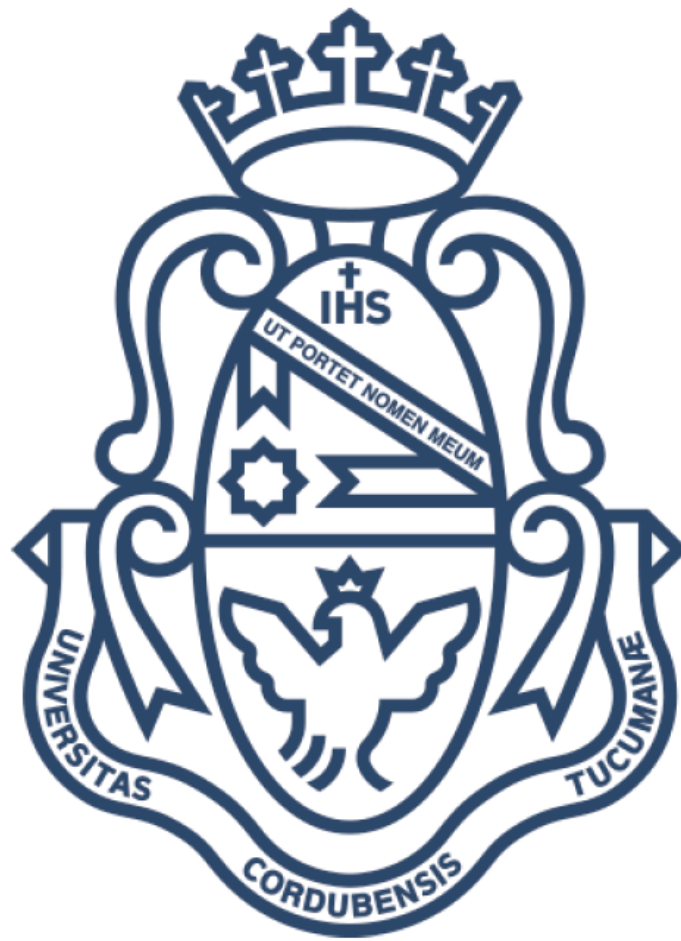


**Desarrollo de complejos Polielectrolito-
Fármaco y su utilización en el diseño de
sistemas de liberación modificada.**



Farm. Franco David Battistini

2015



FCQ
Facultad de
Ciencias Químicas



Universidad
Nacional
de Córdoba



1613 - 2013
400
AÑOS



Desarrollo de complejos Poliectrolito-Fármaco y su utilización en el diseño de sistemas de liberación modificada.

*Trabajo de tesis para acceder al grado de
Doctor en Ciencias Químicas de*

Franco David Battistini

Director

Prof. Dr. Ruben Hilario Manzo

Comisión Asesora

Prof. Dra. María Eugenia Olivera

Prof. Dra. Miriam Cristina Strumia

Prof. Dra. Nancy Fabiana Ferreyra

Evaluador externo

Prof. Dr. Julio Raba



Agradecimientos

Quisiera agradecer a aquellas personas que de alguna manera u otra han contribuido con la realización de esta tesis.

Al Dr. Manzo, director de esta tesis, por su paciencia y confianza en mí, por darme la posibilidad de trabajar con libertad y principalmente por brindarme su tiempo, conocimiento y experiencia desinteresadamente.

A la Dra. Olivera por formar parte de la comisión evaluadora, pero más allá de eso, por su incansable labor como guía y por todos sus aportes, comentarios, críticas y sugerencias.

A la comisión evaluadora, Dra. Strumia y Dra. Ferreyra por su constante y paciente seguimiento y asistencia, compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo de mi tesis.

Así mismo quiero agradecer al Dr. Raba por haber aceptado ser el evaluador externo.

A la Dra. Genti, la Dra. Flores-Martin y al Dr. Sanchez Bruni por haber aportado sus conocimientos y recursos.

Al Dr. Palma y al Dr. Tartara por haberse brindado incondicionalmente en este proyecto de tesis doctoral.

A las personas que estuvieron presentes en los días de laboratorio y que me han apoyado en esta etapa. A Álvaro, Fabiana, Daniel y Juan. A mis compañeros Ezequiel, Juan Pablo, Melisa, Liliana, Celeste, Florencia, Sonia, Mónica, Marina, Andrea, Carola, Laura, Carolina L, Joaquín, Verónica R, Carolina B, Daniela, Gabriela, Alejandro y Lina...simplemente gracias por todo.

A mi familia por estar siempre en los buenos y malos momentos. A mi madre y mi hermano, por apoyarme en cada decisión de mi vida y por su cariño. A mi padre que siempre se encuentra en mis pensamientos y en mi corazón. A él y a mi madre, simplemente gracias por educarme, enseñarme los buenos valores de la vida.

Resumen

El trabajo realizado en esta tesis doctoral está enmarcado en el área de tecnología farmacéutica. Comprende la preparación y evaluación químico-farmacéutica y biofarmacéutica de sistemas portadores de fármacos, constituidos por el bio polielectrolito Hialuronano (Hi) neutralizado con fármacos que poseen grupos básicos, para su aplicación en el diseño de sistemas portadores.

En una primera etapa se caracterizaron las propiedades de los complejos iónicos del Hi con los fármacos modelo Atenolol, Propranolol y Lidocaína utilizando la sal sódica comercial y la forma ácida del biopolímero.

Los complejos en dispersión acuosa fueron caracterizados mediante la determinación del pH, conductividad, potencial electrocinético y reología. Exhibieron constantes de formación (K_{pi}) con valores entre 10^4 y 10^6 . La cinética de liberación de los fármacos en celdas bicompartimentales demostró que los complejos se comportan como reservorios del mismo modulando su liberación en presencia de fluidos biológicos simulados.

Los complejos en estado sólido fueron caracterizados por FT-IR y difracción de rayos X de polvos. Se presentan como sólidos amorfos estables que son fácilmente redispersables.

Sobre la base de los resultados obtenidos, se abordó una segunda etapa en la cual fueron seleccionados fármacos susceptibles de formar complejos iónicos con Hialuronano y que pudieran contribuir a aumentar y/o ampliar sus propiedades terapéuticas. El grupo abarcó: Doxorrubicina (Dx), Verapamilo (Vr), Timolol (TM) y Bencidamina (Be).

El complejo Hi-Dx ensayado en cultivos de células neoplásicas, que sobreexpresan los receptores CD44, exhibió una eficacia 3 veces mayor en relación a Dx de referencia. Además el complejo ternario Hi-Dx-Vr ocasionó una mayor internalización de Dx a nivel intracelular respecto al complejo binario.

La evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular en conejos permitió describir los mecanismos por los cuales se aumenta la eficacia (inicio, intensidad y duración de la acción farmacológica) en relación a formulaciones convencionales.

Se obtuvo una formulación sólida estéril del complejo iónico Hi-Be cuya eficacia anti-inflamatoria en equinos está siendo evaluada en la Universidad de Tandil.

La experiencia acumulada sobre el Hi como polielectrolito portador permite contribuir a la plataforma tecnológica que sustenta su utilización en el diseño de sistemas portadores de fármacos.

Índice General

Capítulo 1: Introducción General

1.1. Introducción	3
1.1.1. Sistemas de liberación modificada de Fármacos: Aspectos generales	3
1.1.2. Tipos de Sistemas de liberación	6
1.1.3. Polielectrolitos como sistemas portadores de F	8
1.1.4. Esquema de investigación y desarrollo	12
1.1.5. Hialuronano como material portador	14
1.1.6. Marco en el que se desarrolla esta tesis	18
1.1.7. Objetivos generales	19
1.1.8. Objetivos específicos	19

Primera Parte

Capítulo 2: Caracterización de HiNa y HiH en dispersión acuosa

2.1. Introducción	23
2.2. Materiales y Metodologías	24
2.2.1. Mediciones de pH	24
2.2.2. Obtención del HiH a partir de HiNa	24
2.2.3. Titulación del HiH	25
2.2.4. Caracterización de Hi mediante Potenciometría Diferencial de Barrido	25
2.2.5. Determinación del grado de depolimerización mediante los grupos N-acetilo terminales	25
2.2.6. Mediciones reológicas	26

2.2.7. Depolimerización del Hi por HAsa	27
2.2.8. Electroforesis de los PE	28
2.3. Resultados y Discusión	29
2.3.1. Obtención del HiH a partir del HiNa	29
2.3.2. Caracterización por potenciometría diferencial de barrido del Hi	29
2.3.3. Caracterización reológica de las dispersiones	30
2.3.4. Depolimerización de Hi	33
2.3.5. Electroforesis de los PE	34
2.4. Conclusiones	35

Capítulo 3: Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

3.1. Introducción	39
3.2. Materiales y Metodologías	44
3.2.1. Metodología de preparación de los complejos	44
3.2.2. Mediciones de pH, conductividad y potencial electrocinético	45
3.2.3. Evaluación de la reversibilidad de la interacción: Efecto del agregado de sales neutras sobre los equilibrios de formación de pares iónicos	46
3.2.4. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F	46
3.2.4.1. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F mediante partición	46
3.2.4.2. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F mediante diálisis	47
3.2.5. Difracción de rayos X de los complejos Hi-F	48
3.2.6. Espectroscopia infrarroja de los complejos Hi-F	48
3.3. Resultados y discusión	48
3.3.1. El pH de las dispersiones	48
3.3.2. Potencial electrocinético y conductividad de las dispersiones	50

3.3.3. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F	51
3.3.3.1. En sistemas bifásicos solvente orgánico/ agua	51
3.3.3.2. En sistemas bifásicos agua/ agua	58
3.3.4. Reversibilidad del sistema: Efecto de la adición de otras especies sobre los equilibrios	61
3.3.5. Difracción de rayos X de los complejos Hi-F	64
3.3.6. Espectroscopia infrarroja de los complejos Hi-F	66
3.4. Conclusiones	71

Capítulo 4: Mecanismos y cinética de liberación de los fármacos desde los complejos Hi-F

4.1. Introducción	75
4.2. Materiales y Metodologías	77
4.2.1. Metodología de preparación de los complejos	77
4.2.2. Mediciones de pH	77
4.2.3. Estudios de liberación en celdas bicompartimentales	77
4.3. Resultados y Discusión	79
4.3.1. pH de las dispersiones	79
4.3.2. Liberación en agua y en solución de NaCl al 0,9%	79
4.4. Conclusiones	86

Segunda Parte

Capítulo 5: Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

5.1. Introducción	89
--------------------------	-----------

5.2. Materiales y Metodología	93
5.2.1. Metodología de preparación de los complejos	93
5.2.2. Mediciones de pH	93
5.2.3. Distribución de especies en las dispersiones mediante diálisis	93
5.2.4. Estudios de liberación en celdas bicompartimentales de difusión	94
5.2.5. Evaluación de los complejos Hi-Dx sobre cultivo celular	94
5.2.5.1. Cultivo celular	94
5.2.5.2. Preparación de las células	95
5.2.5.3. Ensayos de viabilidad celular/ ensayo de citotoxicidad	96
5.2.5.4. Microscopía de fluorescencia	97
5.2.5.5. Citometría de flujo	98
5.3. Resultados y discusión	100
5.3.1. Distribución de especies en las dispersiones mediante diálisis	100
5.3.2. Liberación <i>in vitro</i> de Dx desde los complejos Hi-Dx	101
5.3.3. Ensayo de viabilidad/ citotoxicidad celular	101
5.3.4. Microscopia de Fluorescencia	104
5.3.5. Citometría de flujo	106
5.3.6. Utilización complementaria de Vr	109
5.4. Conclusiones	111

Capítulo 6: Evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular

6.1. Introducción	115
6.2. Materiales y Metodología	117
6.2.1. Metodología de preparación de los complejos	117

6.2.2. Mediciones de pH y Osmolaridad	117
6.2.3. Liberación <i>in vitro</i> de TM desde los complejos Hi-TM	118
6.2.4. Evaluación de los complejos Hi-TM para el tratamiento de la presión intraocular	118
6.2.4.1. Animales de experimentación	118
6.2.4.2. Evaluación de la irritación <i>in-vivo</i>	118
6.2.4.3. Ensayo de mucoadhesión	119
6.2.4.4. Mediciones de presión intraocular	119
6.2.4.5. Estudios de permeación transcorneal	120
6.2.4.6. Análisis Estadístico	121
6.3. Resultados y discusiones	121
6.3.1. Distribución de especies en el equilibrio mediante diálisis de Hi-TM	121
6.3.2. Liberación <i>in-vitro</i> de TM desde los complejos Hi-TM	122
6.3.3. Ensayos <i>in-vivo</i> de irritación y mucoadhesividad	123
6.3.4. Ensayos de medición de presión intraocular	125
6.3.5. Estudios ex-vivo de permeación transcorneal	127
6.4. Conclusiones	128

Capítulo 7: Evaluación de los complejos Hi-Be en el tratamiento de la osteoartritis

7.1. Introducción	131
7.2. Materiales y Metodología	133
7.2.1. Metodología de preparación de los complejos	133
7.2.2. Mediciones de pH y Osmolaridad	134
7.2.3. Mediciones reológicas	134

7.2.4. Liberación <i>in vitro</i> de Be desde los complejos Hi-Be	134
7.3. Resultados y discusión	134
7.3.1. Liberación <i>in vitro</i> de Be desde los complejos Hi-Be	134
7.3.2. Obtención de la formulación final Hi-Be	135
7.3.2.1. Estabilidad de la formulación final Hi-Be	136
7.4. Conclusiones	137

Capítulo 8: Conclusiones generales y proyecciones

8.1. Conclusiones generales	141
8.2. Proyecciones	143

Referencia bibliográfica

Listado de Abreviaturas y Acrónimos

A549: Células adenocarcinómicas del epitelio basal del pulmón

ABC: Área Bajo la Curva

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AINES: Antiinflamatorio No Esteroideo

ARVO: Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología

ASC: Área Sobre la Curva

At: Atenolol

Be: Bencidamina

CD: Compartimento donador

CD44: *Cluster Differentiation 44*

CH: Ciclohexano

-COO⁻: Grupo carboxilato del Hialuronano

-COOH: Grupo carboxílico del Hialuronano sin disociar

CP_{ap}: Coeficiente de partición aparente

CP_v: Coeficiente de partición verdadero

CR: Compartimento receptor

Da: Dalton

DL₅₀: Dosis letal cincuenta

DMAB: p- dimetilamino benzaldehído

DMEM: Medio Dulbecco Modificado de Eagles

DMEM-F₁₂: DMEM enriquecido con Jam-F₁₂

DMSO: Dimetilsulfóxido

Dx: Doxorubicina

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

F: Fármaco

FAH: Fármaco ácido

FA⁻: Grupo ionizado del fármaco ácido

FANP: Fármaco Antineoplásico

FB: Fármaco básico

FBH⁺: Grupo protonado del fármaco básico

FBS: Suero Fetal Bovino

FDA: Administración de Drogas y Alimentos

FH⁺: Ácido conjugado de la base del fármaco

FIE: Fármaco Inhibidor del Proceso de Eflujo

FTIR: Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

Gli: Glicina

Gluc: Glucosa

HAsa: Enzima Hialuronidasa

Hi: Hialuronano

Hi-CD44: Complejo Hialuronano- *Cluster Differentiation 44*

HiH: Ácido Hialurónico

HiH-F: Complejo Iónico Ácido Hialurónico- Fármaco

HiH-Na-F: Complejo iónico ternario PE-F

HiNa: Hialuronato de sodio

HiNa_d: Hialuronato de sodio depolimerizado con HAsa

HiNa-F: Complejo iónico Hialuronato de sodio- Fármaco

HTR8 SVneo: Células trofoblásticas inmortalizadas con antígeno SV40 T

I+D: Investigación y Desarrollo

L: Litro

Li: Lidocaína

Log P: Lipofilicidad

M: Molaridad

mBar: mili Bares

mf: Mezcla Física

mOsm/L : medida de Osmolaridad, mili Osmolar por litro

mPa.s: Unidad de viscosidad, mili Pascal por segundos

MTT: 3 - (4,5 - dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio

mV: mili Voltios

mW: mili Wats

N: Normalidad

nm: nanómetros

OA: Osteoartritis

PBP: Azul de Bromofenol

PBS: Buffer Fosfato Salino

PDB Potenciometría diferencial de barrido

PE: Polielectrolito

PEA : Grupos ionizados del PE ácido

PEA⁻FBH⁺: Complejo iónico PE ácido- Fármaco básico

PE-A: Intensidad de Fluorescencia del Fluoróforo

PEAH: Polielectrolito ácido

PEB: Polielectrolito básico

PEBH⁺: Grupos protonados del PE básico

PEBH⁺FA⁻: Complejo iónico PE básico- Fármaco ácido

PE-F: Complejo polielectrolito- Fármaco

Pg-P: Glicoproteína- P

PIO: Presión Intraocular

pKa: Constante de disociación ácida

PM: Peso Molecular

Pr: Propranolol

QbD: *Quality by Design*

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RCOO-FH⁺: Pares iónicos Polielectrolito-Fármaco

