el feix de llum que va

penetrant per les parts de l'ull anteriors, la pupil·la es contraurà o es dilatarà.

- **El cos ciliar** es troba entre l'iris i la coroide. La seva regió externa està formada pels processos ciliars que són uns plecs en la part anterior del cos ciliar, la funció dels quals és produir el humor aquós, imprescindible per la nutrició i normal funcionament de les estructures oculars internes. El múscul ciliar és una banda circular de múscul llis que consta de fibres radials i longitudinals.
- **El cristal·lí** s'encarrega d'enfocar correctament la imatge per a què es formi just a la superfície de la retina.

2.1.1.2 SEGMENT POSTERIOR

- **La coroides** està formada per una xarxa complexa de vasos sanguinis que serveixen per la nutrició i el bon funcionament de les capes externes de la retina. S'estén per tota la part posterior del globus ocular.
- **La retina** és una estructura que recobreix tot l'interior de la paret ocular. És una capa fina i transparent formada sobretot per cèl·lules nervioses i estructurada en deu capes més. Conté les cèl·lules fotoreceptores, els bastons centrats en les imatges en blanc i negre i en la visió nocturna, i dels cons, que es dediquen fonamentalment a la distinció cromàtica i a la visió diürna.
- **El nervi òptic** s'encarrega de transmetre la informació visual de l'ull al cervell.

2.1.2 L'ULL VERMELL

- **Envermelliment dels ulls:** La dilatació o inflamació dels vasos sanguinis oculars pot donar lloc a l'envermelliment dels ulls. Aquesta afecció pot estar causada per irritació, exposició a la llum solar, ús d'ordinadors en temps prolongat, entre d'altres factors. Al mercat hi ha col·liris elaborats específicament per tractar l'envelliment dels ulls i disminuir els símptomes que aquesta condició pugui causar.
- **Sequedat ocular:** té lloc quan l'ull està menys lubricat del normal a causa d'afeccions com la síndrome de l'ull sec sever. Mantenir l'ull lubricat és important per contrarestar símptomes com picor, ardor i dolor. Hi col·liris elaborats específicament per tractar la sequedat ocular.
- **Infeccions:** Condicions infeccioses com la conjuntivitis requereixen l'ús de col·liris amb antibiòtics que afavoreixen que l'ull absorbeixi de forma més fàcil el medicament per combatre la infecció.
- **Al·lèrgies:** Les persones al·lèrgiques als àcars de la pols o al pol·len solen presentar episodis d'al·lèrgies en els quals es poden veure afectats els ulls. Els col·liris elaborats a partir d'antiinflamatoris són els adequats per tractar les al·lèrgies oculars.
- **Glaucoma:** és la principal causa de ceguesa al món i el col·liri és un dels medicaments que s'utilitza per mantenir aquesta malaltia controlada.

2.1.3 APLICACIONS DE LES GOTES OFTÀLMIQUES

Les gotes oculars també anomenades col·liris, són formulacions farmacèutiques destinades a ser aplicades als ulls, per curar les diverses patologies que hem descrit en l'apartat anterior.

- **La permeabilitat de la còrnia** és molt important per a l'aplicació de medicines a l'ull ja que afecta la seva concentració. Les substàncies àcides i no desintegrades penetren fàcilment a través de l'epiteli corneal. En canvi, ions i substàncies insolubles en lípids penetren a través de l'epiteli corneal amb més dificultats.
- **L'epiteli corneal** consisteix en capes de cèl·lules, amb un gruix mitjana de tres a cinc cèl·lules; a l'exterior les cèl·lules superficials, després les alades i en el més profund les cèl·lules basals, aquestes últimes tenen la capacitat de multiplicar-se per mitosi. Les cèl·lules alades reben aquest nom a causa de la presència de prolongacions. Les cèl·lules superficials posseeixen la característica d'estar en un estat de degeneració, es renoven desprenent-se de la capa més externa (pel·lícula lacrimal). Després tornen a sorgir des de les capes més profundes (cèl·lules columnars basals) ràpidament.

La principal funció de l'epiteli corneal és la de servir com a barrera per a protegir la còrnia de l'ull a traumes externs. També eviten que els bacteris entrin en l'epiteli (i l'estroma corneal) i resistir el lliure flux dels fluids de les llàgrimes [8].

- **L'endoteli corneal** és una monocapa de cèl·lules hexagonals que es troba situada a la superfície interna de la còrnia, en contacte directe amb l'humor aquós i la cambra anterior de l'ull. La seva funció és la de deshidratar la còrnia per mantenir-la transparent. Com les cèl·lules endotelials no es regeneren es perden amb l'edat.

D'altra banda, l'endoteli corneal crea una membrana altament permeable per a les substàncies iòniques on substàncies metabòliques importants com la glucosa i els aminoàcids poden traspasar-la amb facilitat.

Es comporta com una membrana semipermeable que permet el pas de l'humor aquós a través seu, el qual aporta glucosa i altres nutrients a l'interior de la còrnia, fent possible la seva nutrició [9].

Les medecines contingudes en les gotes oftàlmiques han de travessar l'epiteli i l'endoteli corni i només arriba a penetrar un 5% del total.

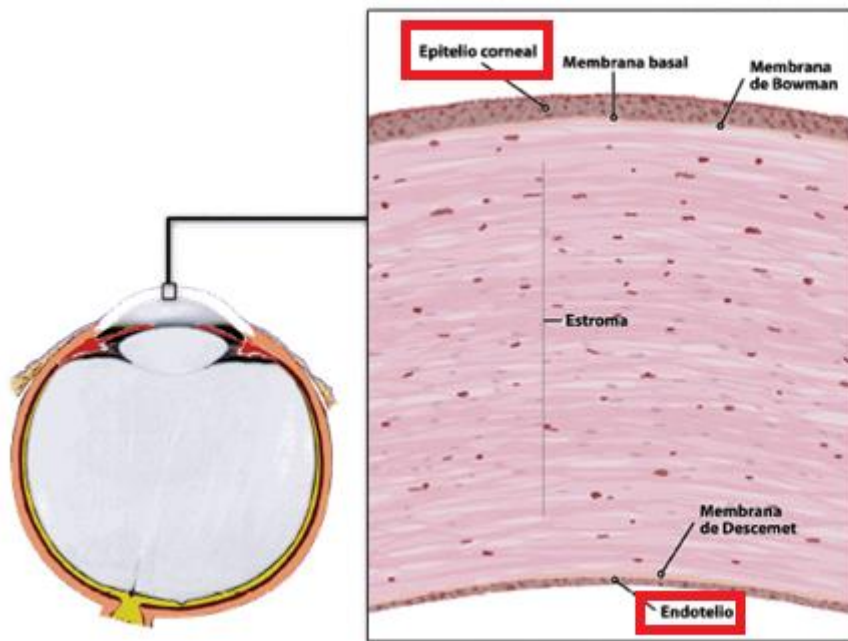


Figura 8. Parts de la còrnia

Font: Navarra, Anales. Web: Seielo

2.1.3.1 ESTERILITZACIÓ DE LES GOTES OFTÀLMIQUES

Els productes farmacèutics considerats estèrils com col·liris o solucions parenterals, han de demostrar que en efecte compleixen amb el requisit que exigeix la seria ICH Q6A adherida al Consell Internacional per a l'Harmonització de Requisits Tècnics per a Productes Farmacèutics per a Ús Humà, com a requeriment per a la seva aprovació.

L'esterilització és un procés físic o químic pel qual es destrueix o bé es fa inviable tota vida microbiana —incloses les espores— dels objectes inanimats. Això vol dir que els microorganismes perden de manera irreversible la capacitat de propagar-se indefinidament. Per tant, podem dir que un material estèril no està contaminat amb cap microorganisme viable. Un dels mètodes d'esterilització més utilitzats és l'aplicació de rajos gamma utilitzant una font d'irradiació que serveix per eliminar microorganismes que s'hagin adquirit durant el procediment i d'aquesta manera complir amb els requisits exigits. Hi ha una empresa a Barcelona especialitzada en la esterilització mitjançant rajos gamma dels medicaments s'anomena Aragogamma. Aquesta tècnica d'esterilització presenta grans avantatges, perquè no afecta els paràmetres físics de les nanopartícules ni produeix increment de la temperatura.

3. ELS FÀRMACS ANTIINFLAMATORIS

Els antiinflamatoris són medicaments o substàncies que redueixen la inflamació (enrogiment, inflamació i dolor) en el cos. Els medicaments antiinflamatoris impedeixen que certes substàncies en el cos causen inflamació. S'usen en el tractament de moltes afeccions diferents. Existeixen dos grans grups de fàrmacs antiinflamatoris: els antiinflamatoris esteroïdals i no esteroïdals [10].

3.1 ANTIINFLAMATORIS ESTEROÏDALS

Els esteroides són corticoides naturals (hormones produïdes per l'escorça adrenal) o semisintètics de característiques estructurals i farmacològiques similars als primers, encara que en general, són més potents. El seu ús generalitzat es veu limitat pels seus importants efectes secundaris i els seus efectes sobre el metabolisme de l'organisme.

3.2 ANTIINFLAMATORIS NO ESTEROÏDALS (AINEs)

Els antiinflamatoris no esteroides o AINEs són un conjunt de medicaments (antiinflamatoris, analgèsics i antipirètics), que serveixen per reduir els símptomes de la inflamació, el dolor i la febre respectivament.

3.2.1 MECANISME D'ACCIÓ

Els AINEs s'encarreguen de la inhibició de la fabricació del l'enzim COX-1 i COX-2, que com hem vist en l'apartat de la inflamació són responsables de convertir l'àcid araquidònic en prostaglandines i aquestes produeixen inflamació i efectes adversos com augment de temperatura, dolor, etc. Aquí és on, els AINEs entren en acció, aquests es col·loquen en el lloc d'activació de tots aquests enzims COX i inhibeixen la seva síntesi (Fig 8).

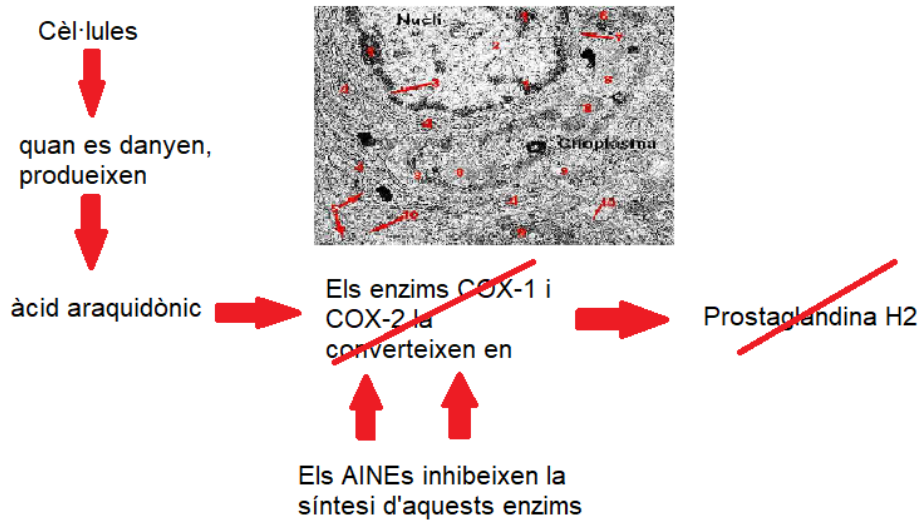


Figura 9. Mecanisme d'acció

Font: Creació pròpia

3.2.1 DICLOFENAC

El diclofenac és un medicament antiinflamatori no esteroide (AINEs) que redueix la inflamació i el dolor. Té una gran especificitat per inhibir l'enzim ciclooxigenasa (COX). És un derivat del àcid fenilacètic (Fig. 9) [11].