RMMAH: receptor para la motilidad mediada por Hi

Rx: Difractometría de Rayos X de polvos

S/cm: Siemens por centímetro

SDPM: Matrices Polielectrolito - Fármaco hinchables

SPF: Sistema Portador de Fármacos

t_{1/2}: Semivida de eliminación

TM: Timolol Maleato

USP: Farmacopea de los Estados Unidos

UV: Ultravioleta

V: Voltios

Vr: Verapamilo

K_{esp}: Conductividad específica

K_i: constante de liberación del Fármaco

K_{pi}: Constante de Afinidad

λ_{Em}: Longitud de onda de emisión

Λ: Conductancia Estequiométrica (μS.cm²/M)

θ: Ángulo de incidencia de rayos X sobre la muestra

% p/v: Porcentaje peso en volumen

γ : Velocidad de corte (*Shear rate*)

η : Viscosidad

λ_{Abs} : Longitud de onda de absorción

$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$: Unidad de conductancia, micro Siemens por centímetro

ζ : Potencial electrocinético

Capítulo 1

Introducción General



1.1. Introducción

1.1.1. Sistemas de liberación modificada de Fármacos: Aspectos generales

Durante muchos años la investigación en el campo farmacéutico se enfocó en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad farmacológica, mediante procesos de síntesis y semisíntesis, principalmente. Encontrar nuevos fármacos (F) se ha convertido en un proceso difícil y costoso, por lo que las investigaciones se centraron en la modificación estructural de moléculas activas, con la intención de hacerlas más selectivas, potentes o con menores efectos adversos (Kaur G, 2015; Huttunen KM, 2011).

Desde hace algunos años, el número de medicamentos basados en moléculas nuevas que se introducen en la terapéutica, se mantiene estancado o incluso involuciona. Esta tendencia se explica por la muy baja proporción de sustancias bioactivas candidatas a convertirse en F que superan la etapa pre-clínica y son autorizadas para su utilización en medicina humana (Food and Drug Administration - FDA, 2014) (figura 1.1).

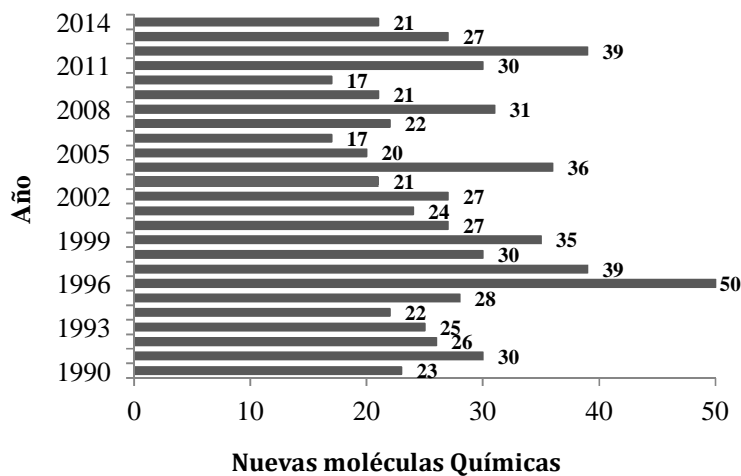


Figura 1.1: Evolución del número de medicamentos aprobados por la FDA basados en moléculas nuevas desde el año 1990 hasta 2014.

Con la evolución del conocimiento en los campos de la farmacotecnia, la farmacocinética y la biofarmacia, la atención se ha focalizado en atender problemas relacionados con la liberación del F, el sitio donde ejercerá su acción, la dosis y la vía de administración más adecuadas, contribuyendo a obtener sistemas de liberación de F más seguros, confiables y eficaces. En este contexto, la tecnología farmacéutica se ha concentrado

en el desarrollo de nuevos sistemas terapéuticos con el objeto de modular la oferta del F en el sitio de aplicación, en los sitios donde se produce la absorción o en el torrente sanguíneo. Con este propósito se utiliza una variedad de estrategias mediante portadores que transportan la especie activa o pro-fármacos que se bio-transforman, y que permiten por ejemplo, prolongar la acción medicamentosa mediante la liberación sostenida del F, liberar el F en un lugar específico para protegerlo, mejorar su absorción o la eficiencia de acceso al órgano blanco.

Los medicamentos que se obtienen a partir de esta tecnología son genéricamente denominados Sistemas Terapéuticos o Sistemas Portadores de Fármacos (SPF) (Arjun S, 2012). Los SPF constituyen diferentes alternativas farmacoterapéuticas con capacidad de transportar F hasta su sitio de absorción o de acción, de manera tal de elevar su seguridad, mejorar su confiabilidad y aumentar su eficacia.

Si pudiésemos imaginar el SPF ideal, este debería reunir dos requisitos fundamentales. Primero, utilizarse como una dosis única que perdure todo el tratamiento para evitar de esta manera el régimen posológico que generalmente es el punto más problemático. Segundo, debería liberar el F directamente en el sitio de acción, con el objeto de minimizar o eliminar los efectos secundarios indeseables y maximizar la concentración del F en el sitio blanco. En otras palabras, el objetivo de los SPF es controlar la liberación del F tanto espacial como temporalmente. Otros atributos deseables para un SPF son:

- Capacidad de adecuar y de mantener un control preciso de la velocidad de liberación del F (flexibilidad y precisión);
- Capacidad de mantener o aumentar la estabilidad del F;
- Que sea aplicable a una amplia variedad de F y formas farmacéuticas (versatilidad);
- Que en la medida de lo posible, se pueda producir a un costo razonable;
- Que permita obtener el resultado farmacoterapéutico deseado incluso frente a las variables fisiológicas como pH y movilidad gástrica, volumen de fluidos, alimentación, variabilidad interindividual, etc. (robustez), en el caso que el sistema fuese administrado por la vía oral.

Dentro de los SPF, los sistemas de liberación sostenida comprenden todos aquellos que producen la liberación del F de manera adecuada por un período prolongado de tiempo, y son normalmente los más utilizados en el diseño de nuevos sistemas terapéuticos. Si el

sistema permite mantener niveles constantes de F en sangre o en el tejido blanco, se lo considera como un sistema de liberación controlada, mientras que, si sólo logra extender la duración de la acción comparado con el suministro convencional, se lo considera como un sistema de liberación prolongada.

Los medicamentos que se utilizan actualmente son diseñados y elaborados utilizando criterios y procedimientos racionales dirigidos a satisfacer, entre otros, los requerimientos de óptima eficacia, máxima seguridad y confiabilidad; necesarios para contribuir a proveer la mejor garantía de calidad en un tratamiento farmacoterapéutico.

Existen diferentes aspectos de los F que influyen significativamente en el diseño de estos sistemas y determinan la selección de los materiales para el desarrollo de los mismos. Tales aspectos pueden ser de índole fisicoquímica o biológica. Entre los factores biológicos podemos citar la absorción, la vida media biológica, el metabolismo, el margen de seguridad y el efecto terapéutico. En cuanto a los factores fisicoquímicos, se debe considerar la solubilidad acuosa, el peso molecular (PM), la presencia de grupos ionizables, las propiedades ácido-base (pKa), las propiedades hidrofílicas y lipofílicas (log P), las características del sólido y la estabilidad (figura 1.2).

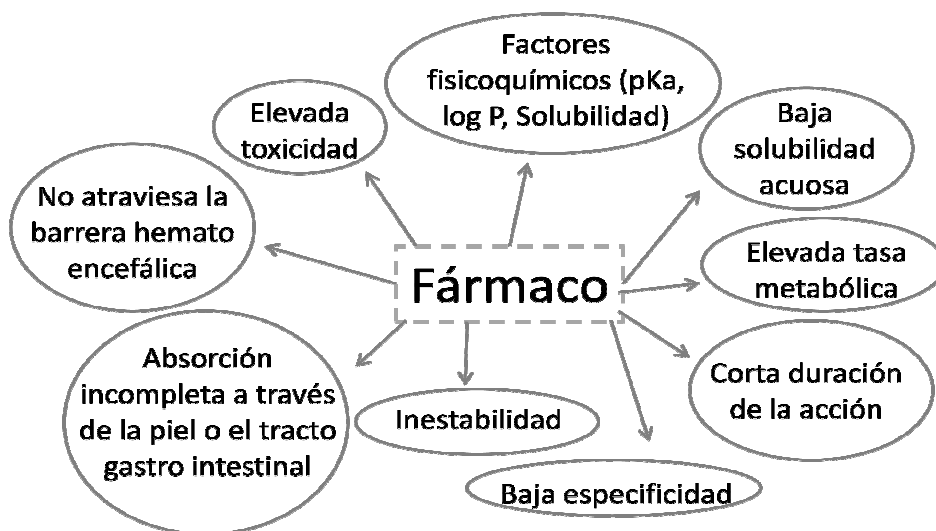


Figura 1.2: Potenciales problemas presentados por fármacos que limitan su utilización y pueden ser superados por estrategias farmacotécnicas.

La industria farmacéutica es reconocida como una de las más exigentes en cuanto al cumplimiento de estándares de calidad. Por tal razón, durante los últimos años se han enfocado los esfuerzos hacia la búsqueda e implementación de estrategias basadas en la gestión del conocimiento y en la gestión del riesgo en calidad, las que en conjunto se han consolidado en el concepto de calidad basada en el diseño (Quality by Design, QbD). La QbD fue propuesta inicialmente por la Food and Drug Administration (FDA) en el 2004, como parte de las iniciativas de aseguramiento de la calidad orientadas a construir la calidad de los productos desde el momento en el que estos son desarrollados y sus procesos de manufactura son establecidos. Todos los planteamientos de QbD buscan fundamentalmente el diseño de productos y procesos robustos; es decir, insensibles tanto a factores externos difíciles de controlar como a la variación transmitida por factores asociados a la formulación o a las condiciones de procesamiento. Así, este punto de vista aporta un avance significativo a la práctica habitual de evaluar la calidad durante el proceso de fabricación o en el producto final (QbT, Quality by Testing), permitiendo argumentar con evidencia y análisis las decisiones acerca de qué parámetros de producto y proceso deben ser controlados (Lawrence X, 2014).

1.1.2. Tipos de Sistemas de liberación

En la actualidad existe una apreciable cantidad de sistemas de liberación modificada de F para las diferentes vías de administración. Estos pueden presentarse bajo diferentes formas: como semisólido o dispersión (hidrogeles, geles, suspensiones, emulsiones, pomadas y ungüentos) y como sólido (particulado, multiparticulado o compactado). En todas ellas es posible aprovechar las ventajas que surgen de los materiales utilizados para la formación de los mismos de manera tal de adaptarlos perfectamente tanto a la vía de administración como a las necesidades terapéuticas. Estos sistemas inicialmente fueron diseñados para ser administrados por vía oral o transcutánea, sin embargo, con la evolución de la farmacotecnia y la tecnología farmacéutica se disponen de sistemas para diversas vías de administración tales como la inyectable, nasal, bucal, oftálmica, rectal e intrauterina (Caramella CM, 2015; Gajra B, 2014; Ibrahim MM, 2013; Trivedi JB, 2012).

Los sistemas sólidos para la administración oral de F, son los SPF más estudiados y desarrollados. Estos, se pueden clasificar de acuerdo con el mecanismo mediante el cual permiten la liberación del F (tabla 1.1):

Tabla 1.1: Tipos de sistemas sólidos de liberación modificada de F.

Tipo	Mecanismo	Características
Controlados por disolución	Liberación limitada por la velocidad de disolución del sistema.	Cinética de liberación de orden cero. Simulan una liberación controlada: sistemas con coberturas, pulsátiles, multicapas, etc. Se disuelve completamente en el sitio de aplicación. Facilidad y bajo costo de producción.
Sistemas de reservorio	Difusión controlada del F a través de una membrana inerte	El F está rodeado por una membrana de polímero que controla la velocidad de liberación. Cinética de liberación de orden cero. Velocidad de liberación variable con el tipo de polímero. Se puede remover desde los sitios de implantes. Dificulta la liberación de F de altos PM. Alto costo de producción. Potencialmente tóxico si falla el sistema.
Sistemas matriciales	Difusión del F a través de la matriz	Dispersión homogénea del F en una mezcla de polímeros bajo la forma sólida. Apto para liberar F de altos PM. Facilidad de producción. No se obtienen cinética de liberación de orden cero.
Bioerosionables	Liberación modulada del F por difusión controlada y por velocidad de disolución limitada.	Dispersión homogénea de F en una matriz erosionable. Similares ventajas de los sistemas de disolución. La remoción del sitio de implante no es necesaria. Dificultad del control cinético debido a la multiplicidad de los procesos involucrados. Se debe considerar la potencial toxicidad del polímero degradado.
Intercambio iónico	Liberación de F modulada por el intercambio con iones del medio.	El F se encuentra unido electrostáticamente a un polielectrolito entrecruzado insoluble en agua (resina). Apto para sustancias susceptibles al ataque enzimático. Se logran cinéticas de orden cero. Es dependiente de la presencia de iones en el medio de liberación.

1.1.3. Polielectrolitos como sistemas portadores de F

Los polielectrolitos (PE) utilizados como SPF son polímeros hidrofílicos que contienen grupos ionizables en su estructura, por lo que al ser dispersados en un solvente polar pueden disociarse generando cadenas cargadas (macroiones) y pequeños contraiones (Dan Hu, 2013). En contacto con el agua, las partículas sólidas de PE provocan el influjo por ósmosis, con el consecuente hinchamiento. Si la interacción entre el PE y el agua es favorable, puede disolverse o dispersarse homogéneamente. En general, el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas limita el grado de hidratación e hinchamiento, la velocidad de disolución y viscosidad resultante (Pissis P, 2013; Isaac T S, 2011; Chen S, 2010).

Sobre la base de la carga que generan en dispersión, los PE pueden clasificarse en aniónicos (que generan cargas negativas provistas por grupos carboxilatos, sulfonatos, sulfatos o fosfatos) y catiónicos (que generan cargas positivas generalmente provistas por grupos amino protonados).