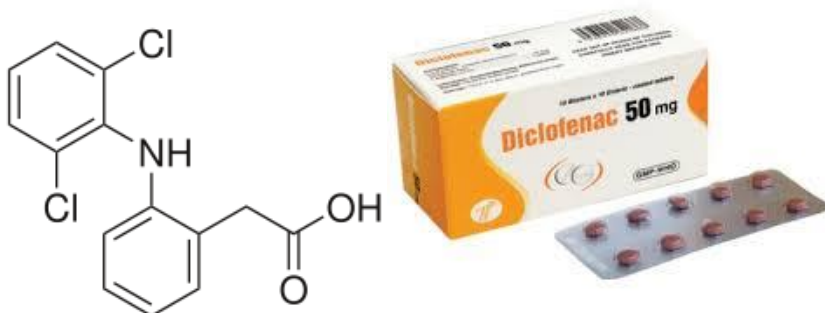


Figura 10. Diclofenac

Font: Rebecca Flood. The sun

3.2.1.1 MECANISME ACCIÓ

Provoca la inhibició de l'activitat de la ciclooxigenasa COXs, amb reducció de la producció de prostaglandines.

3.2.1.2 METABOLISME

Atès al seu metabolisme, només prop de 60% del fàrmac arriba a la circulació sistèmica en forma inalterada. Després de la seva administració oral, rectal o intramuscular s'obtenen concentracions plasmàtiques màximes entre els 20 i 60 minuts.

Com alguns altres agents antiinflamatoris no esteroïdals, el diclofenac s'uneix notablement a les proteïnes plasmàtiques, principalment a l'albumina, en un grau superior al 99,5% . Aproximadament, el 60% de la dosi administrada és eliminada per l'orina en forma de metabòlits i menys d'1% s'elimina de manera inalterada. El diclofenac és també eliminat per la bilis.

3.2.1.3 EFECTES SECUNDARIS

Els efectes secundaris no són gaire diferents depenent de la via d'administració del medicament, ja que el medicament arriba a sang i produeix les mateixes reaccions. El que millorem molt en l'administració ocular és la velocitat d'actuació.

Taula 1. Efectes secundaris segons la via d'administració

VIA D'ADMINISTRACIÓ ORAL	VIA D'ADMINISTRACIÓ OCULAR
Efectes gastrointestinals	Efectes gastrointestinals
Sagnat gastrointestinal	Sagnat gastrointestinal
Ulceració gàstrica	Ulceració gàstrica
Indigestió, gas, mal de panxa	Indigestió, gas, mal de panxa
Mal de cap, mareig, somnolència	Mal de cap, mareig, somnolència
Diarrea, restrenyiment	Diarrea, restrenyiment
Nas congestionada	Nas congestionada
Picor, augment de la suor	Picor, augment de la suor
Augment de la pressió arterial	Augment de la pressió arterial
	Picor als ulls

SEGONA PART: MARC PRÀCTIC

4. PRÀCTIQUES REALITZADES

Introducció

Per a realitzar les pràctiques vaig anar als laboratoris de la facultat de Farmàcia de la UB. Vaig estar guiada i assessorada per la meva tutora i també per Victoria San Roman i Gerard Esteruelas, dos alumnes de la universitat. En la part pràctica vaig realitzar quatre experiments diferents. Tots ells encaminats a sintetitzar les nanopartícules amb el diclofenac per a crear unes gotes oftàlmiques antiinflamatòries biodegradables.

El primer experiment va ser el test HET-CAM que consisteix en determinar el potencial irritant ocular dels fàrmacs en ous de gallina fecundats, considerant similar la membrana corioalantoica de l'embrió de gallina amb l'epiteli corni humà. En aquest experiment es tractava de descartar un possible efecte irritant del diclofenac en l'epiteli de la còrnia de l'ull extrapolant amb el resultat obtingut en la membrana corioalantoica.

El segon experiment va ser l'elaboració de nanopartícules de diclofenac amb un mètode anomenat doble emulsió. Aquest és l'experiment pròpiament de nanotecnologia.

El tercer experiment va ser la caracterització físico-química de les nanopartícules sintetitzades en el segon experiment, on es determina: la mida, l'índex de polidispersitat, el potencial zeta de les nanopartícules i l'eficiència d'associació, que són uns indicadors que serveixen per comprovar si les nanopartícules són aptes per introduir-hi el fàrmac.

L'eficiència d'associació no el vaig dur a terme jo, sinó que el va dur a terme un estudiant de la UB que em va ensenyar com es feia, no vaig tenir accés als resultats, per tant, no hi ha una conclusió d'anàlisi de dades.

I per últim el quart experiment, no el vaig portar a terme jo sinó que es va fer a l'empresa Aragogamma on es va realitzar l'esterilització de les nanopartícules sintetitzades en el segon experiment per tal de poder ser utilitzades.

4.1 EXPERIMENT 1: POTENCIAL IRRITANT OCULAR

TEST HET-CAM (IN VITRO)

Fonament

El HET-CAM TEST (prova de membrana corioalantoica d'ou) és un tipus de prova d'irritació ocular empleat per avaluar el potencial d'irritació de les substàncies. En aquest assaig s'utilitza ous de gallina embrionat de 9 dies.

Material

- Ous embrionats (9 dies)
- Lauril sulfat sòdic (LSS) (SDS 1%)
- Pinces
- Tisores
- Nanopartícules diclofenac (realitzades amb la mateixa tècnica que l'experiment 2)
- Hidròxid de sodi (NaOH; 1 M)
- Clorur de sodi (NaCl 0,9%)
- Pipeta pasteur
- Balança analítica
- Guants
- Bata

Procediment experimental

- L'ou és col·locat sobre un suport per facilitar l'experiment. Primer de tot, es va pesar l'ou, que hauria de pesar entre 50 i 60 grams.
- Un cop pesat, amb ajuda d'una tisora i pinça, es va realitzar un orifici sobre la closca de la part inferior de l'ou i a poc a poc amb les tisores es va anar trencant (amb molt de compte i vigilant que no es tallés la membrana corioalantoica).
- Després amb un comptagotes es va aplicar unes quantes gotes de sèrum sal·lí per humitejar la capa que cobreix la membrana corioalantoica durant 2 o 3 minuts (fins que es podia observar clarament la membrana). A continuació, es procedeix a retirar la capa amb unes pinces.
- Després, es va pipetejar 300µl de les solucions a assajar en diferents ous que havien seguit el mateix procediment descrit. Un total de 13 ous:
 - En el 1 el NaOH com a control positiu
 - En el 2, 6, 7, 9, 10, 11, 12 repliques de les nanopartícules amb diclofenac
 - En el 5 i el 13 diclofenac lliure
 - En el 3 i 4 el control negatiu sèrum fisiològic NaCl
 - En el 8 el LSS com a control positiu
- Al mateix temps es va posar en marxa el cronòmetre per observar l'aparició dels tres fenòmens: l'hemorràgia, el vasoconstricció i la coagulació i es van anotar els resultats obtinguts.
- Es van col·locar els ous als congeladors.
- Finalment es va calcular l'índex irritació ocular (IIO) amb la fórmula següent:

$$IIO = \frac{(301 - H) \times 5}{300} + \frac{(301 - V) \times 7}{300} + \frac{(301 - C) \times 9}{300}$$

H: el temps (seg) que indica l'aparició d'una hemorràgia

V: el temps (seg) que indica l'aparició de vasoconstricció

C: el temps (seg) que indica l'aparició d'una coagulació

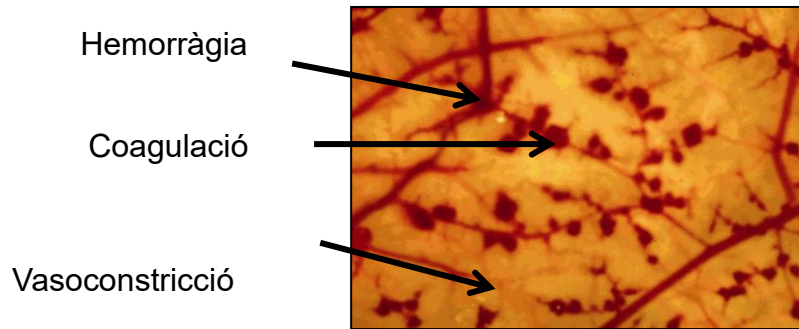


Figura 11. Efectes secundaris del test

Font: Creació pròpia

Taula 2: irritació ocular

TAULA DEL POTENCIAL IRRITANT OCULAR	
IIO	Classificació
0-0.9	No irritant
1-4.9	Feblement irritant
5-8.9	Moderadament irritant
9-21	Irritant

Procediment del test

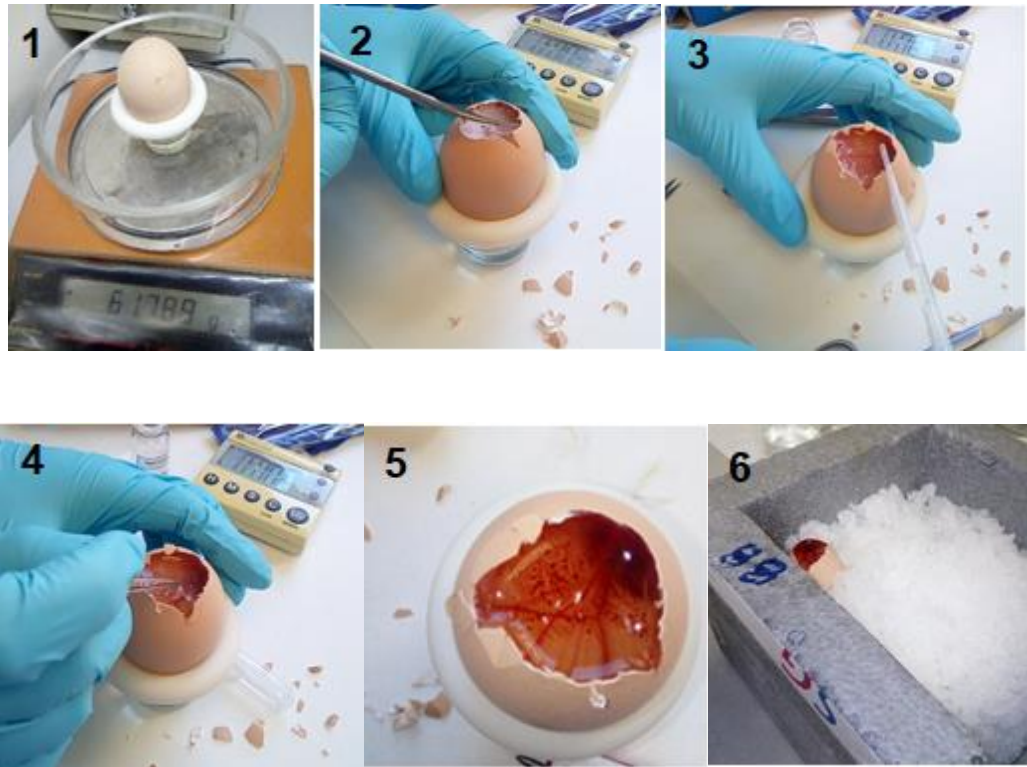


Figura 12. Procediment de HET-CAM

Font: Creació pròpia

Resultats

En la següent taula (taula 3) es pot observar que s'ha fet servir un total de 13 ous. La majoria dels ous tenen un pes similars, tot i que el pes ha estat superior als 50 o 60 grams, tot i així, és acceptable. Un cop fet l'experiment, es va registrar l'aparició dels fets de l'hemorràgia, el vasoconstricció i la coagulació durant 5 minuts i es va anotar el minut en què van aparèixer.

Observem que el l'ou nº1 que és el control positiu (NaOH 1 M) hi apareix el vasoconstricció l'hemorràgia i la coagulació als segons 0,17; 0,17 i 0,25 respectivament. Un cop obtingut les dades, es va aplicar la fórmula per calcular l'índex irritació ocular i com a resultat va donar 21, si mirem la taula del potencial irritant ocular (taula 2), ens mostra que el valor 21 és molt irritant.

Càlculs de l'índex irritació ocular:

Ou 1

$$IIO = \frac{(301 - 0,17) \times 5}{300} + \frac{(301 - 0,17) \times 7}{300} + \frac{(301 - 0,25) \times 9}{300} = 21$$

Ou 5

$$IIO = \frac{(301 - 200) \times 7}{300} = 2,4$$

Ou 8

$$IIO = \frac{(301 - 242) \times 7}{300} = 1,37$$

També, l'ou 5 amb diclofenac lliure i 8 amb LSS han aparegut el vasoconstricció als 3 min 20 s i 4 min 2 s respectivament mentre que altres fenòmens no han sorgit

Per últim, la resta d'ous no han presentat cap efectes dels que s'han dit, per tant, aquests no tenen cap problema d'irritació.

Taula 3: resultats de la pràctica

Nº OU	PES	VASOCONSTRICCIÓ (temps d'aparició)	HEMORRÀGIA (temps d'aparició)	COAGULACIÓ (temps d'aparició)
1	66,4 g	0,17 s	0,17 s	0,25 s
2	61,78 g	No	No	No
3	60,4 g	No	No	No
4	62,2 g	No	No	No
5	64,3 g	3 min 20 s	No	No
6	63,9 g	No	No	No
7	68,4 g	No	No	No
8	61,3 g	4 min 2 s	No	No
9	50,4 g	No	No	No
10	64,35 g	No	No	No
11	63,24 g	No	No	No
12	62,50 g	No	No	No
13	64,20 g	No	No	No

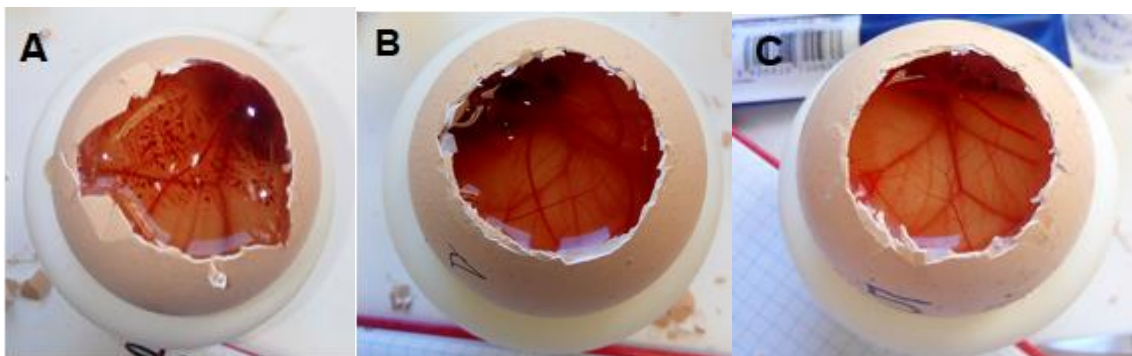


Figura 13. A) NaOH (control positiu) B) Diclofenac lliure; C) LSS (control positiu)

Font: Creació pròpia

Conclusió

En el ou 1 el resultat és de 21 , que és el resultat màxim, per tan és molt irritant, això és el resultat que esperàvem ja que és el control positiu, i el NaOH és un compost molt bàsic i irritant.

En l'ou 5 hi havia diclofenac lliure i ha reaccionat, tot i que no tenim valors de hemorràgia i coagulació, el càlcul de la vasoconstricció ens dona 2,4 per tan dona una irritació lleu. No teníem cap noció de si seria irritant o no. Tot i que l'altre ou amb diclofenac lliure no ens ha reaccionat. Podria ser un error o una contaminació. No es pot extreure la conclusió de que sigui irritant.

En l'ou 8 hi havia el control positiu de LSS, i ens reacciona també només amb vasoconstricció i dona un resultat de 1,37 irritació lleu. També és un resultat esperat.

4.2 EXPERIMENT 2: ELABORACIÓ DE NANOPARTÍCULES

Fonament

El mètode de la doble emulsió és la tècnica més utilitzada per la encapsulació de fàrmacs hidrosolubles en nanopartícules. Aquest mètode consisteix en la preparació de diverses fases (aquosa i orgànica) i l'aplicació d'alta energia per a formació de nanopartícules (amb un aparell anomenat sonicador).

Les molècules es van dispersant formant micel·les on la fase aquosa queda englobada per la fase orgànica. Formant les nanopartícules.

Material

-Aigua

-Diclofenac

-Lutrol

-PLGA

-Espàtula

-Acetat etil

-Iman

-Etiquetes

-Pipetes Pasteur

-Puntes grogues i blaves

-Vials

-Balança

-Paper

-Gel

-Guants

-Bata

Procediment

Abans de començar el procés experimental, s'havia de calcular les concentracions necessàries de les solucions per obtenir 6 mg de nanopartícules diclofenac que més tard s'aplicarien en l'experiment. En total, s'ha fet 3 concentracions:

1. Concentració de la fase aquosa: diclofenac + aigua

$$\frac{1,2 \text{ mg diclofenac}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 6 \text{ mg de diclofenac}$$

$$\text{Ho diluïm en 1,5 ml aigua: } \frac{6 \text{ mg diclofenac}}{1,5 \text{ ml aigua}}$$

2. Concentració de la fase orgànica: acetat etil + PLGA

$$\frac{16 \text{ mg PLGA}}{\text{ml}} \times 5 \text{ ml} = 80 \text{ mg PLGA}$$

Ho diluïm en 2 ml d'acetat d'etil:

$$\frac{80 \text{ mg PLGA}}{2 \text{ ml acetat d'etil}}$$

3. Concentració de la subfase aquosa: Lutrol

$$\frac{3 \text{ mg lutrol}}{\text{ml}} \times 2 \text{ ml} = 6 \text{ mg de lutrol}$$

Ho diluïm en 2 ml d'aigua:

$$\frac{6 \text{ mg lutrol}}{2 \text{ ml d'aigua}}$$

Fem una segona concentració de lutrol:

$$\frac{0,03 \text{ mg lutrol}}{\text{ml}} \times 1,5 \text{ ml} = 0,045 \text{ mg}$$

Ho diluïm en 1,5 ml d'aigua:

$$\frac{0,045 \text{ mg lutrol}}{1,5 \text{ ml d'aigua}}$$

- Com que el mètode emprat per fer aquest experiment és el mètode de doble emulsió, hi ha una fase aquosa i un altre orgànica. Per obtenir la quantitat desitjada, s'utilitza la balança, on es posa el vial i es tara la balança, després amb l'ajuda d'una espàtula poc a poc aboquem la substància determinada (diclofenac, PLGA, lutrol) al vial.
- Un cop obtingut el pes (6 mg de diclofenac, 80 mg PLGA, 2mL i 1,5 mL de lutrol), cal preparar les dues fases.
- En la fase aquosa, s'afegeixen 6 mg de diclofenac més 1,5 mL d'aigua.
- En la fase orgànica, s'afegeixen 80 mg PLGA més 2 mL d'acetat etil.
- A continuació, aboquem el contingut de la fase aquosa a la fase orgànica mitjançant una pipeta Pasteur.
- Després encendre el sonicador per fer la sonicació (procés pel qual s'utilitza ultrasons per unificar dues substàncies en una de sola), introduir el vial (on conté la fase aquosa+ orgànica) en una olla ple de gel i juntament s'introdueixen al sonicador i posar-la en marxa a 38% d'amplitud, pulsos 10 segons on i 5 segons off i el temps 30 segons.
- Passat els 30 segons, extreure el vial i amb la pipeta abocar 2 ml de Lutrol i tornar-ho a sonicar, amb els mateixos paràmetres excepte el temps a 3 minuts.
- Un cop acabat el procés de sonicació, abocar un altre ració de Lutrol (1,5 mL) al vial. Per finalitzar, s'introdueix una nanopartícula (imant) i col·locar el vial a la màquina d'agitació per tal que el dissolvent s'evapori (durant una nit).

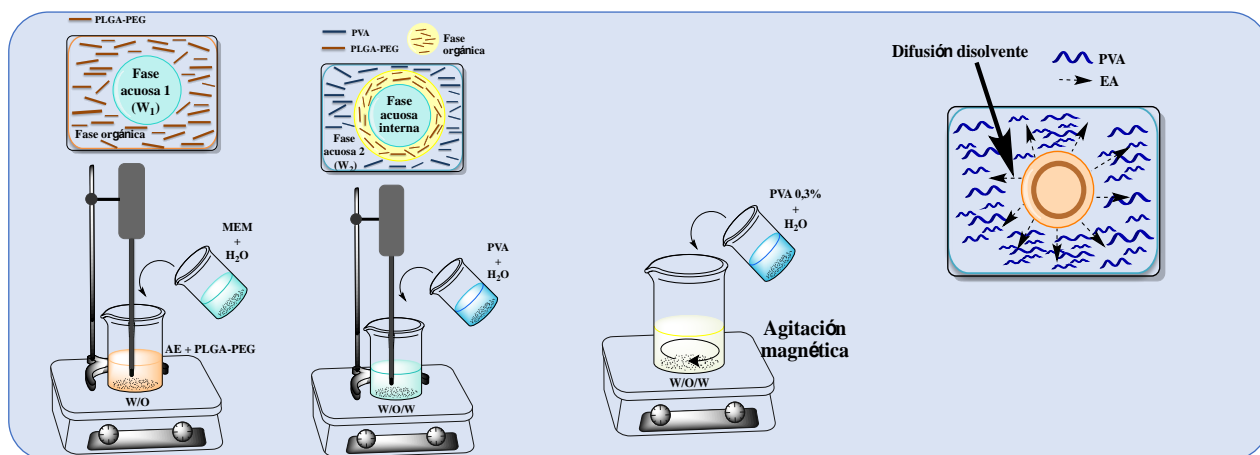


Figura 14. Mètode doble emulsió

Font: Creació pròpia



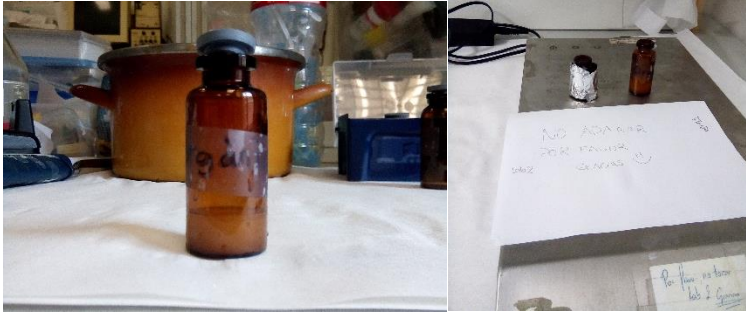


Figura 15. Procediment d'elaboració de les nanopartícules de diclofenac

Font: Creació pròpia

Resultats i conclusió

Hem obtingut unes nanopartícules biodegradables amb diclofenac .