La interacción proveniente de la atracción electrostática de un contraión hacia el PE, y la pérdida de la entropía translacional del contraión debido a su localización en la vecindad de la cadena del polímero generan la reacción de condensación. De acuerdo a la teoría de condensación de Oosawa-Manning (1971) (Tuszyński JA, 2004), los contraiones podrían dividirse en dos grupos, los “libres” y los “condensados”. Los libres se encontrarían disponibles para recorrer todo el volumen de la solución, mientras que los condensados se localizan alrededor de las cadenas del polímero, acomplejados con los grupos que presentan cargas eléctricas opuestas. La fracción del contraión libre es determinada por la energía requerida para alejarse del campo electrostático del PE, la cual es disminuida por la compensación parcial de las cargas del PE por el contraión, mientras que la fracción condensada se mueve junto con la macromolécula. La fuerza con la que un contraión se encuentra condensado depende de la afinidad que presente por el PE. Dicha afinidad estará condicionada por el tipo de unión que se establezca entre los componentes y su reversibilidad. Los F también pueden establecer interacciones de tipo hidrofóbicas con otras porciones del PE, favoreciendo la afinidad entre los mismos (Guzmán ML, 2012).

La interacción PE-F depende de la naturaleza y comportamiento del PE utilizado. Es por ello que es necesario determinar las características fisicoquímicas más relevantes de los PE con el objetivo de explotar al máximo sus potencialidades como sistema portador de moléculas contraiónicas.

1- Introducción General

En la actualidad, la tecnología farmacéutica ha desarrollado y utiliza numerosos sistemas para hacer aún más efectiva la farmacoterapia. Así mismo, existen antecedentes sobre sistemas que utilizan o son obtenidos a partir de PE como portadores de F (Islam SM, 2015; De Robertis S, 2014; Qing-Xi Wu, 2014; Ramirez Rigo MV, 2014; Pandey S, 2013; Arduso MS, 2010; Guzmán ML, 2012; Yan Hu, 2012; Hamman JH, 2010; Quinteros DA, 2008; Jiménez-Kairuz AF, 2005, 2003).

En la tabla 1.2 se presentan algunos ejemplos de los PE ácidos y básicos de uso corriente en tecnología farmacéutica, muchos de los cuales han sido ampliamente estudiados para su aplicación en terapéutica.

Tabla 1.2: Sumario de propiedades y aplicaciones de algunos PE de uso farmacéutico^(a).

PE Ácidos	Grupo Funcional	Ejemplos	Características	Aplicaciones y usos
Derivados del ácido poli-acrílico y metacrílico	-COOH	Carbomer	Sintético, homopolímero constituido por cadenas de ácido acrílico. El grado de entrecruzamiento origina las diferentes clases de Carbomer. Estabilidad térmica, viscosidad muy alta.	Usado en formulaciones líquidas y semisólidas como agente viscosante, para administración oftálmica y tópica en general. Como agente emulsificante en preparaciones aceite/agua. En comprimidos orales es usado como ligante tanto en compresión directa como en granulación húmeda.
	-COOH	Policarbofilo	Origen sintético de alto PM constituido por el ácido poliacrílico entrecruzado con divinil glicol. Absorbe grandes cantidades de agua.	Utilizado ampliamente en formulaciones de administración intravaginal debido a sus propiedades mucoadhesivas.
Derivados del Acido poli-metacrílico	-COOH	Eudragit L100	Copolímero aniónico constituido por el ácido metacrílico y metacrilato de metilo. Se disuelve a pH > 6.	Agente formador de cobertura entérica, resistente a fluidos gástricos, para administración oral.

Derivados de polisacáridos	-COOH	Ácido Algínico	Origen natural, estructura lineal, mezcla de β -(1-4)-D-ácido manosilurónico y β -(1-4)-L-ácido gulosilurónico. Peso molecular elevado. Pobre estabilidad térmica, viscosidad relativa media-alta.	Es usado como ligante-desintegrante en comprimidos. Como agente viscosante de suspensión en pastas, cremas y geles y estabilizante en emulsiones aceite/agua.
		Carboximetil celulosa	Homopolímero natural de carboximetil eter de celulosa, PM elevado. Buena estabilidad térmica, viscosidad relativa: baja-media.	Usado en formulaciones orales, tópicas y parenterales. Como agente viscosante de suspensión y estabilizante en emulsiones. Ligante-desintegrante en comprimidos.
Derivados de Polisulfonatos	RSO ₂ OH	Carrageninas (i,l,k)	Formados por unidades de galactosa y/o de anhidro galactosa. PM elevado. Solubles en agua caliente ($T > T_{\text{fusión}}$).	Gelificante, retenedor de humedad, espesante, agente de suspensión y estabilizante. Brinda al producto final: textura, cohesividad y consistencia.

PE Básicos	Grupo		Características	Aplicaciones y usos
	Funcional	Ejemplos		
Derivados del ácido poli-metacrílico	RN(CH ₃)	Eudragit® (-E, -RL, -RS, PO)	Copolímero sintético basado en dimetil-amino-etil-metacrilato. PM elevado. Soluble en medios ácidos.	Agente formador de coberturas soluble a pH gástrico. Agente ligante y relleno en comprimidos. Como formador de matriz en SPF para vía oral, transdermal y rectal.
Derivados de polisacáridos	RNH ₂ o RNHCOCH ₃	Quitosano	Polímero natural constituido por quitina parcialmente desacetilada. Estable térmicamente, de moderada a baja viscosidad relativa.	Utilidad en sistemas de liberación sostenida, bioadhesivos, promueve la absorción de F a través de las mucosas.

1- Introducción General

Derivados del polietileno

Mezcla de aminas 1°, 2° y 3°

Polietilimina

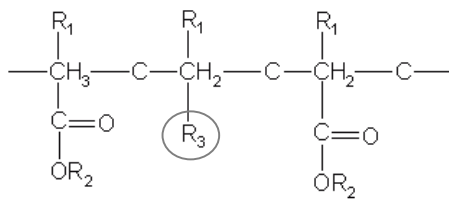
Polímero obtenido a partir de etilenimina. Puede ser lineal o ramificado. Las lineales son sólidas a temperatura ambiente, las ramificadas son líquidas.

Ingrediente cosmético para ajustar viscosidad, quelante de iones metálicos. Vector no viral para la transfección de genes, estabilizador de proteínas y desarrollo de biosensores.

^(a) Rowe RC, 2009

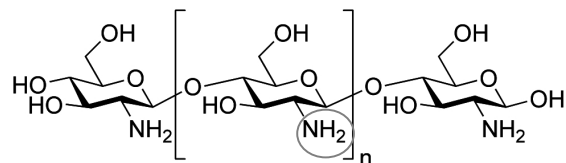
En la figura 1.3 se muestran las estructuras de los PE utilizados normalmente en el diseño de SPF a través de la interacción iónica entre los grupos ionizables de ambos contraiones. En círculo se resaltan los grupos ionizables tanto ácidos como básicos de las moléculas poliméricas.

Eudragit® L, S, RL, RS, PO

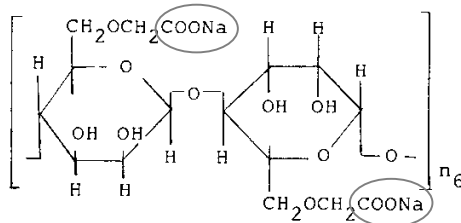


R1 = CH₃; H
 R2 = CH₃; CH₃CH₂
 R3 = COOH (Eudragit L y S)
 R3 = COOCH₂CH₂N(CH₃)Cl (Eudragit RL y RS)

Chitosan



Carboximetilcelulosa



Carbomer

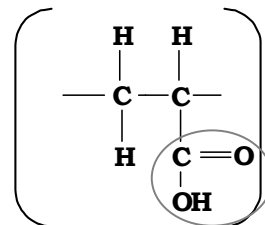


Figura 1.3: Estructuras monoméricas de algunos PE de uso farmacéutico con sus grupos ionizables. Los círculos indican los grupos ionizables de los PE.

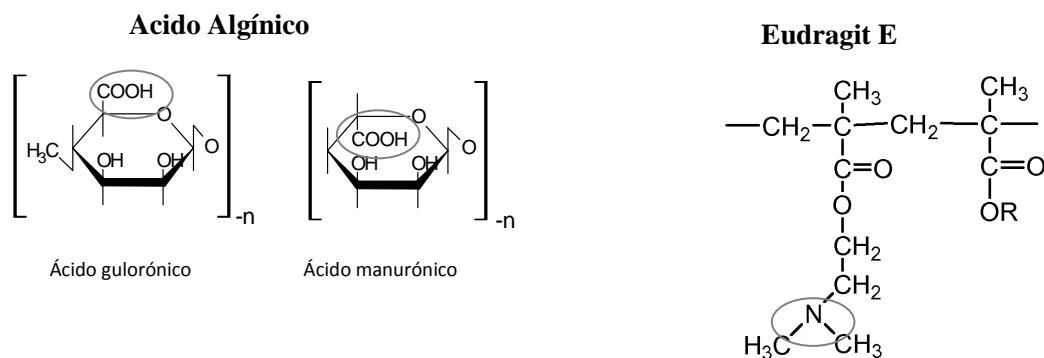


Figura 1.3 (cont.): Estructuras monoméricas de algunos PE de uso farmacéutico con sus grupos ionizables. Los círculos indican los grupos ionizables de los PE.

1.1.4. Esquema de investigación y desarrollo

Este proyecto de tesis doctoral se encuentra enmarcado en uno de mayor envergadura que se desarrolla en 3 niveles de experimentación (figura 1.5). A través del mismo se pretende adquirir gradualmente la capacidad científica y técnica para el desarrollo integral de sistemas farmacoterapéuticos, que permitan optimizar los atributos de F de reconocida utilidad, desde su concepción hasta la evaluación de sus propiedades de eficacia y seguridad.

En el NIVEL 1 se estudian las propiedades relevantes de los PE acomplejándolos con F modelo como moléculas contraiónicas. Las características adquiridas en este nivel nos servirán de utilidad para conocer las potencialidades del PE estudiado para ser utilizado como SPF. Conociendo las propiedades relevantes del PE, el NIVEL 2 comprende la selección de F de reconocida actividad farmacoterapéutica a los cuales se les pueda mejorar alguna propiedad desfavorable tras la incorporación en SPF. También está involucrado en este nivel el desarrollo y optimización de la metodología de obtención de los sistemas de liberación de F, y su caracterización física, fisicoquímica y biológica. Una vez obtenidos los sistemas de liberación de F, se procede a la evaluación de sus propiedades biofarmacéuticas a niveles *in-vitro*, *ex-vivo* o *in-vivo* en animales de experimentación.

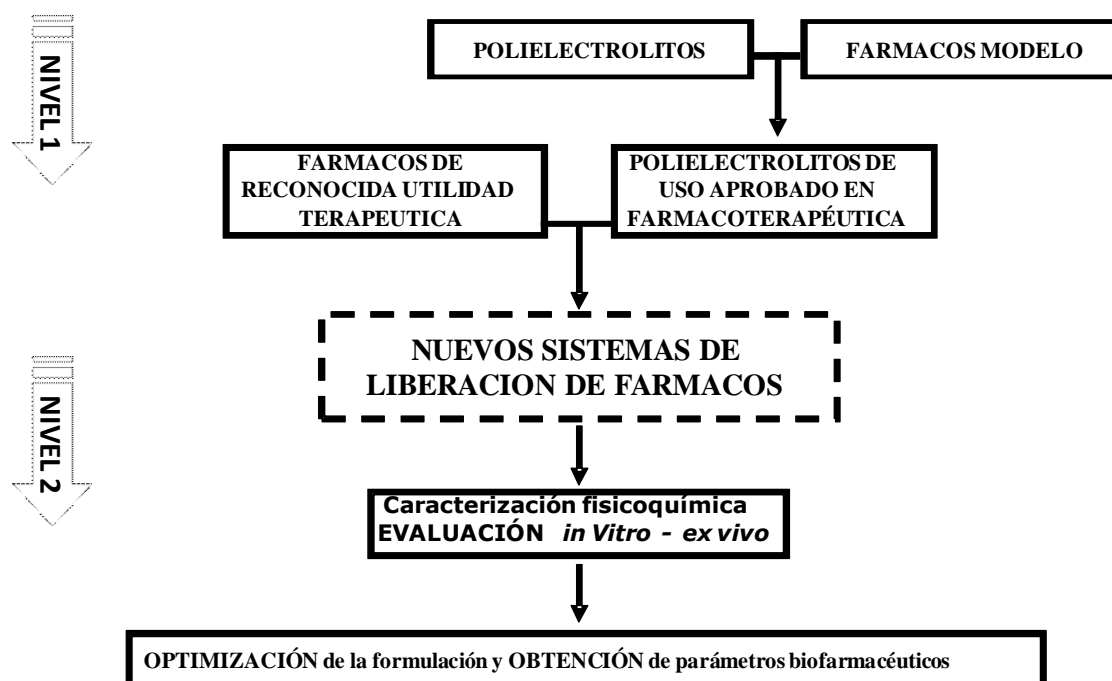


Figura 1.5: Esquema de I+D realizada en el grupo de investigación, mostrando los diferentes niveles de trabajo.

En los últimos años nuestro grupo de investigación en tecnología farmacéutica ha desarrollado una estrategia de I+D sobre sistemas portadores de F para distintas categorías terapéuticas. Esto nos ha permitido consolidar una plataforma tecnológica original, basada en la interacción ácido-base entre un PE y F ionizables de carga opuesta, sobre cuya base se diseñan sistemas de liberación modificada de F para atender situaciones farmacoterapéuticas específicas. Estos sistemas permiten mejorar la efectividad, seguridad y confiabilidad de la acción medicamentosa de F de reconocida utilidad terapéutica.

Por un lado, se han desarrollado sistemas de liberación modificada constituidos por complejos PE-F en dispersión acuosa. Estos sistemas pueden formar hidrogeles estables y, entre otras ventajas, son capaces de liberar al F a una velocidad controlada y sostenida en presencia de fluidos biológicos, principalmente mediante un mecanismo de intercambio iónico (Quinteros DA, 2008).

El estudio del comportamiento de las dispersiones del PE con los F mostró que el equilibrio de condensación iónica no es afectado por la presencia de no electrolitos en el

medio (Jimenez-Kairuz AF, 2003) ni por el efecto de dilución y a su vez puede ser parcialmente desplazado por la adición de sales. Se ha observado un aumento en la solubilidad aparente de F ácidos y básicos poco solubles vehiculizados en dispersiones PE-F (Zoppi A, 2012; Jimenez-Kairuz AF, 2004). Por otra parte se demostró que es posible proteger al F de la degradación química (Esteban S, 2009). Además, estos sistemas presentan propiedades reológicas favorables para su aplicación por vía tópica y potencian la acción antimicrobiana frente a gérmenes resistentes (Romero VL, 2012).

El estudio de las formas sólidas compactadas permitió definir una nueva clase de matrices denominadas matrices hinchables PE-F (SDPM, por sus siglas en inglés) (Sekhar EC, 2014; Vijay P, 2009). En las SDPM, a diferencia de los sistemas matriciales convencionales, el PE y el F forman una única entidad molecular, de modo que las moléculas del mismo están homogéneamente distribuidas en la masa de la matriz, proporcionándole propiedades particulares que pueden ser explotadas tanto para el diseño de sistemas monolíticos (comprimidos) como de sistemas multiparticulados de liberación modificada.

Se han obtenido SDPM a partir de una amplia variedad de PE aniónicos: Carbomer (Jimenez-Kairuz AF, 2008), Ácido Algínico - Alginato de sodio (Ramirez Rigo MV, 2009), Eudragit L100 (Ardusso MS, 2010), carboximetilcelulosa (Ramirez Rigo MV, 2009) y catiónicos: Eudragit E100 (Quinteros DA, 2010). Se estudiaron integralmente las propiedades de relevancia farmacotécnica y biofarmacéutica de los materiales obtenidos y se definieron los mecanismos que gobiernan la liberación del F desde estos sistemas.