4.3 EXPERIMENT 3: CARACTERITZACIÓ FÍSICO-QUÍMICA

Un cop elaborades les nanopartícules diclofenac s'havia de calcular la mida de les partícules, l'índex de polidispersitat i el potencial zeta de les nanopartícules. Tot això es va mesurar amb un aparell anomenat Malvern Zetasizer. La mostra de nanosuspensió es va diluir 20 vegades amb aigua Milli-Q abans de les mesures.

4.3.1 MIDA PROMIG I ÍNDEX DE POLIDISPERSITAT (IP)

Fonament

La mida de les partícules és un factor clau que influeix en la velocitat i l'extensió de la penetració a través de la membrana corneal i internalització cel·lular, així com l'estabilitat de la formulació. Degut a aquests factors, la mida desitjada havia de ser inferior de 200 nm.

L'índex de polidispersitat (IP) indica el grau de variació de mides obtingudes. La mida és la promig i aquest indica si totes les nanopartícules són iguals. [12].

Material

- `Pipetes
- Aigua Milli Q
- Nanopartícules diclofenac (obtingudes en l'experiment 2)
- Vas de precipitats
- Guants
- Zetasizer Nano 2S
- Cubeta
- Bata

Procediment experimental

- Un cop elaborades les nanopartícules diclofenac, en fem una dissolució 1/10 per a fer-ho diluïm en una cubeta 100 µl de nanopartícules diclofenac més 900 µl d'aigua Milli Q,. Finalment introduir aquesta cubeta al Zetasizer per obtenir els resultats.
- El pas anterior el repetim amb una altre formulació de nanopartícules.
- Se'n fan 3 lectures de cada cubeta per tant obtenim 6 lectures.(Taula 4)

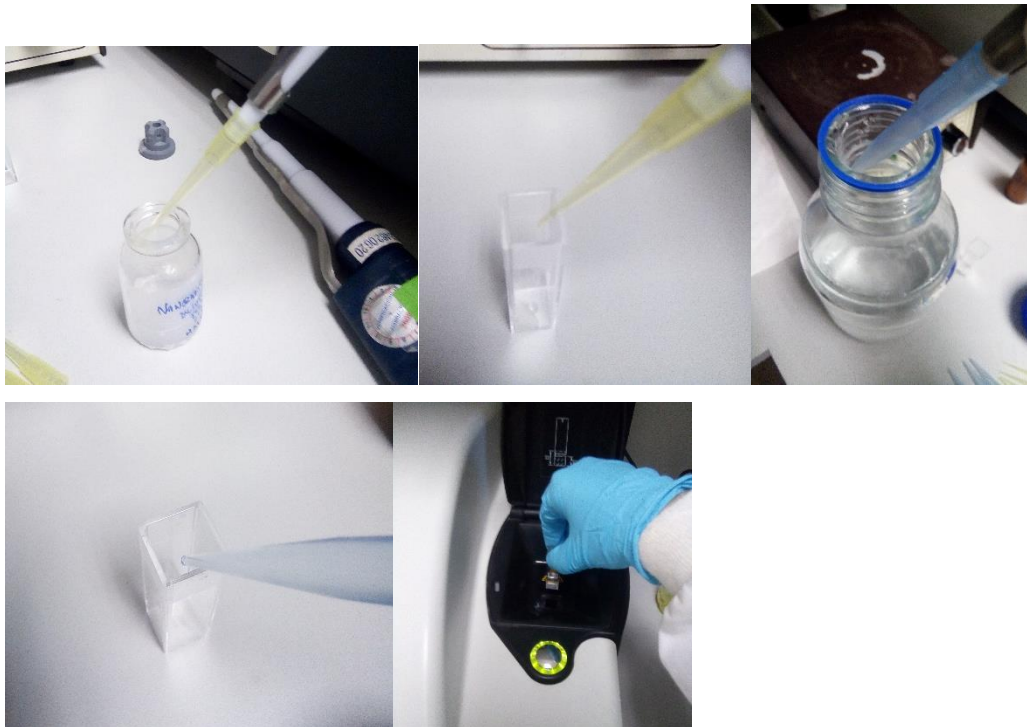


Figura 16. Procediment de càlcul de mida i IP amb la Zetasizer

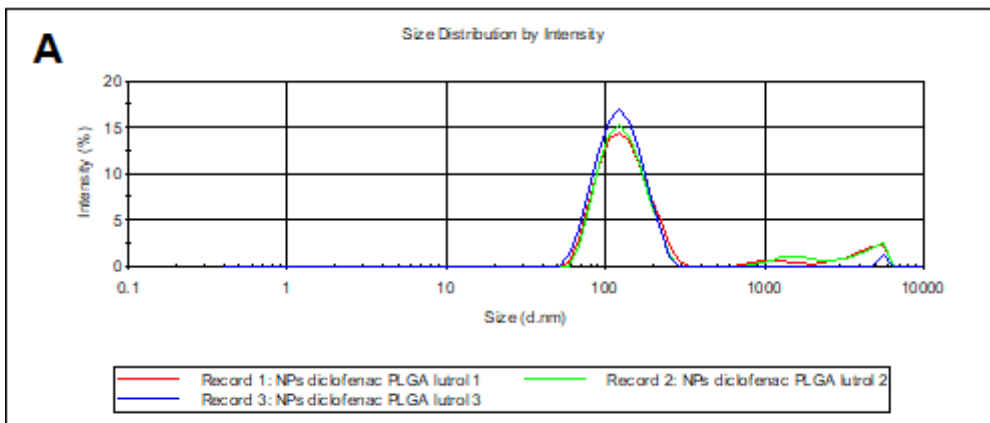
Font: Creació pròpia

Resultats i conclusió sobre la mida

A partir dels dos gràfics obtinguts (Fig 16), he pogut observar que la distribució de la mida ha mostrat un pic d'intensitat amb un percentatge relativament elevat que indica la bona uniformitat de la mida de les partícules d'aquestes formulacions. A més la mida és adequada ja que està per sota dels 200nm que és el que volíem. Es pot veure els resultats en la taula 4.

Taula 4: resultat corresponents a la mida de les nanopartícules

Lectura	TIPUS	NOM	Mitjana mida	MITJANA de les 3 lectures
1	mida	Nanopartícules diclofenac	142,6 nm	148,9 nm
2	mida	Nanopartícules diclofenac	148,8 nm	
3	mida	Nanopartícules diclofenac	155,4 nm	
4	mida	Nanopartícules diclofenac	148 nm	151,2 nm
5	mida	Nanopartícules diclofenac	154,3 nm	
6	mida	Nanopartícules diclofenac	151,3 nm	



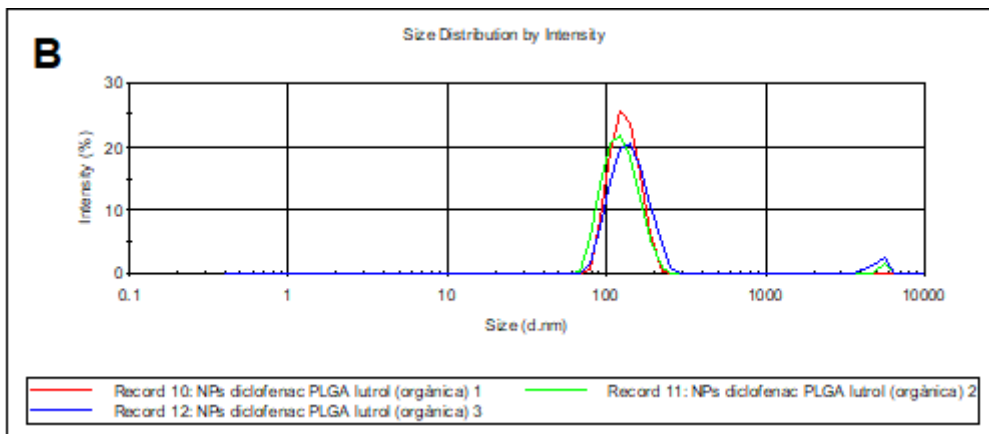


Figura 17. Gràfics de mida de les formulacions

Font: Creació pròpia. Màquina Zetasizer.

Apart d'analitzar globalment les magnituds de les nanopartícules, he analitzat el resultat promig en funció de la quantitat i obtenim un % de la seva mesura. És a dir, si hi ha 100 partícules, un 22,5 % tenen una mida de 68,06 nm (Taula 5). A cada taula hi consten els percentatges majoritaris de nanopartícules i la seva mida corresponent.

En la segona lectura, els percentatges majoritaris són 25,6 % de nanopartícules que tenen una mida de 78,82 nm i 19,1 % la qual tenen una mida de 91,28 nm. Els percentatges majoritaris de la segona lectura, són un 20,3% de nanopartícules tenen una mida de 68,06 nm, uns altres 27,1% tenen 78,82 nm i un 21,7 % tenen 91,28.

En la tercera lectura, els percentatges més alts són 15,9% que mesuren 58,77 nm, 24,6% que mesuren 68,08, 22,6% 78,82 i un 15,9 que mesuren 91,28

En la quarta lectura, els percentatges més alts són 25,9 % que tenen una mida de 91,28, un 29,4% que mesuren 105,7 i un 19,6 que tenen un tamany de 122,4

En la cinquena lectura, els percentatges més alts són 28,8% que tenen una mida de 91,28, 24% que tenen 78,82 i un 20,5% que tenen una mida 105,7.

En la sisena i última, els percentatges més alts són 25,7% que tenen un tamany de 91,28, un altre de 25,1% que tenen una mida de 105,7 i un 16,7% de 122,4

En tots els casos, es pot comprovar que les nanopartícules tenen tamany inferior a 200 nm, de manera que serien adequades per a la seva administració ocular.

Taula 5: el promig i la desviació estàndard de les nanopartícules de diclofenac (veure gràfics als annexes 1)

% potencial de les nanopartícules

NPs diclofenac: 1a lectura		
	%	Nm (mida)
1	1,8	50,75
2	10,4	58,77
3	22,5	68,06
4	25,6	78,82
5	19,1	91,28
6	11,1	105,5
7	5,5	122,4
8	2,5	141,8
9	1,0	164,2
10	0,4	190,1
11	0,1	220,2

NPs diclofenac: 2a lectura		
	%	Nm (mida)
1	6,4	58,77
2	20,3	68,06
3	27,1	78,82
4	21,7	91,28
5	13,2	105,7
6	6,7	122,4
7	3	141,8
8	1,2	164,2
9	0,4	190,1
10	0,1	220,2

NPs diclofenac: tercera lectura		
	%	Nm (mida)
1	4,5	50,75
2	15,9	58,77
3	24,6	68,08
4	22,6	78,82
5	15,9	91,28
6	9,2	105,7
7	4,6	122,4
8	2,1	141,8
9	0,8	164,2
10	0,3	190,1

NPs diclofenac: 4a lectura		
	%	Nm (mida)
1	1,0	68,06
2	10,3	78,82
3	25,9	91,28
4	29,4	105,7
5	19,6	122,4
6	9,4	141,8
7	3,4	164,2
8	0,9	190,1
9	0,1	220,2

NPs diclofenac: 5a lectura		
	%	Nm (mida)
1	0,5	58,77
2	8,8	68,06
3	24	78,82
4	28,8	91,28
5	20,5	105,7
6	10,8	122,4
7	4,5	141,8
8	1,6	164,2
9	0,4	190,1

NPs diclofenac: 6a lectura		
	%	Nm (mida)
1	3,6	68,06
2	14,9	78,82
3	25,7	91,28
4	25,1	105,7
5	16,7	122,4
6	8,6	141,8
7	3,7	164,2
8	1,3	190,1
9	0,4	220,2

Resultats i conclusió sobre la polidispersitat (IP)

Pel que fa a l'índex de polidispersitat (IP) (Taula 6) es pot observar que totes les nanopartícules tenen similars IP, la mitjana obtinguda, tampoc ha variat gaire. Per tant, aquestes nanopartícules compleixen els requisits.

Taula 6: resultat corresponents a l'índex de polidispersió

Lectura	TIPUS	NOM	mitjana	MITJANA de les 3 lectures
1	IP	Nanopartícules diclofenac	0,308	0,343
2	IP	Nanopartícules diclofenac	0,326	
3	IP	Nanopartícules diclofenac	0,395	

4	IP	Nanopartícules diclofenac	0,312	0,325
5	IP	Nanopartícules diclofenac	0,393	
6	IP	Nanopartícules diclofenac	0,271	

4.3.2 POTENCIAL ZETA

Fonament

És una magnitud de l'estabilitat¹ que serveix per mesurar les càrregues elèctriques de les partícules que estan en la superfície d'una fase líquida. Com més alt és el potencial zeta, més estable és el col·loide. El potencial zeta que és menys negatiu que -15 mV representa els començaments de l'aglomeració de partícules. Aporta informació sobre les causes de la dispersió, agregació o floculació, i es pot aplicar per millorar la formulació de dispersions, emulsions i suspensions. Degut a que les nanopartícules es repel·leixen entre elles, i en teoria, si els valors són negatius tendeixen a estabilitzar-les. El potencial zeta ha de ser més negatiu o igual a -15 mV (Taula 4) [13].

¹ Qualitat d'una substància de conservar les seves propietats en el temps, sotmesa a condicions més o menys desfavorables.

Material

- Pipetes
- Aigua Milli Q
- Nanopartícules diclofenac
- Vas de precipitats
- Guants
- Zetasizer Nano 2S
- Cubeta
- Bata

Procediment experimental

- Després de mesurar el tamany i el IP, amb la pipeta s'introdueix de nou la solució a una cubeta específica (específic per calcular el potencial zeta) i aquest cop afegim 1 ml d'aigua Milli Q. A continuació s'introdueix al Zetasizer de nou per calcular el potencial zeta.
- Es van fer 3 lectures un dia (els tres primers protocols de la taula 7), i 3 lectures un altre dia després d'haver esterilitzat les nanopartícules en l'experiment 4 (els protocols 4, 5 i 6 de la taula 7).



Figura 18. Procediment del càlcul de potencial zeta

Font: Creació pròpia

Resultats i discussió

En la següent taula, es pot observar, el potencial zeta que tenen les nanopartícules. De la primera fila fins a la tercera, el potencial zeta està al voltant dels -33 mV, per tant, no ha variat gaire. En canvi, a partir de la quarta fila, el potencial zeta ha set menys negatiu. I en comparació amb les dues mitjanes, el potencial zeta s'ha modificat molt. Això pot ser causat per les radiacions sofertes en la esterilització. Aquests valors són correctes en ambdós casos ja que confirmen l'estabilitat de les mostres (més negatives que -15 mV).

Taula 7: Resultats del potencial zeta

PRTOCOL	TIPUS	NOM	POTENCIAL ZETA	MITJANA
1	PZ	Nanopartícules diclofenac	-33,8 mV	-33,1 mV
2	PZ	Nanopartícules diclofenac	-32,6 mV	
3	PZ	Nanopartícules diclofenac	-33 mV	
4	PZ	Nanopartícules diclofenac	-17,1 mV	-16,6 mV
5	PZ	Nanopartícules diclofenac	-18,2 mV	
6	PZ	Nanopartícules diclofenac	-16,6 mV	

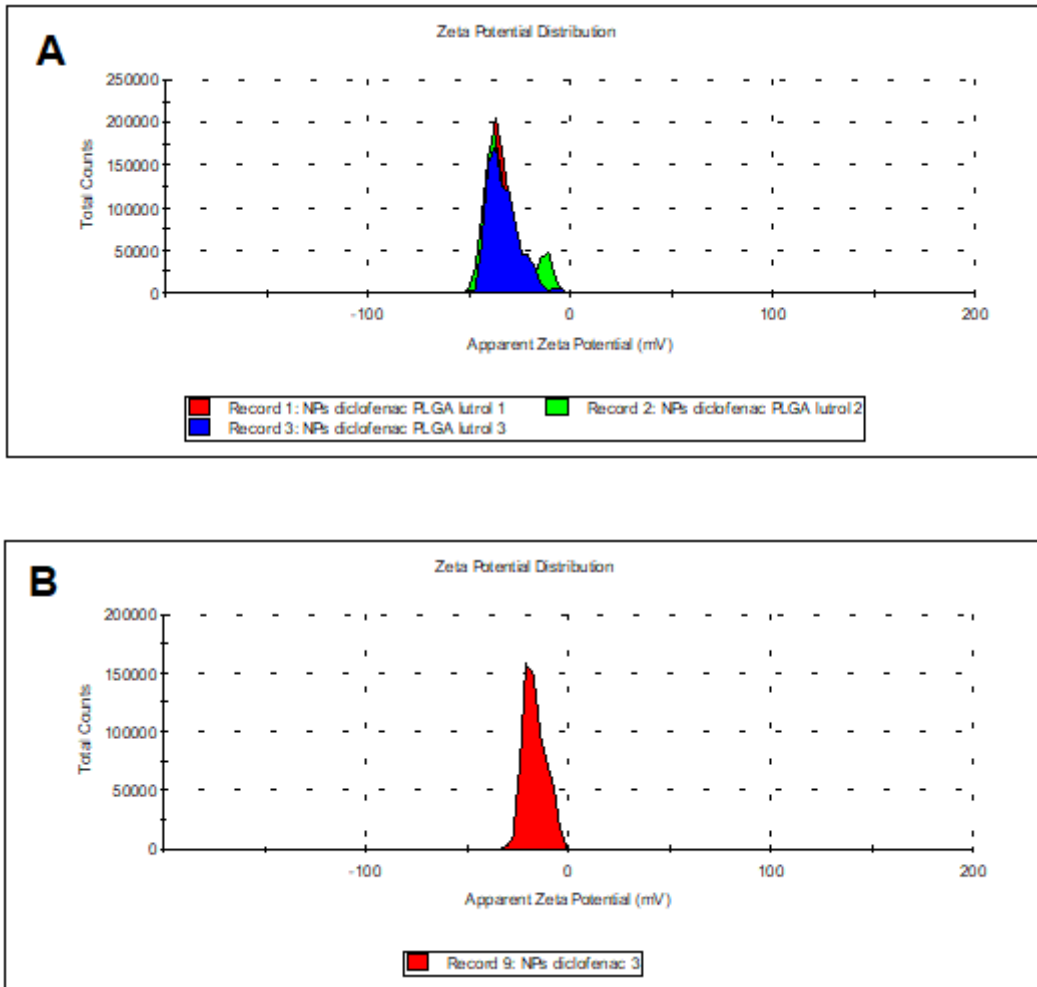


Figura 19. Gràfic del potencial zeta

Font: Creació pròpia. Màquina Zetasizer

4.3.3 EFICIÈNCIA D'ASSOCIACIÓ

Fonament

Aquest experiment vol comprovar l'eficiència d'encapsulació del diclofenac dins de les nanopartícules. Per a fer-ho es fa una cromatografia líquida d'alta resolució.

L'HPLC (cromatografia líquida d'alta resolució) és un dels mètodes més precisos i utilitzats. Aquest mètode identifica i quantifica els components que es troben dissolts dins d'un solvent líquid. Consisteix en una fase estacionària no polar (columna) i una fase mòbil. La mostra en solució és injectada en la fase mòbil. Bàsicament es bomba una barreja de la mostra en un dissolvent a alta pressió a través d'una columna que té material d'empaquetatge especial cromatogràfic. Amb això, la mostra és transportada per un corrent de fase mòbil. Es necessita un detector per veure els compostos que han estat separats a mesura que es dilueixen causa de l'alta pressió. La informació s'envia des del detector a un ordinador que genera el cromatograma [14].

Material

- Nanopartícules diclofenac (realitzades en l'experiment 2)
- Centrifugadora
- Columna Hypersil
- La màquina HPLC
- Guants
- Bata
- Àcid fosfòric
- Metanol
- Ruleta

Procediment experimental

Prèviament s'ha de fer diferents patrons. Un patró és una concentració coneguda, que després servirà com un control per saber la mostra que hem utilitzat quina concentració té.