1.1.5. Hialuronano como material portador

Para este trabajo de investigación, la selección de los polielectrolitos se basó en criterios tales como: naturaleza, biocompatibilidad, ausencia de toxicidad comprobada, disponibilidad, impacto en su utilización y características hidrofílicas. Por ello, de la lista de posibles candidatos el Hialuronano (Hi) fue el elegido (De Robertis S, 2014; Schanté CE, 2011; Ju-Jin Jin, 2010). Además de sus características intrínsecas, el Hi posee la capacidad de ser formulado para la administración parenteral, ya sea endovenosa como también local, intramuscular o intraarticular (Luana T, 2012; Schanté CE, 2012).

El Hi es la forma genérica con que se designa tanto al Ácido Hialurónico (HiH) como a su sal sódica (HiNa). Es un heteropolisacárido natural que se encuentra ampliamente distribuido en el organismo, principalmente en la matriz extracelular. Está formado por

unidades de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina, constituido por una unidad repetitiva $[-4)\text{-}\beta\text{-D-glucuronopiranosil-}\beta(1\text{---}3)\text{-}2\text{-acetamido-}2\text{-dexosi-Dglucopiranosido-(}1]$ (figura 1.4). Su PM puede llegar a valores en el orden de 10^7 Da. Pertenece a la familia de los glicosaminoglicanos y es el único de ellos que no se encuentra sulfatado, lo que le confiere la posibilidad de formar cadenas de muy alto PM. El Hi posee grupos carboxílicos en su estructura (carbono 5 del ácido glucurónico), los cuales le confieren su característica de PE ácido (Mero A, 2014; Brown MB, 2005; Hascall VC, 1997).

Hi tiene la capacidad de absorber más de 100 veces su peso en agua y es biocompatible, biodegradable, no inmunogénico, no tóxico, no inflamatorio y mucoadhesivo (Arpicco S, 2014; Brown MB, 2005; Hascall VC, 1997). Es por todas estas propiedades que se puede pensar al Hi como un excelente candidato como portador de F conteniendo grupos básicos en su estructura. Comercialmente se dispone del HiNa, la cual puede ser obtenida de diversas fuentes (Lago-Mendoza G, 2007).

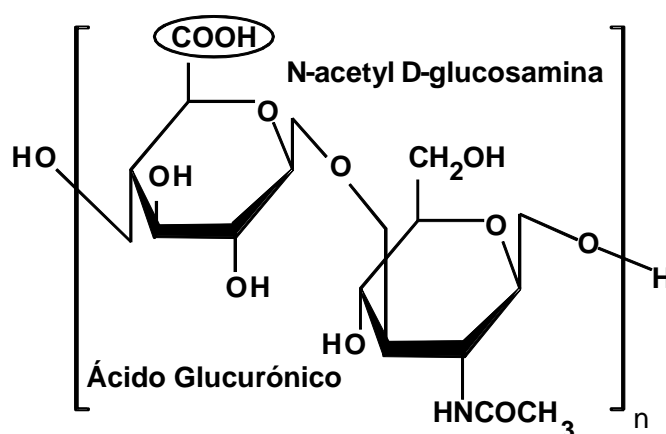


Figura 1.4: Estructura química de la unidad dimérica del ácido hialurónico.

El Hi posee estructura primaria, secundaria y terciaria. La estructura primaria está dada por la secuencia monosacáridica del dímero constituido entre el ácido glucurónico y la N-acetilglucosamina. La estructura secundaria, se establece por las interacciones intramoleculares mediante puentes de hidrógeno (5 en total), provocando que la cadena lineal del polisacárido se pliegue y forme una doble hélice. La estructura terciaria está caracterizada por tres posibles puntos de contacto intermolecular que son: 1) cadenas antiparalelas unidas a grupos hidrófobos, 2) cadenas paralelas unidas mediante interacciones puente de hidrógeno

y 3) cadenas entrecruzadas que interaccionan por puente de hidrógeno e interacciones con los posibles centros hidrófobos (Mero A, 2014; Hascall VC, 1997).

En la tabla 1.3 se resumen algunas propiedades fisicoquímicas de interés del Hi.

Tabla 1.3: Propiedades fisicoquímicas del Hi.

	HiNa	HiH
Peso Equivalente (g/mol)	401	378
pKa	2,5 - 4	2,5 - 4
pH (0.5% p/v)	6,5	2,8
Peso Molecular	1700 KDa ^(a)	Variables ^(b)
Viscosidad (0.5% p/v)	≅ 110 mPa.s (100 rpm)	≅ 2 mPa.s (100 rpm)
Toxicidad^(c)	DL ₅₀ (ratón, IP): 1,5 g/kg, DL ₅₀ (conejo, IP): 1,82 g/kg, DL ₅₀ (rata, IP): 1,77 g/kg	

(a) HiNa adquirido comercialmente (Parafarm®). (b) Obtenido por resina de intercambio iónico. (c) Handbook of Pharmaceutical Science.

El Hi tiene una estructura que exhibe una amplia gama de efectos biológicos, dada por su capacidad hidratante, acción antiinflamatoria, cicatrizante, entre otros (Huang Z , 2014; Abate M, 2014). Durante la última década se ha demostrado que participa en un grupo de eventos que contribuyen en el comportamiento y fisiología de las células tales como: movimiento, crecimiento, división y diferenciación, remodelación del tejido, inflamación y tumorigénesis (Dicker KT, 2014). Asimismo, se determinó que Hi no forma enlaces covalentes con las proteínas, sin embargo, las células responden directamente al Hi por medio de proteínas de la superficie celular que se unen al mismo: las hiadhelerinas, el receptor *Cluster Differentiation 44* (CD44) y el receptor para la motilidad mediada por Hi (RMMAH) (García Posadas L, 2014; Nikitovic D, 2013).

El receptor CD44 de gran especificidad hacia Hi, es una proteína integral de la membrana. Se sabe que está implicado en la regulación del desarrollo de tumores y con el potencial metastático celular (Song S, 2014; Maytin EV, 2004). Este receptor despertó el interés de los científicos debido a que se encuentra sobreexpresado en las células tumorales (Song, S, 2014). Esto alentó el diseño de sistemas de administración parenteral de F tales como la doxorubicina y paclitaxel utilizando Hi como portador para direccionar el tratamiento hacia la diana debido a la selectividad y especificidad del Hi por su receptor

(Song, S, 2014; Hirakura T, 2010). Complementariamente se determinó que la interacción Hi-CD44, además de ser útil para el direccionamiento de la farmacoterapia antineoplásica hacia la masa tumoral, podría utilizarse para promover la penetración del F antineoplásico hacia el interior de las células. Se ha demostrado que liposomas conteniendo Hi generan un aumento de la captación celular del mismo a través de los receptores CD44 mediante un mecanismo complejo de señalizaciones intracelulares que culminan con la endocitosis del complejo Hi-CD44 (Skandalis SS, 2014; Bourguignon LY, 2014; Qhattal HS, 2011).

A nivel clínico, Hi es utilizado ampliamente en distintos campos tales como ortopedia, oftalmología, oncología, dermocosmética y como agente de diagnóstico. En la tabla 1.4 se resumen algunas de las aplicaciones de este polímero.

Tabla 1.4: Principales usos de Hi en la clínica ^(a) y nombres comerciales ^(b)

Aplicaciones	Usos	Nombres comerciales
Como componente de cremas y geles	Se emplea en el tratamiento del Escleroderma Sistémico Localizado/ Humectante. Ampliamente usado en cosmética.	CELLSKINLAB EYE CREAM®
Para el tratamiento de gingivitis, sangrado gingival y retracción gingival	Como enjuague bucal. Restablece la salud de las encías, favoreciendo la cicatrización y aliviando la inflamación de los tejidos bucales	ODDENT®
Como lubricante en el síndrome de ojo seco	Se emplea en solución salina isotónica o propilenglicol. En forma de gotas oftálmicas en concentraciones del 0.25-0.5%.	DROPSTAR®
Para el tratamiento de la osteoartritis de articulaciones	Lubricante, antiinflamatorio y analgésico. Ampliamente utilizado en humanos y animales. Jeringas estériles pre llenadas para ser administrada interarticularmente.	ARTIFLEX® MAXIOSTENIL®
Para el tratamiento de enfermedades vaginales	Se ha empleado de forma tópica como hidrogel, mediante el cambio de equilibrio de la flora bacteriana vaginal para la prevención y tratamiento terapéutico de daños causados por suministro de estrógeno.	CYSTISTAT®

**Aplicación durante
procesos
quirúrgicos**

Aplicado como dispersión previene la adhesión en superficies tisulares en el momento de la intervención. Promueve la cicatrización del tejido.

**IURONICO
BIOTIC®**

^(a) Lago-Mendoza G, 2007; ^(b) Alfa-beta SASyF

1.1.6. Marco en el que se desarrolla esta tesis

El Hi es ampliamente utilizado en medicina humana y veterinaria (Ju-Jin Jin, 2010). En la actualidad, un interesante número de publicaciones científicas informan sobre el uso de sistemas conteniendo Hi derivatizado o modificado con el fin de mejorar, entre otros aspectos, la vida media biológica del PE o su nivel de entrecruzamiento. Estos sistemas se producen generando enlaces covalentes entre el Hi y agentes entrecruzantes de distinta naturaleza o F, formando así estructuras superiores de gran complejidad (Song S 2014; Serafino A 2011; Shuang SA 2010). Como consecuencia de esto, los mencionados sistemas surgen de procesos complejos de síntesis, involucrando numerosos pasos para su obtención. En otros casos utilizan Hi como SPF formando sales para el tratamiento del dolor. Doherty MM obtuvo complejos iónicos estables y reversibles entre la lidocaína y Hi de PM medio que permitió la prolongación de la analgesia epidural cuando se inyecta en el espacio epidural en conejos (Doherty MM, 1995), aunque este efecto no se observó en perros (Doherty MM, 1996). Asimismo se reportaron artículos en donde se utiliza el Hi como SPF para el tratamiento de patologías oculares (Lin T, 2015; Saettone MF, 1991). Además, en este campo se registró una patente que cubre formulaciones oftálmicas basadas en las denominadas sales de Hi con F para la terapia ocular (Della Valle F, 1995).

En la frondosa bibliografía sobre el Hi no se encuentra descripta su utilización como sistema portador de F mediante la formación de complejos iónicos reversibles Hi-F. Nuestra hipótesis es que los sistemas Hi-F podrían presentar propiedades fisicoquímicas, biofarmacéuticas y biológicas favorables tales que permitirían obtener sistemas de liberación modificada con potencial utilidad para las vías inyectable y tópica. El objetivo general de este trabajo es estudiar Hi para obtener materiales portadores constituidos por la interacción iónica entre el Hi y F contraiones. En este contexto se abordarán 2 etapas, 1- el estudio de Hi con F modelos para obtener información relevante que nos permita identificar situaciones terapéuticas en las que los sistemas podrían ser de utilidad. 2- el desarrollo de nuevos sistemas con potencial utilidad terapéutica ya sea en medicina humana o veterinaria.

1.1.7. Objetivos generales

Centrándonos en la plataforma de investigación de nuestro grupo de investigación, el cual se basa en la obtención de materiales PE-F productos de la neutralización de PE con F ionizables de potencial utilidad en el diseño de sistemas de liberación modificada de F, nos proponemos para el presente trabajo de tesis:

- Investigar las potencialidades farmacoterapéuticas del bio-poli-electrolito, Hi como portador de F básicos, mediante la preparación de complejos iónicos.

1.1.8. Objetivos específicos

- **Primera Etapa:**

1. Caracterizar por métodos fisicoquímicos los productos Hi-F en dispersión y en estado sólido utilizando F modelo.
2. Evaluar las propiedades de interés farmacoterapéutico que nos permitan definir la utilidad del Hi en el diseño de sistemas de liberación modificada.

- **Segunda Etapa:**

1. Evaluar el complejo Hi-F en situaciones de interés farmacoterapéutico en el que el sistema portador pudiera contribuir a aumentar la eficacia y seguridad de los tratamientos.

Primera Parte



Capítulo 2

*Caracterización de
HiNa y HiH en
dispersión acuosa*



2.1. Introducción

El uso de Hi se encuentra aprobado para diferentes propósitos, y sus propiedades se encuentran descritas en bibliografía de referencia (*European Pharmacopoeia 6th edition; Handbook of pharmaceutical Excipients 6th edition*). El Hi puede ser obtenido a partir de fuentes naturales o por métodos fermentativos empleando microorganismos del género *Streptococcus zooepidemicus*. Las fuentes naturales más frecuentemente utilizadas son las crestas de gallo, el cordón umbilical humano, glándula submaxilar bovina y la zona de maduración de los condrocitos. Respecto a los métodos fermentativos, los más novedosos se basan en la inmovilización de células o enzimas, en la que el componente activo, como es el microorganismo, se encuentra microencapsulado produciendo Hi de alta masa molar en condiciones adecuadas de pH, temperatura, agitación etc. Estos métodos son convenientes ya que permiten estandarizar fácilmente las condiciones para así obtener grandes cantidades de producto y con alta pureza. Por otro lado, esta técnica genera Hi sin la presencia de residuos animales, como por ejemplo proteínas, que pudieran ser inmunogénicos tras su utilización (Lago-Mendoza G, 2007).

Como se señaló previamente, este polímero es utilizado en formulaciones oftálmicas como agente viscosante y mucoadhesivo (Wu Y, 2013; Rah MJ, 2011), también se utiliza ampliamente en la industria cosmética y en la clínica principalmente como agente para el tratamiento de la osteoartritis debido a sus excelentes propiedades de relleno y lubricación en las articulaciones (Fakhari A, 2013; Migliore A, 2008; Gomis A, 2007). Aprovechando sus características intrínsecas, y su capacidad como SPF, es interesante pensar en formulaciones conteniendo sistemas farmacoterapéuticos Hi-F de administración parenteral.

Hasta la actualidad, no se disponía de experiencia respecto al uso y manipulación del Hi, por este motivo fue de nuestro interés generar conocimiento acerca de la correcta utilización de este PE. Si bien Hi se comercializa como su sal sódica, nos planteamos como objetivo obtener la especie ácida del Hi debido a que a partir de éste se generan dispersiones de pH, viscosidad y pureza iónica diferentes respecto al HiNa, con el fin de realizar estudios comparativos entre ambas especies del PE. Por tal motivo nos propusimos encontrar y estandarizar un método adecuado para la obtención de la especie protonada del Hi que sea reproducible y conveniente. Por otro lado nos propusimos determinar la cantidad de grupos ionizables del Hi así como también su pureza iónica y las características reológicas de las dispersiones.

2.2. Materiales y Metodologías

Los siguientes materiales fueron utilizados: HiNa obtenido a partir de la fermentación bacteriana (PM = 1655 kDa), (Parafarm®, de Droguería Saporiti S.A.C.I.F.I.A, Bs.As., Arg.), enzima Hialuronidasa (HAsa) testicular bovina (Sigma-Aldrich 801 UI/mg - St Louis, USA), ambos fueron utilizados sin procesamientos posteriores. Para las mediciones reológicas, se utilizó Glicina pro análisis (Cicarelli Laboratorios, Arg), Cloruro de Sodio pro análisis (Cicarelli Laboratorios), y una solución al 0,9% p/v de Cloruro de Sodio pro análisis. Para las determinaciones colorimétricas, el procedimiento fue el siguiente: una solución de borato de potasio se preparó disolviendo 4,94 g de ácido bórico (Parafarm®) y 1,98 g de hidróxido de potasio (Cicarelli Laboratorios) en 100 mL de agua deionizada. Además, una solución de p-dimetilamino benzaldehído (DMAB, reactivo de Ehrlich, Sigma-Aldrich) de concentración 0,1 g/mL se preparó disolviendo 5,0 g DMAB en 6,25 mL de HCl 12 M (Cicarelli Laboratorios) y se completó hasta un volumen final de 50 mL con ácido acético glacial (Anedra®, Arg). Esta solución fue diluida 10 veces con ácido acético glacial previo a su uso. El buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés) se preparó a partir de 0,28 mg/mL de fosfato dibásico de sodio y 0,64 mg/mL de fosfato monobásico de potasio (Cicarelli Laboratorios). El pH de la solución final fue regulado a $6,80 \pm 0,05$. Para la electroforesis se utilizó buffer PBP (Azul de bromofenol al 0,02% y Sucrosa 2M (Sigma Aldrich, USA)) en una concentración de 2 mg/mL, acrilamida y bis-acrilamida al 15% (Sigma Aldrich, USA), persulfato de amonio (Sigma Aldrich, USA), N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina 1X (TEMED, Sigma Aldrich, USA), buffer tris acetato EDTA (Sigma Aldrich, USA).

En todos los casos se utilizó agua deionizada para la obtención de las dispersiones.

2.2.1. Mediciones de pH

Se utilizó un pH-metro Mettler Toledo Seven Multi equipado con electrodo combinado de Ag/AgCl (Mettler Toledo DG 115-SC). Las mediciones se realizaron sobre muestras homogéneas a temperatura ambiente. El equipo fue calibrado con buffers de pH estándar (4,0; 7,0 y 10,0) previo a su utilización.

2.2.2. Obtención del HiH a partir de HiNa

Para obtener el HiH se eluyó una dispersión acuosa al 0,5 % p/v de HiNa (pH = 6,2) a través de una columna de vidrio conteniendo una resina sulfónica de intercambio catiónico (Amberlite IR 120 en su ciclo de protones (Sigma-Aldrich), R-Ar-SO₃H). Se añadieron varias alícuotas de agua deionizada a la columna para lograr el drenaje completo del HiH generado (pH = 2,5) y se continuó hasta que el pH del eluido tuvo un valor cercano a la neutralidad (pH \cong 7,00). Las alícuotas obtenidas fueron combinadas y liofilizadas (Liofilizador Labbconco®) bajo vacío de 1×10^{-3} mBar previo congelamiento con aire líquido.

2.2.3. Titulación del HiH

Los equivalentes -COOH por gramo de polímero fueron determinados mediante titulación directa. Para ello, se secó HiH hasta peso constante (USP37-NF32), luego se pesaron 100,0 mg y se dispersaron en 50 mL de agua deionizada. La dispersión de HiH fue titulada con una solución valorada de NaOH 0.01M. El punto equivalente se determinó a través de un salto en los valores de pH. El procedimiento se realizó por triplicado.

2.2.4. Caracterización de Hi mediante Potenciometría Diferencial de Barrido

La Potenciometría Diferencial de Barrido (PDB) se basa en la determinación del área delimitada por la curva de un gráfico Δ pH (referencia - muestra) vs. volumen del agente titulante. Los grupos básicos protonables presentes en la muestra originan un área positiva mientras que los grupos ácidos originan un área negativa (Jimenez-Kairuz AF, 2001; Luna E, 1991).

Las muestras se prepararon por dispersión de 30,0 mg de HiNa o HiH en 50 mL de una solución de HCl 0,05 M (exceso de HCl respecto a los equivalentes de Hi). A su vez, se utilizó una solución de HCl 0,05 M como referencia. Las dispersiones de HiH, HiNa y la solución referencia fueron tituladas con NaOH 0,1 M en alícuotas de 0,1 mL. Se registro la variación del pH hasta la superposición de las curvas de pH de HiH y HiNa con las de la referencia. El procesamiento de los datos se realizó utilizando el programa Excel para graficar los resultados.

2.2.5. Determinación del grado de depolimerización mediante los grupos N-acetilo terminales

Para verificar cualitativamente el grado de depolimerización que sufre el HiNa, ya sea en su paso por la columna intercambio iónico o al ser sometido a la enzima HAsa, se llevó a cabo esta técnica colorimétrica de determinación de los grupos N-acetilo terminales.

Se utilizaron dispersiones al 0,1% p/v de HiNa y de HiH y se siguieron los procedimientos descritos por Reissig JL (Lemmnitzer K, 2014). En este experimento, la reacción entre el DMAB y los grupos N-acetilo terminales presentes en las cadenas de Hi depolimerizado genera una solución color rosado cuya absorbancia puede ser medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 585 nm. Doscientos μL de la dispersión de HiNa o HiH, fueron colocados en un tubo de ensayo y se añadieron 50 μL de la solución de borato. Las mezclas se calentaron en un baño de agua hirviendo durante exactamente 3 minutos y, a continuación, se introdujeron en un baño de agua fría (aproximadamente 10 °C) durante 1 minuto. Finalmente, se añadieron 1,5 mL de la solución diluida de DMAB a cada una de las muestras y se incubaron a 37 °C durante 15 minutos. Las soluciones fueron transferidas a una cubeta de 1 cm de paso óptico e inmediatamente analizadas por espectroscopia UV-Vis entre 400 y 700 nm utilizando agua deionizada como referencia.

2.2.6. Mediciones reológicas

Se realizaron determinaciones reológicas de las dispersiones de HiNa y HiH usando un viscosímetro rotacional Haake, modelo VT500, con sensores NV o MVII cilindro-copa, acoplado a una PC con el programa VT500 3,01v, específico para el procesamiento de los datos. Durante las mediciones las muestras fueron termostalizadas a 37 °C utilizando un cabezal de calentamiento, acoplado a un baño para tal fin.

Se realizaron mediciones a las dispersiones al 1 % p/v de HiNa (pH = 6,0) o de HiH (pH = 2,5). Adicionalmente se preparó una dispersión de HiH y se le agregó gota a gota NaOH con el fin de obtener un pH de la dispersión cercano al del HiNa y así verificar si la salificación de los grupos $-\text{COOH}$ nuevamente, producía una restitución de la viscosidad inicial. De manera semejante se midió la variación de la viscosidad de la dispersión de HiNa tras el agregado de NaCl o glicina en estado sólido, en cantidades equivalentes a los grupos ionizables del HiNa. Las dispersiones preparadas fueron dejadas en reposo durante 24 hs

antes de ser utilizadas. Las curvas de flujo fueron graficadas como la fuerza de corte (τ) en función de la velocidad de deslizamiento ($\dot{\gamma}$). Los segmentos del ensayo fueron programados de la siguiente manera: segmento 1: fuerzas ascendentes de 0 a 100 s⁻¹ en 2 minutos, segmento 2: velocidad constante de 100 s⁻¹ durante 2 minutos y segmento 3: fuerzas descendentes de 100 a 0 s⁻¹ en 2 minutos. En los gráficos se muestra una medida representativa del promedio de tres medidas realizadas.

Por último, los valores de viscosidad (mPa/s) punto por punto tras el agregado de NaCl en concentraciones crecientes desde una solución concentrada, con el fin de evitar variaciones significativas del volumen a una dispersión de HiNa, se obtuvieron del cociente entre el valor del segmento a velocidad constante y la velocidad de deslizamiento.

2.2.7. Depolimerización del Hi por HASa

El dispositivo mostrado en la figura 2.1 se utilizó para monitorear la depolimerización de HiNa por acción de HASa mediante el control de la pérdida de viscosidad. Una alícuota de 15 mL de una dispersión al 1 % p/v de HiNa en PBS fue introducida en un recipiente termostatzado a 37 °C, y bajo agitación magnética. Estudios preliminares nos permitieron establecer que esta concentración resultó adecuada para monitorear las variaciones de viscosidad. Una solución (2,5 mg/5 mL) de HASa fue preparada 1 h antes del experimento mediante la disolución de la enzima en PBS. Una alícuota de 200 μ L que corresponde a 160,0 UI de HASa, se añadió en la dispersión HiNa. Una pipeta de 2 mL, de doble aforo, provista de una camisa termostatzada a 37 °C, fue utilizada para recoger un volumen exacto de la dispersión. Este volumen se dejó drenar por gravedad y se determinó el tiempo de drenaje entre 0 y 2 mL. El tiempo de elusión tomado inmediatamente antes de añadir la solución de HASa fue considerado como t_0 . Las mediciones fueron realizadas en intervalos de 5 minutos y durante un tiempo total de 150 minutos (t_t). Cada punto informado corresponde a la media de dos determinaciones independientes. Los resultados se expresan como porcentaje de la pérdida de viscosidad (%V) en unidades arbitrarias, calculado como $\% V = ((t_t / t_0) \times 100)$. Cuando la viscosidad de la muestra se mantuvo constante, se sumergió el balón de reacción en un baño conteniendo hielo durante 30 minutos a fin de frenar la reacción enzimática. Las muestras se almacenaron a 4-8 °C durante 24 hs para luego realizarles la valoración del grado de depolimerización mediante la determinación de los grupos N-acetilos terminales utilizando la técnica descrita por Reissig.

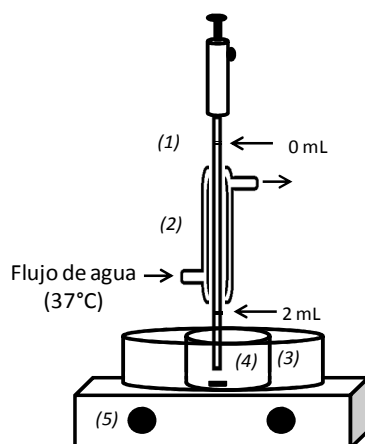


Figura 2.1: Dispositivo utilizado para determinar la degradación de HiNa por HASa. (1) Pipeta de 2 mL montada a una pro-pipeta; (2) chaqueta termostaticada, (3) Baño de agua termostaticado a 37 ° C, (4) recipiente conteniendo la dispersión HiNa + HASa, y (5) agitador magnético y calentador.

2.2.8. Electroforesis de los PE

Se realizó una electroforesis de las dispersiones de HiNa, HiH y HiNa depolimerizado con HASa durante 30 min con el fin de verificar la dispersión en los PM de las cadenas del PE. Para ello se utilizó un equipo BioRad/ MiniPROTEAN 3 Cell. Se generaron dispersiones de los PE en buffer PBP. Por otro lado se preparó el gel de electroforesis constituido por acrilamida y bis-acrilamida al 15%, persulfato de amonio, TEMED 1X, buffer tris-acetato-EDTA y agua deionizada. Con un peine se generaron los pozos correspondientes para sembrar una cantidad exacta de las muestras de PE por duplicado en cada una (10 µg de PE/pozo). Se utilizó como buffer de corrida TEMED 1X. La corrida se realizó de acuerdo a lo descrito por Mayumi Ikegami-Kawai (2002) en tres etapas consecutivas para favorecer la separación de las bandas, en donde se corrió la muestra a 240 V durante 20 min, luego se aumentó la potencia a 580 V y se corrió 10 min para finalmente elevar la potencia a 450 V durante 10 min.

2.3. Resultados y Discusión

2.3.1. Obtención del HiH a partir del HiNa

El sólido obtenido presenta $(2,44 \pm 0,01) \cdot 10^{-3}$ equivalentes -COOH por gramo de material sólido, lo que concuerda con el peso molecular informado para su unidad

2- Caracterización de HiNa y HiH en dispersión acuosa

monomérica (401 g/mol). Este resultado nos sugiere que la técnica utilizada para la obtención del HiH a partir del HiNa fue eficiente.

2.3.2. Caracterización por potenciometría diferencial de barrido del Hi

La PDB es de utilidad para caracterizar las propiedades ácido-base de diferentes sistemas que pueden estar constituidos por una molécula ionizable en solución o por una mezcla de las mismas, con la particularidad de permitir identificar y cuantificar grupos ácidos y/o básicos presentes así como también determinar la pureza iónica de los compuestos.

Las figuras 2.2 A y B muestran los perfiles de titulación de muestras de HiH y HiNa respectivamente, mientras que las figuras 2.2 C y D muestran cualitativamente el área delimitada por el diferencial de pH entre la solución referencia y la muestra en función del volumen de titulante.

El área positiva del perfil del HiNa indica que los grupos $-\text{COOH}$ presentes en el PE están netamente en su forma ionizada ($-\text{COO}^-$), mientras que el área negativa obtenida para el HiH nos indica que los grupos ionizables del PE se encuentran en su forma neutra ($-\text{COOH}$). Estos resultados nos confirman la eficacia de las resinas de intercambio iónico para obtener el HiH a partir del HiNa. Así mismo, nos permite identificar el alto grado de pureza iónica de ambas formas del PE (HiH y HiNa) a partir de los cuales se llevarán a cabo las respectivas caracterizaciones de los complejos con F modelos contraiones.

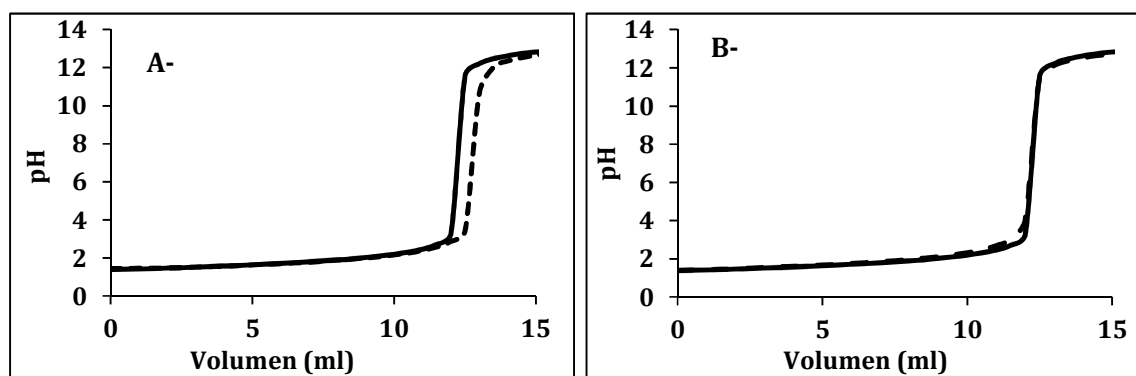


Figura 2.2: Perfiles de titulación potenciométrica de HiH (A) y HiNa (B); en línea continua se ilustra la referencia mientras que en línea de punto se grafica la muestra.

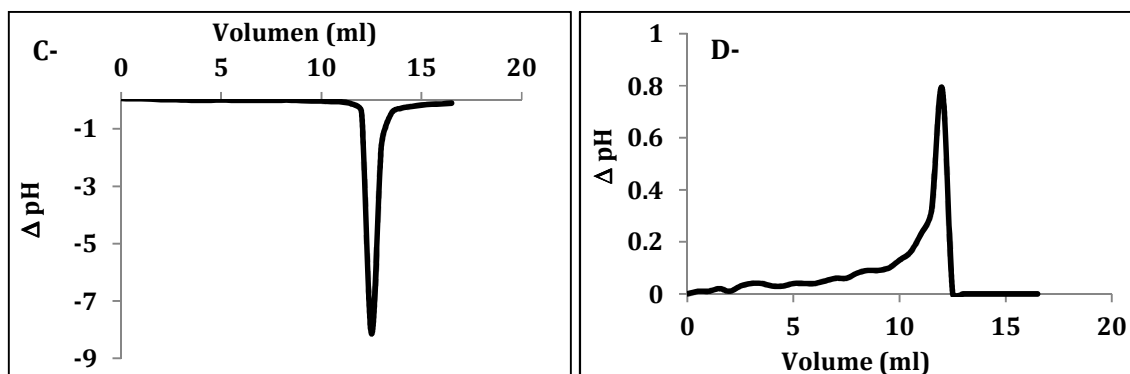


Figura 2.2 (cont.): Las figuras C y D muestran el área de las curvas delimitadas por el diferencial de pH vs. volumen de titulante entre la referencia y las muestras para HiH y HiNa,

2.3.3. Caracterización reológica de las dispersiones

La reología de las dispersiones del HiNa ha sido extensamente estudiada, debido principalmente a sus propiedades viscoelásticas y a la versatilidad en sus aplicaciones en virtud de esta característica (Haward SJ, 2013; Bilerova H, 2012; Krause WE, 2001). Los estudios reportados en la literatura informan una viscosidad dependiente de la concentración de polímero utilizado, con flujo pseudoplástico y ausencia de histéresis (tixotropía) (Khaled B, 2012; Rinaudo M, 2008). Es conocido que el procedimiento de obtención del HiH a través de resinas de intercambio iónico produce una depolimerización parcial de las cadenas del PE, y como consecuencia, el HiH genera dispersiones con menor viscosidad que el HiNa (Doherty MM, 1994).