Les condicions en les quals la mostra de nanosuspensió va ser centrifugada són les següents: es va filtrar 1 ml del sobrenedant que contenia nanopartícules diclofenac a través d'una columna Hypersil™ C18 (150 × 3,9 mm) (12) i es va analitzar per HPLC Waters 2695 a 14000 rpm. En la fase estacionària s'hi va subministrar 80 % d'àcid fosfòric 0,05 % (volum) i en la fase mòbil un 20 % de metanol (totes dues prèviament van ser filtrades per extreure l'aire ja que pot afectar els resultats). L'EE es calcula amb la següent equació:

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantitat total fàrmac} - \text{Fàrmac lliure}}{\text{Quantitat total de fàrmac}}$$

Es posen les nanopartícules a la part superior del tub de filtració i centrifugació. Després es du a terme la centrifugació, el fàrmac lliure queda a la part de sota. A continuació, amb l'HPLC s'analitza el fàrmac lliure, per això la mesura és indirecta, ja que primer s'han separat el fàrmac de dins i el de fora i només mesurem el fàrmac exterior, perquè sabem la quantitat exacte del fàrmac inicial i aplicant la fórmula següent es pot calcular la quantitat de fàrmac que hi ha dins per diferència al de fora.



Figura 20. Procés de centrifugació

Font: Creació pròpia

Resultats i discussió

Tal i com he explicat en la introducció dels experiments, no vaig tenir accés als resultats d'aquesta part de la pràctica i no puc extreure unes conclusions.

A continuació, a la taula següent es mostra el resultat de l'HPLC.

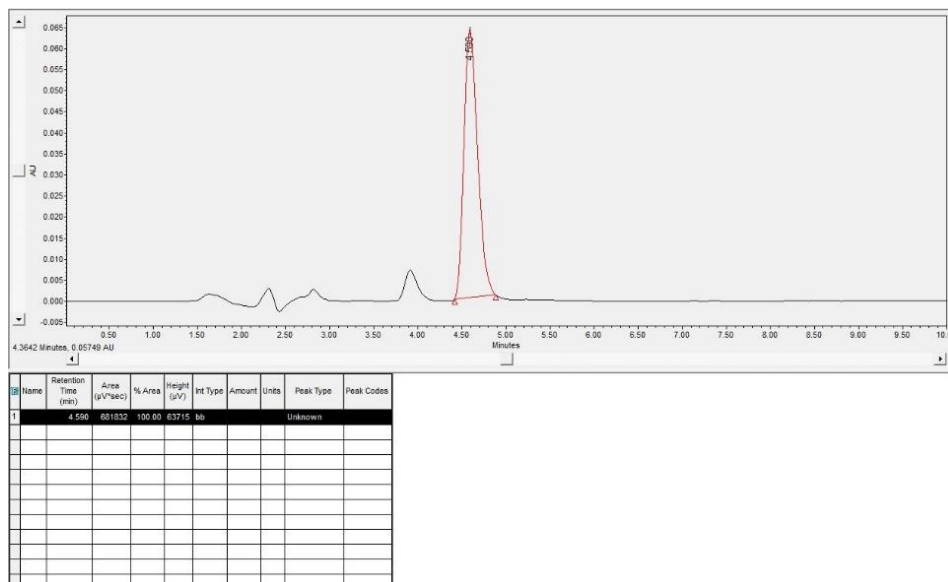


Figura 21. Gràfic de l'eficiència d'associació

Font: Creació pròpia. Màquina HPLC

4.4 EXPERIMENT 4: ESTERILITZACIÓ DE LES NANOPARTÍCULES

Fonament

Aquest experiment es realitza per tal de que les nanopartícules siguin aptes per a ser utilitzades com a medicament. Ja que ha de complir una normativa d'esterilitat descrita al apartat (2.1.3.1).

Per a fer-ho es va enviar les nanopartícules a una empresa de Barcelona (Aragogamma), especialitzada en l'esterilització de material mèdic. Un cop acabada l'esterilització es van comprovar els paràmetres

La radiació gamma és un tipus de radiació electromagnètica, és a dir, que conté els fotons de freqüència més alta. Aquests constitueixen un tipus de radiació ionitzant capaç de penetrar en la matèria més profundament. A causa de la seva alta energia, poden causar danys importants al nucli de les cèl·lules, per la qual cosa són usats per esterilitzar equips mèdics i aliments.

La radioesterilització està recomanada per a productes farmacèutics complexos que no poden suportar una esterilització per calor o vapor, cas de les nanopartícules, el procés consisteix a aplicar radiació ionitzant de 25 kGy, dosi de referència que garanteix un nivell d'esterilitat segura, és a dir que hi ha una probabilitat de supervivència de la població contaminant inferior a 10^{-6} [15].

Resultats i discussió

En la taula següent es pot observar que tant la mida i el potencial zeta han sigut modificades després de l'esterilització. En el cas de la mida, després de l'esterilització ha augmentat però que la mida és acceptable segons el requisit (no passar de 200 nm). A més a més, el IP també ha augmentat, en principi tenia un valor de 0,307 i després de l'esterilització és de 0,334. En canvi, en el potencial zeta es veu clarament un augment de 25 mV però com he dit anteriorment, el potencial zeta correcte ha de ser menor a -15 mV, per tant, compleix els requisits.

Taula 8: abans i després de l'esterilització

Nanopartícules diclofenac abans de l'esterilització			Nanopartícules diclofenac després de l'esterilització		
PI	IP	ZP	PI	IP	ZP
138,6	0,307	-41,6	151,2	0,334	-16,6

5. CONCLUSIONS

La principal conclusió és que la meua hipòtesi era certa, he pogut sintetitzar unes nanopartícules amb fàrmac antiinflamatori, en aquest cas diclofenac, per tal de ser més fàcilment absorbible pel teixit ocular. Va ser possible incloure el diclofenac dins les nanopartícules tal com es veu en la pràctica realitzada d'elaboració de nanopartícules de diclofenac.

No he pogut concloure si l'absorció del diclofenac és superior a la d'altres fàrmacs perquè no he pogut fer l'experimentació "in vivo" amb conills, ja que està previst fer-la durant el mes de novembre del 2019. Tot i que he altres estudis confirmen que les nanopartícules polimèriques travessen millor la llàgrima s'adhereixen més a la còrnia i per tan penetren més. D'aquesta manera ja no es perdria el 95% del fàrmac sinó que s'absorbiria més tot i que no sabem el percentatge.

Quan als objectius que m'havia plantejat:

- El primer objectiu era realitzar les nanopartícules i s'ha aconseguit.
- El segon objectiu també s'ha assolit ja que he adquirit molts coneixements sobre nanociència i nanotecnologia.
- El tercer objectiu era valorar el potencial per a l'aplicació d'aquestes formulacions com a gotes oftàlmiques. Això s'ha analitzat "in vitro", confirmant que les formulacions no són irritants.

6. REFERÈNCIES BIBLIOGRÀFIQUES

ANÓNIMO, (2018). *Nanopartículas*.
<<https://www.ecured.cu/Nanopart%C3%ADculas>> [16 de març de 2019]

ÁNGEL MARTÍN-GAGO, José. *El nanomundo en tus manos*. Barcelona: editorial crítica, 2014.

ANIMAL NATURALIS (2017). *EL TEST DRAIZE*.
<https://www.animanaturalis.org/p/1362/el_test_draize> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

ÀREA OFTALMOLÒGICA AVANÇADA (2018). *Tipus de col·liris per als ulls*.
<<https://areaoftalmologica.com/ca/tipus-de-col%C2%B7liris-per-als-ulls/>>
[Consulta: 12 de juny de 2019]

[6] ASTETE, E. Carlos, SABLIOV, Cristina (2012). *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*.
<<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1163/156856206775997322>>
[Consulta: 31 de març de 2019]

BUSCASBIOGRAFÍAS (2015). *Paul Ehrlich*.
<<https://www.buscabiografias.com/biografia/verDetalle/4362/Paul%20Ehrlich>>
[Consulta: 12 de juny de 2019]

CASAMITJANA, Núria (2018). *Col·liris*.
<<https://www.farmaceuticonline.com/ca/el-medicament/608-colirios?showall=1>>
[Consulta: 12 de juny de 2019]

CASTELLANOS, Mercedes (2018). *Nanotecnología*. <<https://prezi.com/f74nlor2ahyg/nanotecnologia/>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

[13] 100CIA.SITE (2017). *¿Qué es el potencial zeta?*. <<https://100cia.site/index.php/quimica/item/2343-que-es-el-potencial-zeta>> [consulta: 22 de juliol de 2019]

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE MEDICAMENTOS (2001). *Irritación ocular: Modelos alternativos*. <http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol35_3_01/far10301.htm> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

CHEN, Guangyu (2018). *Poly(lactic-co-glycolic acid) based double emulsion nanoparticle as a carrier system to deliver glutathione sublingually*. <<http://www.jbiomed.com/v03p0050.htm>> [consulta: 20 de juliol de 2019]

CIGNA (2017). *Diclofenac*. <<https://www.cigna.com/individuals-families/health-wellness/hw-en-espanol/medicamentos/diclofenac-d00848a3>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

DRAGLAND, sofia (2013). *HET-CAM test*. <<https://niom.no/het-cam-test/>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

[10] ELSEVIER (2014). *Antiinflamatorios*. <<https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-antiinflamatorios-X0213932414516582>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

[15] ESPINA, Marta (2016). Influence of freeze-drying and γ -irradiation in preclinical studies of flurbiprofen polymeric nanoparticles for ocular delivery using d-(+)-trehalose and polyethylene glycol. *Dove Press Journal*. <https://www.dovepress.com/search_results.php?search_word=influence++of+freeze-drying> [consulta: 28 de juliol de 2019]

GRANDIO, Alex (2018). *Els ulls humans tenen 13 parts amb funcions diferents*. <<https://catalunyadiari.com/ciencia-i-salut/ulls-humans-tenen-13-parts-funcions-diferents>> [consulta: 24 de març de 2019]

ISABEL, Marta (2018). Cromatografía de líquidos HPLC. <<http://laborioteccnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografia-de-liquidos-hplc>> [consulta: 25 de juliol de 2019]

LIMSA (2016). *Het Cam (test de irritación ocular)*. <<https://www.limsalab.com/het-cam-test-de-irritacion-ocular/>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

L'ull i la visió <<https://sites.google.com/a/xtec.cat/totcos/l-ull-i-la-visio>> [consulta 24 de març de 2019]

[1] MAJITO295 (2011). *Nanociencia y nanotecnología*. <<https://es.slideshare.net/majito295/nanociencia-y-nanotecnologia>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

MÉNDEZ, Ángeles (2011). *Potencial Zeta*. <<https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/potencial-zeta>> [consulta: 22 de juliol de 2019]

[2] MONTOYA, Leydy (2018). *Paul Ehrlich*. <<https://historia-biografia.com/paul-ehrlich/>> [Consulta: 12 de juny de 2019]

[7] MUIÑOS, Alfredo, BONAFONTE, Sergio. *Conozca y cuide sus ojos*. Barcelona: Editorial Labor, 1992

[4] Nanotec (2018). *¿Qué son las nanopartículas?*. <http://www.nanotec.es/que-son-las-nanoparticulas/#Nanoparticulas_a_base_de_carbono> [17 de març de 2019]

NANOVEX BIOTECHNOLOGIES (2017). *PLGA nanoparticles*. <<http://www.nanovexbiotech.com/858-2/>> [Consulta: 31 de març de 2019]

[11] NHS (2018). *Diclofenac*. <<https://www.nhs.uk/medicines/diclofenac/>> [Consulta: 7 d'abril de 2019]

NRQUELME (2013). *La vista (I): l'estructura*. <<https://naturalmentciencia.wordpress.com/2013/05/13/la-vista-i-estructura/>> [consulta: 24 de març de 2019]

[8] OFTALVIST (2018). *¿Qué es el epitelio corneal?*. <<https://www.oftalvist.es/blog/epitelio-corneal/>> [Consulta: 17 d'octubre de 2019]

[14] PHENOMENEX (2017). *¿Qué es el HPLC y cómo funciona?* <<https://phenomenex.blog/2017/12/18/que-es-la-hplc/>> [consulta: 25 de juliol de 2019]

PMC (2011). *Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347861/>> [Consulta: 31 de març de 2019]

SERRANO RUIZ, Alfredo (2018). *Medicaments*.
<https://www.infermeravirtual.com/cat/problemes_de_salut/tractaments/medicaments>. [Consulta: 7 d'abril de 2019]

[3] SINC (2014). *La primera 'bala mágica' del Dr. Ehrlich*.
<<https://www.agenciasinc.es/Multimedia/Fotografias/La-primera-bala-magica-del-Dr.-Ehrlich>> [Consulta: 12 de juny de 2019]

[5] SOLMEGLAS, Biotecnologia Laboratori (2018). *¿Qué son las nanopartículas? Tipos y propiedades de estas partículas*. <<https://solmeqlas.com/que-son-nanoparticulas-tipos/>> [consulta: 16 de març de 2019]

VIQUIPEDIA (2018). *Ful·lerè*.
<<https://ca.wikipedia.org/wiki/Ful%C2%B7ler%C3%A8>> [17 de març de 2019]

[12] VIQUIPÈDIA (2019). *Polidispersidad*.
<<https://es.wikipedia.org/wiki/Polidispersidad>> [consulta: 20 de juliol de 2019]

[9] WIKIPEDIA (2019). *Endotelio corneal*.
<https://es.wikipedia.org/wiki/Endotelio_corneal> [Consulta: 17 d'octubre de 2019]

7. AGRAÏMENTS

Amb aquest treball he après moltíssim i he realitzat tasques pròpies d'estudiants universitaris. Per a mi ha estat un privilegi i estic molt agraïda a tota la gent que m'ha ajudat amb el seu suport i dedicació i ho ha fet possible.

En primer lloc, gràcies a la meva tutora, que m'ha guiat i aconsellat en tot el que necessitava i més. Em va donar suport des del primer dia que li vaig demanar ajuda.

Seguidament, a la Victoria San Roman, que em va ensenyar a realitzar les nanopartícules.

Agraeixo l'ajuda i el suport d'en Gerard Esteruelas que em va ensenyar el funcionament de la màquina de HPLC i em va transmetre l'energia positiva i les ganes que s'han de posar a qualsevol cosa que em proposi.

Un agraïment molt especial a la meva professora i tutora, per el seu suport constant.

8. ANNEXES

ANNEX 1: % POTENCIAL DE LES NANOPARTÍCULES



Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

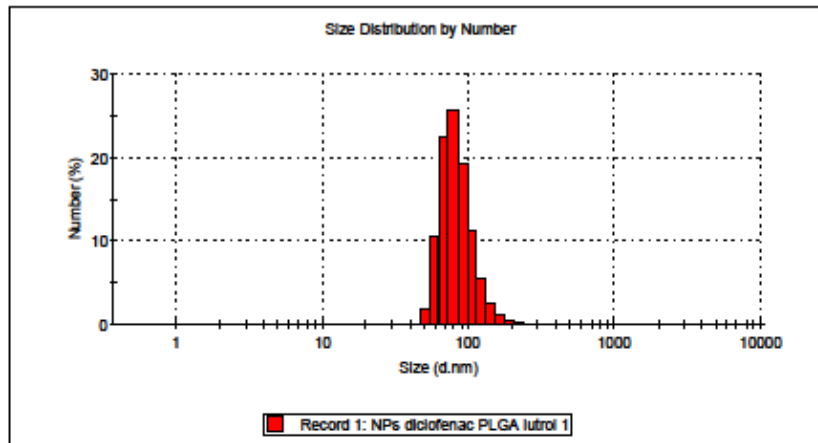
File Name: 19.07.2019 Dispersant Name: Water
Record Number: 1 Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,50 Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01 Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0 Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 290,2 Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 142,8	Peak 1: 134,8	88,5	46,14
Pdl: 0,308	Peak 2: 4284	8,8	1031
Intercept: 0,909	Peak 3: 1200	2,8	372,2





Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

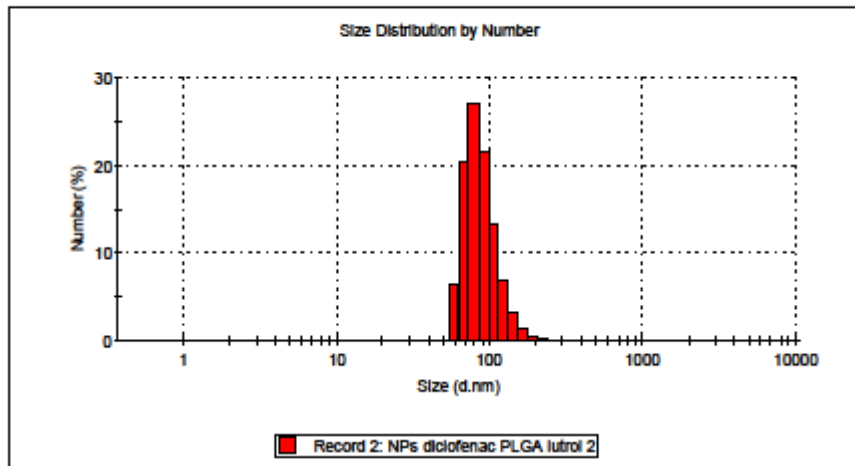
File Name: 19.07.2019	Dispersant Name: Water
Record Number: 2	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,50	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 298,9	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 148,8	Peak 1: 131,4	85,7	40,57
Pdl: 0,328	Peak 2: 4428	8,2	956,8
Intercept: 0,918	Peak 3: 1694	6,2	519,6





Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

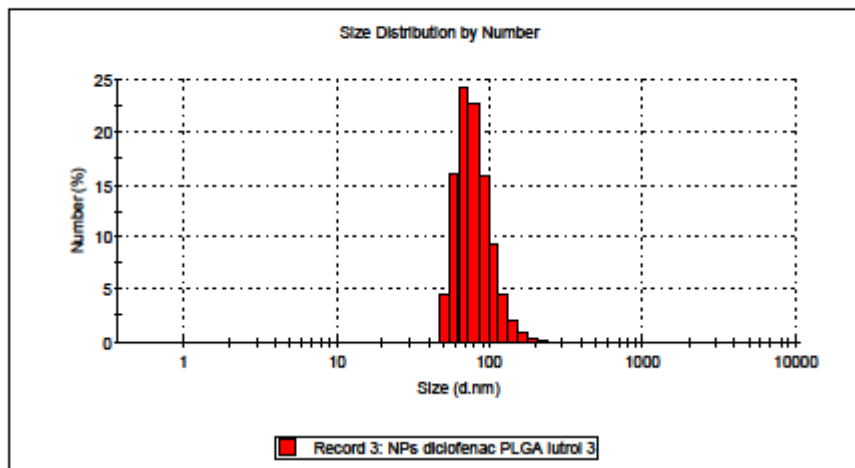
File Name: 19.07.2019	Dispersant Name: Water
Record Number: 3	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,50	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 302,3	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 10

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 155,4	Peak 1: 128,2	98,8	40,29
Pdl: 0,395	Peak 2: 5560	1,2	0,000
Intercept: 0,922	Peak 3: 0,000	0,0	0,000





Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol (orgànica) 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

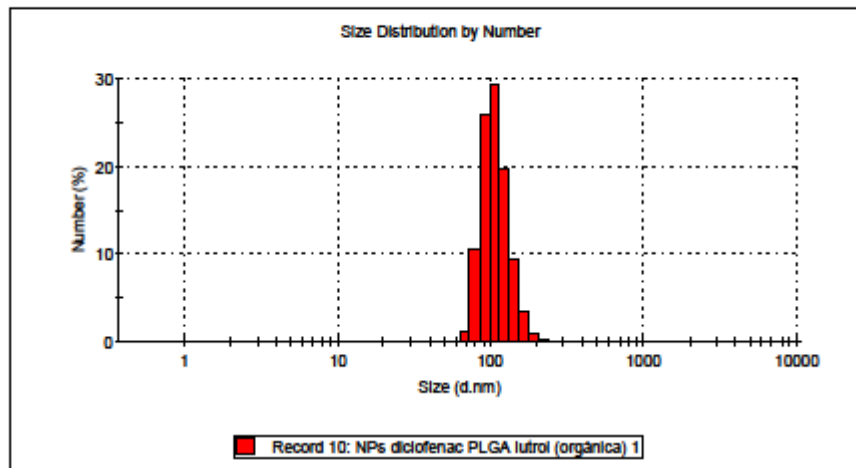
File Name: 19.07.2019	Dispersant Name: Water
Record Number: 10	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 213,2	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 9

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 148,0	Peak 1: 132,0	100,0	27,09
Pdl: 0,312	Peak 2: 0,000	0,0	0,000
Intercept: 0,947	Peak 3: 0,000	0,0	0,000





Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol (orgànica) 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

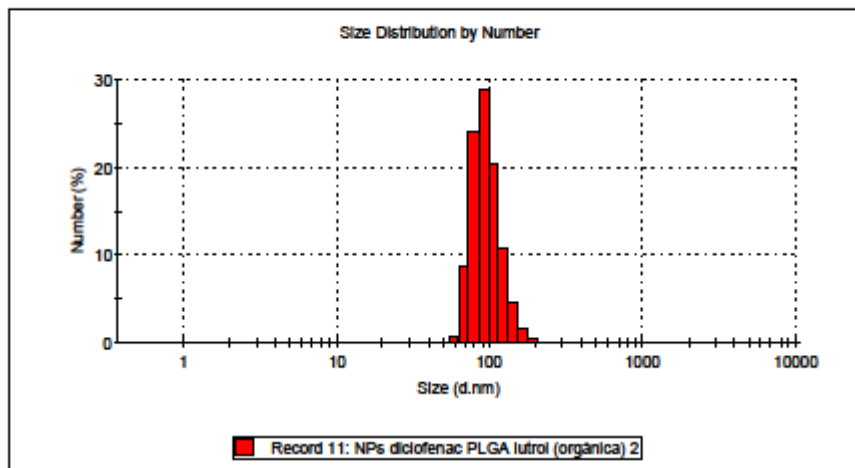
File Name: 19.07.2019	Dispersant Name: Water
Record Number: 11	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,50	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 215,8	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 0

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 154,3	Peak 1: 125,0	98,8	30,32
Pdl: 0,393	Peak 2: 5580	1,4	6,104e-5
Intercept: 0,947	Peak 3: 0,000	0,0	0,000





Size Distribution Report by Intensity

Sample Details

Sample Name: NPs diclofenac PLGA lutrol (orgànica) 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

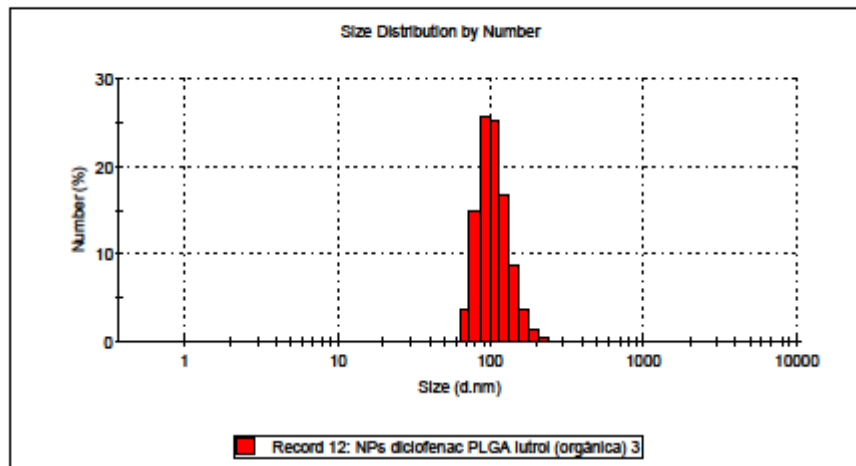
File Name: 19.07.2019	Dispersant Name: Water
Record Number: 12	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,01	Measurement Date and Time: viernes, 19 de julio de 2019...