La figura 2.3 muestra las curvas de flujo para las dispersiones de Hi. En ella se observa que el HiNa produce un aumento en la fuerza de corte en función de la velocidad de deslizamiento, lo que está íntimamente relacionado con la generación de dispersiones viscoelásticas. Así mismo, se observa que presenta un flujo pseudoplástico. Por otro lado, la comparación de los segmentos ascendentes y descendentes permitió determinar que no presenta tixotropía, fenómeno observado previamente por Bilerova H (2002). Por último, el HiNa genera aumentos mayores en la fuerza de corte a las generadas por HiH, incluso cuando a esta última dispersión se le agrega cantidad necesaria de NaOH para obtener un pH cercano al de HiNa (resultado no mostrado debido a la superposición con HiH).

2- Caracterización de HiNa y HiH en dispersión acuosa

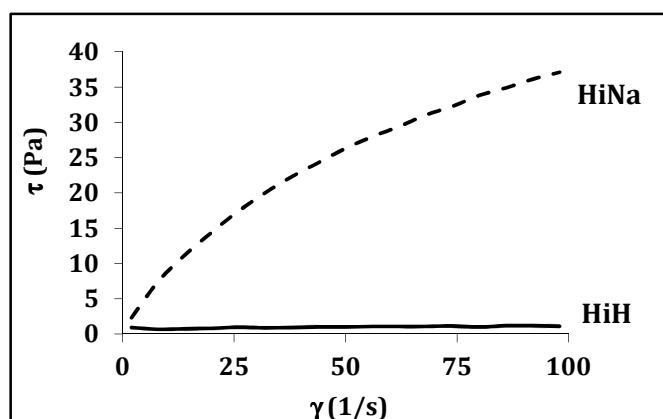


Figura 2.3: Curvas de flujo de dispersiones de Hi al 1% p/v. Se grafica la fuerza de corte (τ - Pa-) vs. velocidad de deslizamiento (γ). Curvas correspondientes al segmento ascendente.

Así mismo, la menor viscosidad generada por HiH se da como consecuencia de la depolimerización parcial e irreversible que sufren las cadenas del polímero tras su paso por la columna conteniendo resinas de intercambio iónico para obtener su forma neutra, por lo que este PE no es similar al PE de partida en términos de PM y capacidad de formar redes entrecruzadas en dispersión (Doherty MM, 1994).

En la figura 2.4 se ilustra la influencia que tiene el agregado de NaCl o glicina sobre la reología del HiNa. Como se puede observar en el gráfico, existe un descenso en la fuerza de corte en función de la velocidad de deslizamiento, asociado a un descenso de la viscosidad del sistema cuando al HiNa se le agrega NaCl hasta alcanzar una concentración del 0,9 % p/v. Por otro lado, el agregado de un no-electrolito como lo es la glicina no produce alteración sobre la viscosidad del HiNa (resultado no mostrado debido a la perfecta superposición con la curva de flujo de HiNa).

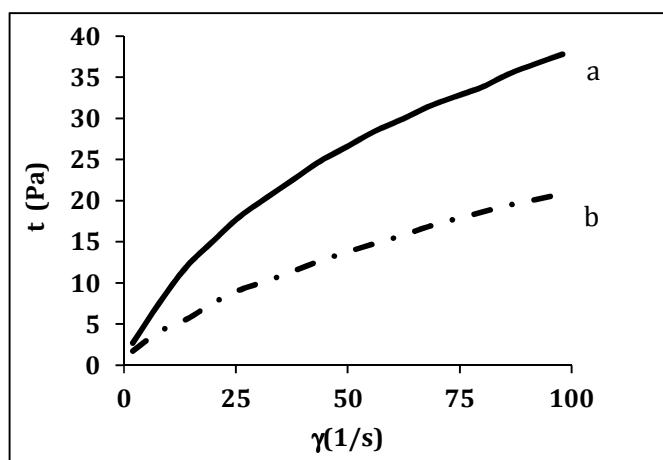


Figura 2.4: Se grafica la fuerza de corte (τ -Pa-) vs. velocidad de deslizamiento (γ). Curvas correspondientes al segmento ascendente. Curvas de dispersiones al 1% p/v. a- HiNa; b- HiNa + NaCl.

La figura 2.5 muestra el descenso de la viscosidad (mPa/s) de una dispersión de HiNa tras el agregado de concentraciones crecientes de NaCl (moles % respecto a los grupos $-\text{COO}^-$ del HiNa). A medida que aumenta el porcentaje de NaCl agregado respecto a los grupos ionizables de HiNa, se observa una disminución progresiva de la viscosidad del sistema hasta alcanzar un valor estacionario (300 % moles NaCl aproximadamente).

Este descenso en la viscosidad del HiNa tras el agregado de NaCl se da como consecuencia de una perturbación o apantallamiento de las fuerzas de atracción/repulsión intra e intermoleculares encargadas de generar la viscosidad del sistema. Cuando estas cargas se han balanceado y las fuerzas han sido completamente perturbadas, el PE es incapaz de reorganizarse y por ende, posteriores agregados del electrolito no producen modificaciones en la viscosidad del sistema.

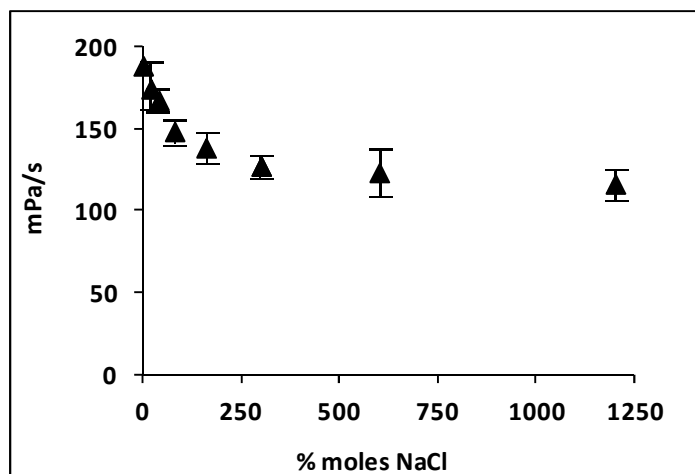


Figura 2.5: Perfil de viscosidad vs. moles % de NaCl respecto a los grupos carboxilato de una dispersión al 1% p/v de HiNa.

La presencia del grupo $-\text{COO}^-$ participa activamente en la formación de la estructura polimérica en forma de red al generar puentes hidrógeno intra e intermoleculares (Tamer M, 2013; Garg HG, 2004). Estas interacciones producen la elevación de la viscosidad del sistema, por lo que la presencia de contraiones afectarán drásticamente la viscosidad (Chytil M, 2007). El agregado de NaCl en la dispersión de HiNa altera las fuerzas de atracción/repulsión involucradas en la formación de la estructura secundaria y terciaria del HiNa en dispersión lo que genera un descenso en la viscosidad. Solutos neutros como la glicina, no producen este efecto. Este mismo fenómeno fue descrito por Jimenez-Kairuz AF (2004) para hidrogeles de

2- Caracterización de HiNa y HiH en dispersión acuosa

Carbomer® donde la viscosidad se veía drásticamente afectada por el agregado de NaCl, y no así por glicina.

2.3.4. Depolimerización de Hi

La figura 2.6 muestra el perfil de disminución de la viscosidad relativa en función del tiempo para la dispersión de HiNa al ser expuesta a la enzima HASa. Como se puede observar, la viscosidad relativa disminuye progresivamente a partir del agregado de la HASa hasta que la misma llega a un valor estacionario, momento en el cual las cadenas del PE están irreversiblemente depolimerizadas y la viscosidad del sistema ha disminuido.

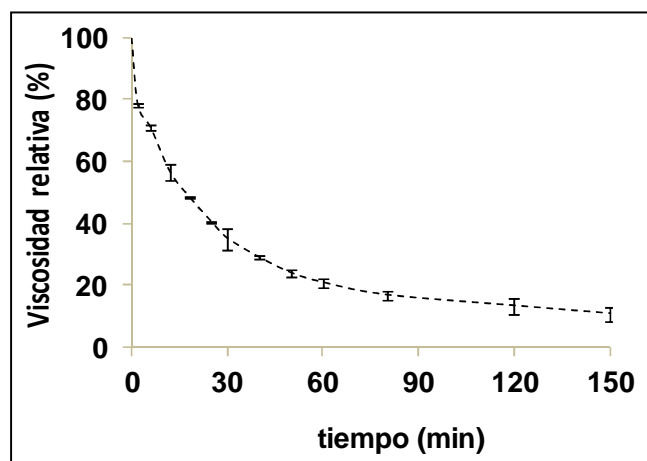


Figura 2.6: Cambio de la viscosidad relativa de una dispersión de HiNa debido a la depolimerización parcial *in-vitro* luego de la adición de HASa.

El HiNa es susceptible a la depolimerización bajo una variedad de condiciones, dentro de las cuales podemos mencionar la hidrólisis ácida, reacciones de despolimerización oxidativa, y sonicación, entre otros (Holubova J, 2014). Una de las técnicas más utilizadas para la determinación del grado de depolimerización es el ensayo de Reissig J (Lemmnitzer K, 2014). El mismo consiste en un ensayo colorimétrico basado en la medición de la concentración de los extremos N-Aceto reductores que aparecen durante la depolimerización del PE.

La figura 2.7 muestra los perfiles de las dispersiones de HiNa, HiH y HiNa degradado con HAsa, luego de llevar a cabo los ensayos de determinación de los grupos N-acetilos terminales correspondientes. Se observó un cambio en el perfil de la curva espectral con aparición de dos bandas a los 585 y 550 nm respectivamente en aquellos tubos conteniendo el PE procesado con la resina de intercambio iónico (HiH) y en aquellos en los cuales el HiNa fue degradado con HAsa. La aparición de estas bandas, sugiere que tanto el HiH, como el HiNa depolimerizado con HAsa (HiNa_d) presentan expuestos sus grupos N-acetilo terminales, posibilitando la formación de intermediarios que reaccionarán con DMAB para así obtener compuestos cromóforos (Lemmnitzer K, 2014; Doherty MM, 1994). Para el caso del HiNa no se observa la aparición de las bandas a los 585 y 550 nm, lo cual nos sugiere la integridad de la cadena del polímero. La absorbancia de HiNa entre 0.1 y 0.2 puede deberse en gran medida a un fenómeno de light scattering del haz de luz propiciado por el PE.

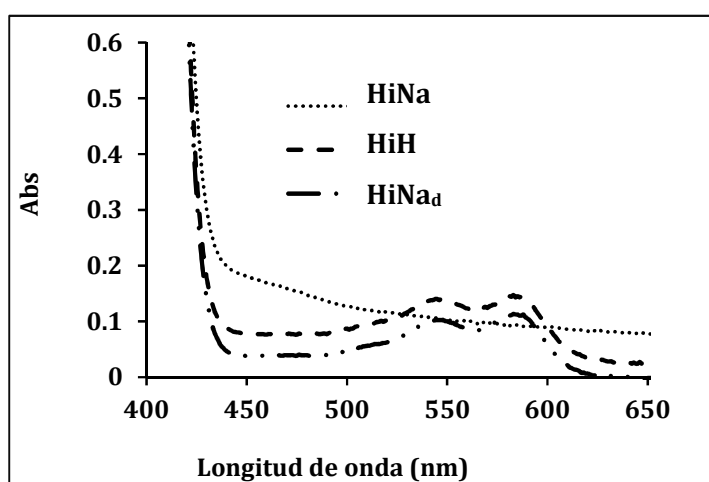


Figura 2.7: Determinación de los grupos N-acetilo terminales a través del método de Reissig. Espectros de absorción para HiNa, HiH y HiNa_d.

2.3.5. Electroforesis de los PE

La figura 2.8 muestra el resultado de la electroforesis en geles de acrilamida de los PE. En la parte superior del mismo se ubican las cadenas de alto PM del polímero mientras que en las zonas bajas del gel se ubican las menor PM.

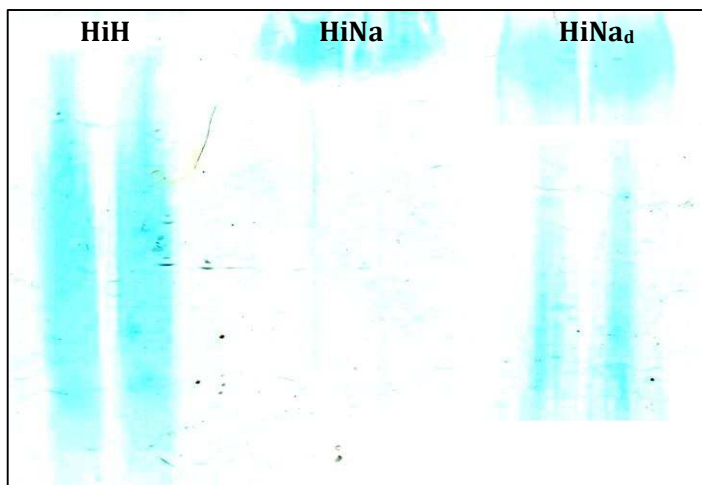


Figura 2.8: Electroforesis en geles de poliacrilamida de HiH, HiNa y HiNa degradado con HASa.

Como se puede observar en la figura, la corrida electroforética del HiH presenta bandas que abarcan una amplia zona del gel. Esto nos demuestra por un lado que el HiH se encuentra parcialmente depolimerizado por los motivos anteriormente mencionados y, por otro lado la amplitud de la banda nos estaría indicando que hay una dispersidad en el PM de este PE. Por su parte, el HiNa genera un escaso corrimiento cercano al pozo de siembra, denotando un alto PM como consecuencia de la integridad de sus cadenas. Por último, el HiNa_d presenta bandas predeciblemente similares tanto al HiNa como al HiH.

Todos estos resultados obtenidos mediante la técnica electroforética están en línea y son complementarios a los resultados obtenidos del análisis reológico y colorimétricos tanto de HiNa, HiH como de HiNa_d.

2.4. Conclusiones

- Se obtuvo información acerca de las características fisicoquímicas de mayor relevancia de las dispersiones de Hi:
 - Se encontró y estandarizó un método reproducible, conveniente y eficiente para la obtención del HiH a partir de HiNa.
 - Se determinaron los grupos ionizables -COOH del HiH por gramo del PE relevante para la utilización de dicho PE como SPF.

- Se verificó que, tanto el HiNa adquirido comercialmente como el HiH obtenido a través de las resinas de intercambio iónico son polímeros de una alta pureza iónica.
- HiNa genera dispersiones viscoelásticas y posee un flujo pseudoplástico, sin tixotropía. La introducción de electrolitos modifica la viscosidad dado que se perturban las fuerzas encargadas de generar las redes poliméricas.
- HiH presenta una viscosidad menor que la del HiNa. Se determinó tanto por técnicas reológicas como colorimétricas y electroforéticas que el HiNa sufre un proceso de depolimerización parcial en sus cadenas cuando el mismo es procesado para obtener el HiH o cuando es expuesto a la enzima HASa

Capítulo 3

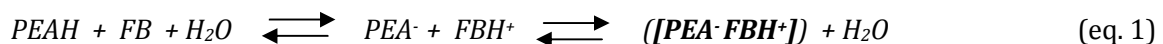
*Caracterización de
los sistemas Hi-F en
dispersión y en estado
sólido*



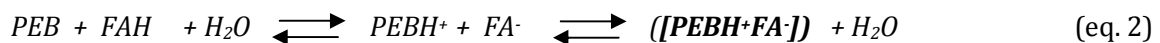
3.1. Introducción

Los equilibrios de formación de los complejos iónicos PE-F se presentan a continuación:

Polielectrolitos Ácidos:



Polielectrolitos Básicos:



Donde PEAH corresponde a un PE ácido (cuyos grupos funcionales pueden ser R-COOH, R-SO₃H o R-PO₄H, entre otros), el cual reacciona con un F básico (FB) (eq. 1). Por otro lado PEB corresponde a un PE básico (cuyos grupos funcionales pueden ser R-N(CH₃), R-NH₂ o R-NHCOCH₃, mezcla de aminas primarias y secundarias, entre otros), el cual reacciona con un F ácido (FAH) (eq. 2). PEA⁻ y FBH⁺ representan los grupos ionizados y protonados del PE y el FB, mientras que PEBH⁺ y FA⁻ representan los grupos protonados y ionizados del PEB y el FA, respectivamente. Como puede observarse en los equilibrios, el resultado de la interacción electrostática entre los PE y los F, genera productos de condensación (par iónico) PE-F expresados como $[PEA^-FBH^+]$ y $[PEBH^+FA^-]$ (Grelet E, 2014; Cametti C, 2014).

Los equilibrios 1 y 2 ejemplifican el fenómeno de condensación iónica, que genera una dada proporción de pares iónicos como producto de la asociación entre un PE y un F de carga opuesta. Estos pares iónicos, indicados como las especies entre corchetes, son denominados sistemas o complejos PE-F (Andrey V, 2005).

La interacción ácido-base entre los grupos iónicos de un PE con F de carga opuesta genera en dispersión acuosa un alto grado de condensación iónica (Ramirez Rigo MV, 2009, 2006, 2005; Jimenez Kairuz AF, 2004, 2003). Esta propiedad fue descrita para varios complejos binarios constituidos por PE como Carbomer, ácido algínico, carboximetilcelulosa y polimetacrilatos lineales cargados con F básicos. Las constantes de afinidad de los mencionados sistemas están en el orden de 10³ a 10⁶, denotando una apreciable afinidad

entre ambos (Ardusso MS, 2010; Jimenez Kairuz AF, 2008; Ramirez Rigo MV, 2006). De igual modo se encuentra descrita la interacción iónica entre PE catiónicos y F ácidos (Guzmán ML, 2012; Quinteros MD, 2012, 2011, 2008), donde los grupos ácidos carboxílicos de los F reaccionan con los grupos amino del PE. Este comportamiento fue descrito para el equilibrio de formación de complejos binarios constituidos por el Eudragit E₁₀₀ y un grupo de F modelo tales como Naproxeno, Ketoprofeno, Diclofenac, Flurbiprofeno, donde se observó un alto grado de condensación iónica, mayor al 88% (Quinteros MD, 2012).

En la figura 3.1 se observan algunos ejemplos representativos de la interacción electrostática PE-F. Este gráfico muestra la alta proporción de F que se encuentra formando pares iónicos con el PE (Manzo RH, 2014).

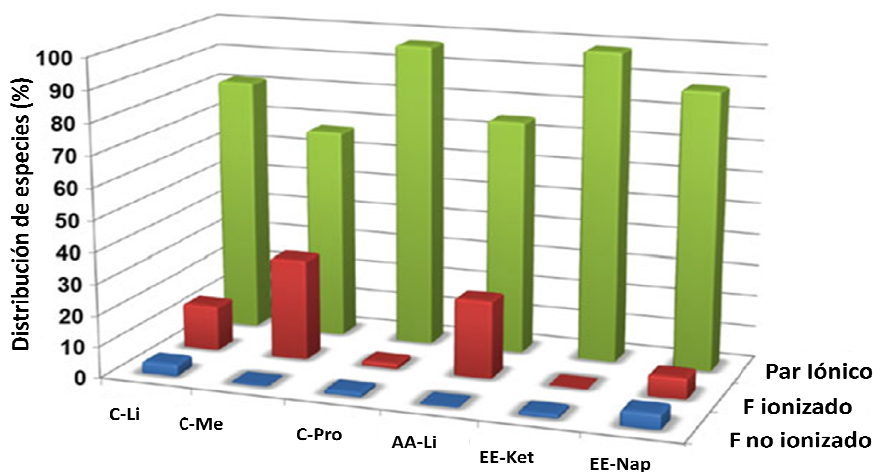


Figura 3.1: Distribución de especies luego de la partición de los hidrogeles (PE-F₅₀) con un solvente orgánico. (C-Li) Carbomer -lidocaína; (C-Me) C-Metoclopramida; (C-Pro) C-Procaína; (AA-Li) Ácido algínico-Li; (EE-Ket) Eudragit E-Ketoprofeno y (EE-Nap) EE-Naproxeno.

Si bien la afinidad entre los PE con moléculas orgánicas es elevada (Jimenez Kairuz AF, 2008, 2004; Ramirez Rigo MV, 2006), concentraciones apreciables de moléculas contraiones inorgánicas, desplazan parcialmente el equilibrio promoviendo una mayor liberación de la molécula del F desde el entorno del PE. De la interacción reversible de un PE con contraiones inorgánicos u orgánicos, surgen propiedades particulares que han sido explotadas con diferentes propósitos, tales como la liberación controlada de F (Ramirez Rigo MV, 2006; Jimenez Kairuz AF, 2005, 2003), el enmascaramiento de sabores (Bhise K, 2008), aumento de la compatibilidad de F (Vilchez AP, 2002), aumento de la estabilidad de F (Jimenez Kairuz AF, 2004), aumento de la viscosidad (Billany M, 2002), etc. En consecuencia, las dispersiones

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

acuosas PE-F, exhiben un conjunto de características que pueden ser aprovechadas para la utilización de complejos PE-F como SPF.

Los PE en dispersión generan cargas positivas o negativas según su naturaleza, y como consecuencia de esto, son capaces de migrar si se les aplica un campo eléctrico. PE ácidos migrarán hacia el ánodo mientras que PE básicos migrarán hacia el cátodo. Como se observa en la figura 3.2, los complejos PE-F se comportan de esta manera exhibiendo altos potenciales electrocinéticos (ζ). Este comportamiento puede ser interpretado con los modelos teóricos de doble capa eléctrica, en cuanto a que el PE conforma un microentorno en el que una alta proporción de cargas están neutralizadas por condensación iónica con FH^+ , en equilibrio con una proporción de contraiones con mayor grado de libertad, algunos de los cuales poseen suficiente energía cinética para migrar al seno de la solución. En consecuencia el microentorno macromolecular mantendrá permanentemente una proporción de cargas iónicas con capacidad de interacción con un campo eléctrico. Como ocurre con contraiones inorgánicos, la interacción ácido-base entre los PE y moléculas de F originan un alto ζ que contribuye a la estabilidad física de las dispersiones. La figura 3.2 muestra el ζ de dispersiones acuosas de PE ácidos y básicos cargados con fármacos modelo (Manzo RH, 2014). Como se observa en la figura, las dispersiones obtenidas con un PE ácido producen un ζ negativo, mientras que las obtenidas con PE básicos muestran un ζ positivo.

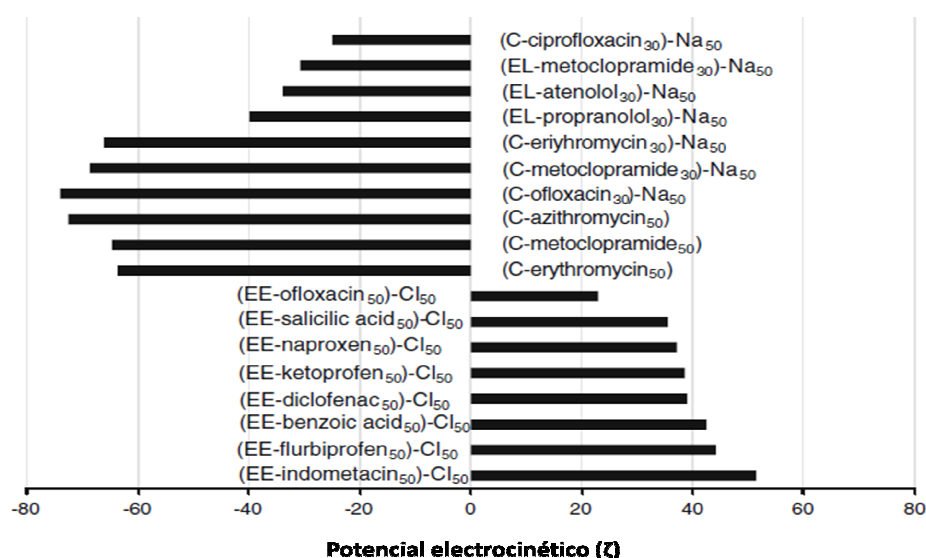


Figura 3.2: Potenciales electrocinéticos (ζ) exhibidos por dispersiones acuosas de PE cargados con fármacos. C: Carbomer; EE: Eudragit E; EL: Eudragit L. Los subíndices indican el % de F y contraión inorgánico expresada en moles % que neutraliza los grupos ionizables de cada PE.

La caracterización de los complejos PE-F en estado sólido, así como la de cualquier sólido farmacéutico es materia ineludible para el desarrollo de formulaciones. De un modo general, los F en estado sólido exhiben mayor estabilidad que cuando se encuentran dispersos. Es por ello que un gran número de preparaciones comerciales se disponen como polvo seco para ser disuelto o suspendido en agua o algún otro vehículo antes de su administración (Ansel HC, 2011).

El estudio integral de las propiedades de los sólidos farmacéuticos involucra un enfoque interdisciplinario, que permite obtener información física, química y mecánica, a nivel molecular, del particulado y a granel (Shete G, 2010). Las propiedades en el estado sólido pueden ser definidas como aquellas características del material asociadas al ensamble de las moléculas individuales, y en general, para su estudio se requieren pequeñas cantidades de muestra. Las técnicas más utilizadas para este fin son: espectroscopia infrarroja, rayos X, resonancia magnética nuclear y espectroscopia de reflectancia difusa UV-Visible, complementadas con mediciones de propiedades físicas mediante análisis térmico.

Los complejos binarios (PE-F) en estado sólido pueden obtenerse mediante diferentes técnicas de secado tales como: evaporación del solvente, liofilización, coacervación o secado por atomización (Jiménez Kairuz AF 2008; Quinteros DA 2008). La caracterización de los productos, principalmente mediante espectroscopia FT-IR, análisis térmico y difracción de rayos X de polvos, ha permitido evidenciar la interacción iónica entre el PE y el F, y determinar que los mismos se obtienen como sólidos amorfos, poco higroscópicos, que exhiben propiedades diferenciadas de sus precursores.

El Hi, al ser un polímero de origen biológico, presenta mayor complejidad respecto a los PE estudiados previamente. El objetivo de este capítulo se centra principalmente en la obtención y caracterización exhaustiva de los complejos Hi-F en dispersión y en estado sólido. Se pretende estudiar las propiedades de mayor relevancia de los complejos Hi-F con el fin de verificar la formación de pares iónicos entre los grupos ionizables del Hi y los F modelo seleccionados. Se estudiarán las constantes de afinidad PE-F en el equilibrio, la proporción de pares iónicos formados, la reversibilidad de la interacción mediante el agregado de electrolitos y finalmente, se evaluarán las características fisicoquímicas de los sistemas Hi-F como por ejemplo el pH, conductividad y potencial electrocinético.

Para sistematizar y facilitar el estudio, seleccionamos un número reducido de F modelo con los cuales realizamos ensayos de caracterización de los complejos Hi-F. Entre

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

ellos están Lidocaína (Li), Atenolol (At) y Propranolol (Pr). Los mismos presentan características heterogéneas en términos de basicidad y lipofilidad. Por ejemplo, Li es una base más débil que Pr y At. A su vez, Pr, Li y At presentan características lipofílicas/hidrofílicas diferentes, siendo Pr el que presenta mayor lipofilidad. Los resultados obtenidos con estas moléculas serían extrapolables al análisis del comportamiento de otras moléculas similares. Las propiedades fisicoquímicas de los F modelo, conjuntamente con sus estructuras químicas, se resumen en la figura 3.3:

Fármaco	PM (g/mol)	Tipo de Amina	pKa	Log P	Solubilidad acuosa (mg/mL)
Lidocaína (Li)	234,34	3°	7,92	2,26	3,98
Atenolol (At)	266,34	2°	9,55	0,16	12,8
Propranolol (Pr)	259,34	2°	9,45	2,75	0,13

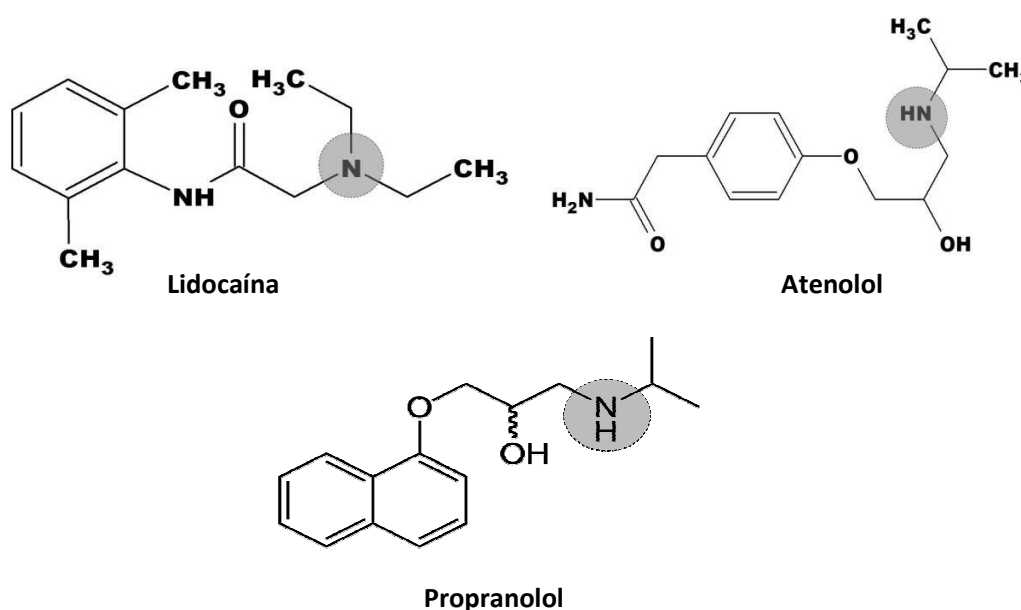


Figura 3.3: Propiedades fisicoquímicas relevantes de los F modelo junto con sus estructuras químicas. En círculo se marca el grupo ionizable de cada uno. (Jiménez Kairuz AF, 2004).