System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 213,9	Measurement Position (mm): 4,65
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 9

Results

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 151,3	Peak 1: 141,5	95,9	35,44
Pdl: 0,271	Peak 2: 5181	4,1	484,1
Intercept: 0,949	Peak 3: 0,000	0,0	0,000



ANNEX 2: PROTOCOL DEL HET-CAM TEST

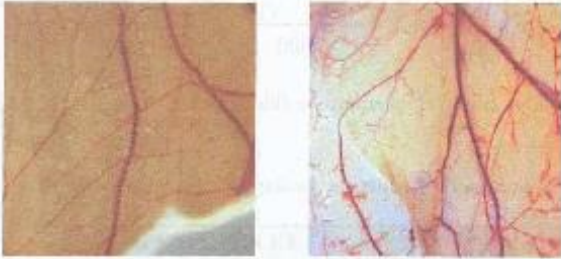
UNIVERSITAT DE BARCELONA

MASTER IN NANOSCIENCE AND NANOTECHNOLOGY
Nanoscopic systems for drug delivery

PRACTICE 3
OCULAR TOLERANCE OF NANOSPHERES
(HET-CAM) *dues 5 minuts*

1. OBJECTIVE OF THE PRACTICE.
To determine ocular tolerance of nanoparticles (lipid or polymeryc) by using the Hen's Egg Test Chorionallantoic Membrane (HET-CAM) to measure the potential eye irritation as an *in vivo* alternative method to *in vivo* Draize eye irritation test.

The HET-CAM has been shown to be a qualitative method of assessing the potential irritancy of chemicals. The CAM is a complete tissue containing arteries, veins and capillaries, and is technically easy to study. It responds to injury with an inflammatory process similar to what one would observe in the conjunctival tissue of a rabbit's eye. Its well-developed vascularization provides an ideal model for ocular irritation studies.



CAM (healthy) CAM (irritant product)

2. PRACTICAL PROCEDURE

2.1. Reagents and Products
Fertile, 9 day old white eggs
Sodium lauryl sulphate (SDS 1%)
NaOH (0.1M)
NaCl 0.9%

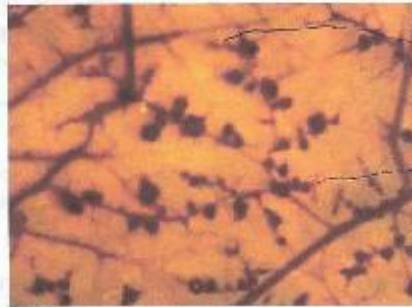
2.2 HET-CAM Procedure

In the HET-CAM test chemicals are placed in direct contact with chorioallantoic membrane of the hen's egg. The occurrence of vascular injury or coagulation in response to a compound is the basis for employing this technique as an indication of the likelihood that a chemical would damage mucous membranes (especially the eye) *in vivo*. This test mimics vascular changes in the chorioallantoic membrane, an analog for ocular conjunctiva.

The procedure test includes some phases:

- Preparation of the egg (carefully remove the egg shell, remove the whit membrane, moisten the membrane with 0.9% NaCl solution at 37°C without injuring any underlying blood vessels using the forceps. Remove the NaCl.
- The eggs are then dosed (300 µl of sample or controls) and observed continuously for 5 minutes for the appearance of hemorrhaging, lysis, and/or coagulation.

1



→ Hemorràgia
(zona opaca on
parl a les venes)
→ Coagulació



The potential ocular irritation can be calculated by the following expression:

$$IIO = \frac{(301 - H) \times 5}{300} + \frac{(301 - V) \times 7}{300} + \frac{(301 - C) \times 9}{300}$$

where **H** is the time (seconds) for haemorrhage (bleeding), **V** the time for vasoconstriction and **C** the time for coagulation

Classification of products according to the ocular irritation index (OII)

IIO	CLASSIFICATION
0 - 0.9	Practically non-irritating
1 - 4.9	Weakly irritant
5 - 8.9	moderately irritating
9 - 21	Irritant

3. QUESTIONS

- 1) What is the interest of the HET-CAM test for ocular administration?
- 2) What is the IIO and qualification of samples assayed?
- 3) Find one publication including the HET-CAM test, in the last five years. Include the reference and the paper attached

4. REPORT

1. Write a report of the practice (2 pages max) including the following sections: introduction, methods, results and discussion and conclusions
2. Answer the questions on section 3. Including attached the
3. Make an understandable video (less than 5 min) explaining the HET-CAM procedure

Send the report and the video to the following email address: csanchezlopez@ub.edu

ANNEX 3: ESTERILITZACIÓ

high-performance liquid chromatography (RP-HPLC; Waters, Milford, CT, USA) applying the following equation:

$$EE(\%) = \frac{\text{Total amount of FB} - \text{Free FB}}{\text{Total amount of FB}} \times 100 \quad (1)$$

The detection wavelength was set at 247 nm in the UV detector, reversed-phase C18 column 4.6x150 mm, using a mobile phase composed of water:acetonitrile (35:60, v:v) acidified with orthophosphoric acid (pH 2.5). A flow rate of 1 mL/min was used, and the retention time of the drug was at 3.2 minutes. Data analysis was done with the Empower Chromatography Software (Milford, MA, USA).

Freeze-drying process

The freeze-drying process was carried out in a Telstar Lyo-Beta freeze dryer (Telstar, Barcelona, Spain) equipped with Pirani and capacitance vacuum gauges. TRE or PEG3350-loaded FB-PeCL-NPs were prepared by adding 15 mL of protectant agent solution (TRE at 10% [w:v] or PEG3350 at 16% [w:v]) to the 15 mL FB-PeCL-NPs formulations. Then an aliquot of 3.0 mL was transferred to an 8 mL flat-bottom screw cap glass vial.

The freeze-drying cycle for FB-PeCL-NPs prepared with TRE was as follows: holding in precooling shelf at +10°C for 1 hour, a freezing at -50°C for 4 hours, a primary drying at -3°C/0.14 mbar for 12 hours, and a secondary drying at 42°C for 10 hours. The FB-PeCL-NPs prepared with PEG3350 were freeze-dried using the following cycle: holding in precooling shelf at 10°C for 1 hour, a freezing at -50°C for 4 hours, a primary drying at 5°C/0.14 mbar for 12 hours, and a secondary drying at 45°C for 10 hours. After freeze-drying, the samples did not show any sign of collapse and all the freeze-dried matrix was white and easily rehydrated by manual shaking. They were aqueous reconstituted in the initial volume (volume before addition of protectant solution) in order to recover the initial FB concentration.

Table 1 describes the composition parameters of the optimized freeze-dried NP formulations. The component's amounts were selected according to experiments satisfying

the demands required for eye drops in terms of low Z_{90} , low PI, high EE, appropriate osmolality, and high ZP.

Osmolality

The osmolality of ~50 μ L of each FB-PeCL-NPs formulation was measured by means of Advanced[®] Model 3320 Micro-Osmometer (Advanced[®] Instruments, Inc., Norwood, MA, USA).

γ -Irradiation sterilization

Freeze-dried FB-PeCL-NP powders were γ -irradiated using ⁶⁰Co as irradiation source (Aragogamma, Barcelona, Spain) and received a dose of 25 kGy. Although recent studies suggest the possibility to use lower irradiation dose previous to validation,²⁰ according to the European Pharmacopoeia, 25 kGy represents the adequate absorbed dose for the purpose of sterilizing pharmaceutical products when bioburden is not known.²⁰ Furthermore, it is considered a standard γ -irradiation dose recommended for terminal sterilization of medical products that maintain a valid sterility assurance level of 10⁻⁶.²¹

Rheological studies

Rheological properties of FB-PeCL-NPs suspension were evaluated at 25°C using a rotational rheometer HAAKE RheoStress 1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipped with a fixed lower plate and an upper cone plate, 2° (Haake C60/2° Ti, 6 cm diameter). Viscosity curves and flow curves were recorded for 3 minutes during the ramp-up period from 0 seconds⁻¹ to 100 seconds⁻¹, 1 minute at 100 seconds⁻¹ (constant shear rate period), and finally, 3 minutes during the ramp-down period from 100 seconds⁻¹ to 0 seconds⁻¹. All measurements were performed in triplicate.

Stability studies

The physical stability of the FB-PeCL-NPs suspension was assessed after 1 day, 7 days, 15 days, 21 days, and 30 days of storage at 4°C in a TurbiScanLab[®] (Formulation, L'Union, France). This instrument is able to detect destabilization, without dilution of the sample, much earlier than the operator's naked eye.⁴⁷ Each formulation (15 mL) was placed in a cylindrical glass measuring cell that was completely scanned by a pulsed near-infrared light source (λ =880 nm) with two

Table 1 Composition of the freeze-dried optimized NPs formulation

FB-PeCL-NPs	cFB (mg/mL)	cPeCL (mg/mL)	cPI88 (mg/mL)	cPA (mg/mL)
FD-NPsTRE	1.0	3.3	16.6	100
FD-NPsPEG	1.0	3.3	35.0	160

Notes: NPsTRE, formulation prepared with trehalose as a protectant agent; NPsPEG, formulation prepared with PEG3350 as a protectant agent.

Abbreviations: c, concentration; NPs, nanoparticles; FB, flurbiprofen; PeCL, poly(ϵ -caprolactone); PI88, poloxamer 188; PA, protectant agent; FD, freeze-dried condition.

ANNEX 4: FOTOGRAFIES



Facultat de Farmàcia UB



Laboratori UB



Material experiment
HET-CAM TEST (4.1)



Material experiment Elaboració de les
nanopartícules diclofenac (4.2)



Material experiment
Càlcul de la mida, IP, potencial zeta



Màquina HPLC