3.2. Materiales y Metodologías

Se utilizó el HiNa y HiH descrito en el capítulo 2. Los fármacos seleccionados para obtener los productos Hi-F son de calidad farmacopea. Lidocaína (Li) y Atenolol (At) (Parafarm®, Arg) fueron utilizados sin ningún procesamiento adicional. Propranolol (Pr) HCl, (Montreal, Córdoba, Arg.), fue neutralizado y recristalizado desde agua para obtener la forma básica. Los reactivos y solventes utilizados fueron de calidad pro análisis. Se preparó una solución al 1% p/v de Glucosa anhidra pro análisis (Cicarelli laboratorios, Arg) y una solución al 0.9% p/v de Cloruro de Sodio pro análisis (Cicarelli Laboratorios). Para las particiones se utilizó ciclohexano (CH, Cicarelli SA, Arg.) como solvente. Se utilizó agua deionizada para la realización de los ensayos. Para la preparación de las pastillas para los ensayos de infrarrojo, se utilizó Bromuro de Potasio (KBr calidad espectral, Cicarelli, Arg).

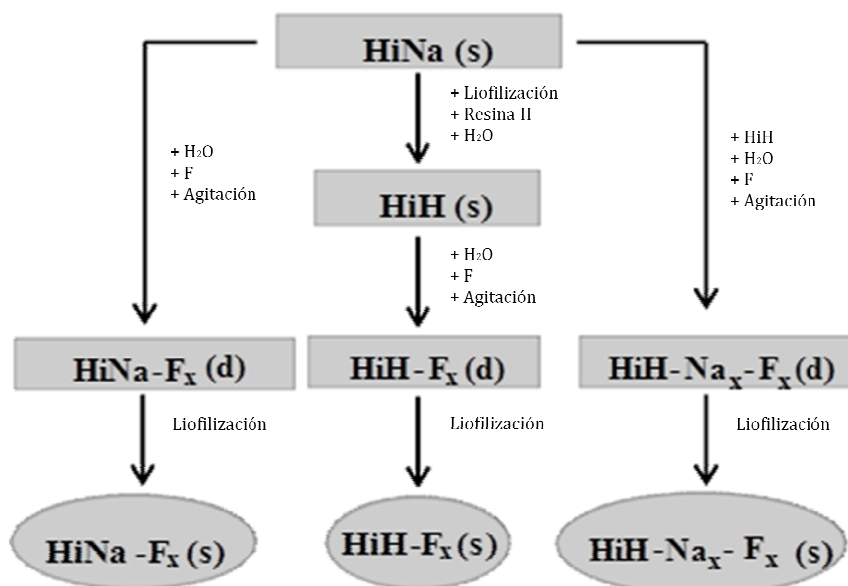
3.2.1. Metodología de preparación de los complejos

Se obtuvieron las dispersiones de los complejos binarios HiNa-F_x, HiH-F_x y la mezcla equivalente de HiH y HiNa en proporciones adecuadas para obtener sistemas de pH y viscosidad adecuada (HiH-Na-F_x). En todos los casos el subíndice “x” corresponde al porcentaje de los grupos carboxílicos del PE neutralizados con el F contraíón. Los mismos se generaron a partir de la dispersión de los respectivos materiales en estado sólido con agua deionizada, y posterior agitación utilizando agitador magnético hasta completar su disolución. El pH se ajustó con la adición de HCl o NaOH según correspondiera. Las dispersiones obtenidas fueron transparentes.

Los complejos iónicos binarios en estado sólido, HiNa-F_x, HiH-F_x y la mezcla equivalente HiH-Na-F_x, se obtuvieron por liofilización de las dispersiones PE-F bajo vacío de 1×10^{-3} mBar previo congelamiento con aire líquido. También se preparó una serie homóloga de los complejos Hi-F denominados “mezclas físicas” que consisten en la mezcla en seco de los polvos de Hi y F sin procesamientos.

Se diseñaron metodologías para la obtención de los complejos Hi-F en dispersión o en estado sólido, de acuerdo con el siguiente esquema general:

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido



Esquema 1: Preparación y obtención de los complejos Hi-F en dispersión (d) y en estado sólido (s). Se detallan la serie HiH, HiNa y la serie HiH-Na-F.

3.2.2. Mediciones de pH, conductividad y potencial electrocinético

Los valores de pH de las dispersiones al 0,25 % p/v se registraron como se indicó en el capítulo 2.

La conductividad de los complejos Hi-F al 0,25 % p/v de Hi fue medida utilizando un conductímetro Mettler Toledo Seven Multi equipado con una celda de conductividad (InLab® 741). Los valores de conductancia medidos (Siemens -S-), fueron multiplicados por la constante de celda del electrodo correspondiente (0.101078 cm⁻¹) para obtener la conductividad específica (k_{esp} , S/cm). Las muestras fueron termostalizadas a 25 °C. Se midió la k_{esp} de las dispersiones, en función de la proporción de F incorporado y la dilución del sistema.

Los valores de ζ de los complejos Hi-F se determinaron por electroforesis dinámica de luz utilizando un equipo Delsa Nano-C (Beckman Coulter, Osaka, Japón) provisto con un laser de diodo de 658 nm a un ángulo de detección de 165°. Los valores de ζ se obtuvieron de la

función de autocorrelación provista por el software del equipo (DelsaNano 2.20 software, Beckman Coulter, Osaka, Japón) que emplea la ecuación de Smoluchowski (Lyklema J, 2003). Se informa el promedio de tres mediciones de la muestra provisto por el software. Todas las mediciones se realizaron a 25 °C a partir de las dispersiones al 0.1% p/v del PE con distintos porcentajes de neutralización con F, utilizando la intensidad de señal óptima calculada por el dispositivo.

3.2.3. Evaluación de la reversibilidad de la interacción: Efecto del agregado de sales neutras sobre los equilibrios de formación de pares iónicos

El efecto de la adición de NaCl sobre los equilibrios iónicos de los complejos fue evaluado mediante titulaciones de 50 mL de dispersiones Hi-F con una concentración del PE al 0.1% p/v con una solución de NaCl al 0.9% p/v. Se agregaron alícuotas exactas de la solución titulante con una bureta, y se tomó la lectura del pH una vez que el mismo fuese estable.

3.2.4. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F

3.2.4.1. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F mediante partición

Se prepararon dispersiones acuosas de Hi-Li, Hi-Pr y HiH-Na-Li con una concentración de PE de 0.15% p/v y distintos porcentajes de neutralización del PE con el F. No fueron analizados los complejos Hi-At debido a que la alta hidrofiliidad del At es una limitante para esta técnica. El pH de las dispersiones fue ajustado a un valor cercano a 7,0 con la adición gota a gota de HCl o NaOH según correspondiera en cada caso. Las dispersiones fueron particionadas en un tubo hermético con agitación utilizando CH como solvente de extracción en una relación de CH/dispersión de 2:1. Las fases estuvieron en contacto durante 24 h. En ese lapso de tiempo los sistemas fueron agitados periódicamente, durante 10 minutos, a tiempos de 1, 3, y 6 h, utilizando un agitador de vórtice. Luego se dejaron reposar hasta alcanzar el equilibrio, a temperatura ambiente.

Para determinar si el sistema alcanzó el equilibrio, se realizó un ensayo de partición de los complejos en paralelo, y se determinó la concentración del F espectrofotométricamente, al máximo de longitud de onda UV de cada F en ambas fases a distintos tiempos hasta obtener iguales concentraciones molares en al menos dos lecturas consecutivas.

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

Alcanzado el equilibrio de partición, se determinó la concentración del F en el solvente orgánico. Previamente se construyó una curva de calibrado de cada F en agua y en CH para obtener su absorptividad molar. Se midió el pH de las muestras en las dispersiones antes y después de alcanzar el equilibrio. El coeficiente de partición verdadero (CP_v) de cada F en el mismo sistema de solventes fue calculado midiendo el pH de la fase acuosa y las concentraciones de F en la fase orgánica.

Los datos fueron procesados para obtener tanto (F) , (FH^+) , $([R-COO\cdot FH^+])$ y la constante de afinidad para la condensación iónica (K_{pi}). A partir de esta metodología se llevó a cabo la determinación del coeficiente de partición aparente de la especie neutra del F entre la dispersión acuosa y CH. Cada resultado se informa como el promedio de tres ensayos equivalentes.

3.2.4.2. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F mediante diálisis

Las proporciones de las especies (F) , (FH^+) , y el complejo $([R-COO\cdot FH^+])$ se determinaron mediante la diálisis de las dispersiones utilizando un tubo de membrana de celulosa (12.000 Da, Sigma, St Louis, MA, EE.UU.). Exactamente 10 mL de las dispersiones acuosas Hi-F con una concentración de PE 0,5% p/v y distintos porcentajes de neutralización del polímero con el F se incorporaron en el tubo de diálisis (compartimento donador -CD-). El pH de las dispersiones fue ajustado a un valor cercano a 7 con la adición gota a gota de HCl o NaOH. A tiempo cero, el CD se introdujo en el compartimento receptor (CR) constituido por un erlenmeyer sellado con Parafilm® conteniendo 100 mL de agua.

Las fases estuvieron en contacto durante 24 h hasta que alcanzaran el equilibrio. En ese lapso, los sistemas se mantuvieron en constante agitación magnética y a temperatura ambiente. Estudios preliminares, evaluando la concentración del F en ambas fases a distintos tiempos, mostraron que a las 24 h se alcanza el equilibrio, definido como la obtención de los mismos valores de concentración en al menos dos lecturas consecutivas, en un período no menor a 2 h. Finalmente, se registró el pH del CD y del CR. Además, se determinó la concentración de F en el CR mediante espectrofotometría UV a la longitud de onda de máxima absorción del F correspondiente.

3.2.5. Difracción de rayos X de los complejos Hi-F

Los patrones de difracción de Rx fueron obtenidos usando un difractómetro (PANalytical XPert Pro, Países Bajos) provisto con un software específico para el procesamiento de datos y utilizando una lámpara de Cu ($K\alpha$) ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Las muestras sólidas se colocaron en un porta muestra de aluminio y se estableció un intervalo de barrido entre 5 y 70° en $2\theta/\theta$ y una velocidad de barrido de 0.04 $2 \theta/s$. Previo al ensayo las muestras fueron pulverizadas a polvo fino.

3.2.6. Espectroscopia infrarroja de los complejos Hi-F

Los espectros FT-IR fueron obtenidos mediante un espectrofotómetro FT-IR Nicolette 55XC. Se determinaron los espectros IR de Hi, los F puros, sus complejos iónicos y las mezclas físicas. Para ello, se secaron apropiadamente las muestras y el KBr. Luego se prepararon discos compactos de KBr (pastillas blanco), utilizando una prensa hidráulica con punzón n° 13 previsto para tal fin. Para los complejos, se pesaron exactamente 100 mg de KBr conteniendo cerca del 1,0 % p/v del material (Hi-F) finamente pulverizado y se los comprimió utilizando la prensa hidráulica. Las pastillas se mantuvieron en un envase con cierre hermético para prevenir la hidratación antes de la medición.

3.3. Resultados y discusión

Las dispersiones obtenidas fueron sistemas transparentes, isotrópicos, estables, sin la presencia de sedimentos para cada uno de los F modelo seleccionados. La neutralización de las dispersiones de HiNa y HiH con moléculas básicas de F produce una elevación en los valores de pH.

3.3.1. El pH de las dispersiones

Los valores de pH de las dispersiones de HiNa o HiH son directamente dependientes de la basicidad (pK_a) y porcentaje de F básico contraíón usado, así como también de la concentración de polímero disperso en cada caso. En la tabla 3.1 se informan los valores de pH para productos Hi-F_x con diferente grado de neutralización, obtenidos con dispersiones de Hi al 0,25 %.

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

Tabla 3.1: Variación del pH de las dispersiones Hi al 0,25 % p/v con el agregado de diferentes F en varias proporciones expresadas como moles %.

Complejo	(pH \pm 0.05)			
	x= 25	50	75	100
HiNa-Li _x	8,68	9,07	9,20	9,30
HiNa-At _x	9,85	10,08	10,11	10,30
HiNa-Pr _x	9,90	10,11	10,15	10,32
HiH-Li _x	3,05	3,56	4,09	4,53
HiH-At _x	3,56	3,92	4,67	5,27
HiH-Pr _x	3,61	3,92	4,71	5,32

Como se puede ver en la tabla, los valores de pH de las dispersiones aumentan a medida que se neutralizan el PE con el F contraión. Así mismo, se puede detectar que a medida que el pKa de la base es mayor, mayor es el valor de pH de las dispersiones PE-F obtenidas. En la figura 3.4, se ilustra de manera representativa el pH de las dispersiones de HiNa-Li y HiH-Li en función del porcentaje de neutralización. Como se puede observar, el incremento de pH es aproximadamente lineal con la proporción de Li en la dispersión. En las dispersiones obtenidas con los diferentes F se observó un comportamiento similar. Esto nos indujo a realizar un comportamiento exhaustivo de la distribución de las especies en el equilibrio de los complejos Hi-F.

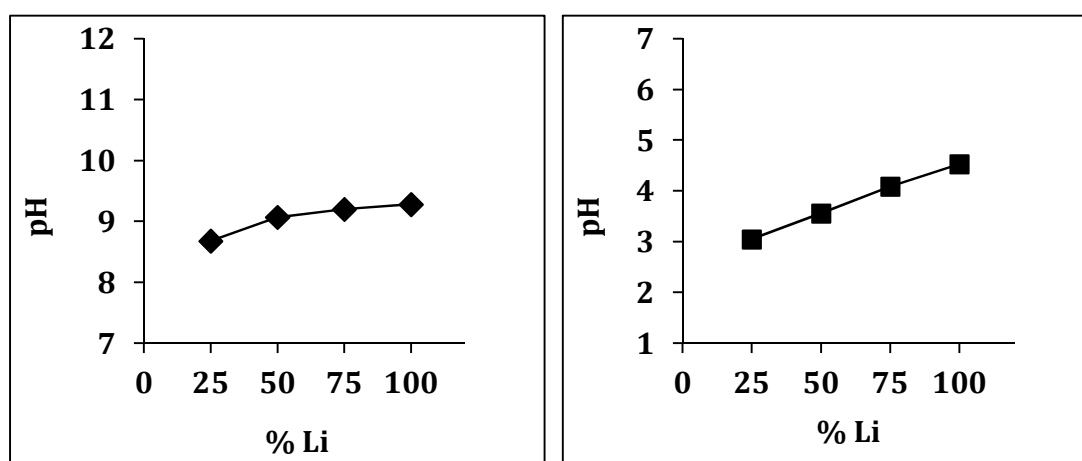


Figura 3.4: Variación del pH en dispersiones (■) HiH-Li y (◆) HiNa-Li neutralizados con diferentes proporciones de Li.

3.3.2. Potencial electrocinético y conductividad de las dispersiones

La figura 3.5 ilustra el conjunto de datos obtenidos. Se observa el efecto de la adición progresiva de At sobre el ζ de HiH, HiNa y el sistema conjugado HiH-Na₅₀. Como puede verse, HiH exhibe un ζ bajo y negativo debido al bajo porcentaje de ionización de sus grupos carboxílicos y al pH ácido de la dispersión (entre 2,50 y 3,00). La adición de At eleva el pH, sin embargo el ζ se mantiene relativamente constante (- 4 a -7 mV), como se esperaba a partir de los equilibrios químicos. En contraste, HiNa exhibe un ζ alto y negativo (-35 mV), y un pH cercano a la neutralidad (pH \cong 7,0). La adición de At aumenta el pH de la dispersión, y cambia progresivamente el ζ hacia valores cercanos al obtenido con HiH-At₁₀₀. La disminución de ζ se asocia con la condensación iones opuestos al PE. Por último, la adición de At a una mezcla de cantidades equivalentes de HiNa y HiH también aumenta el pH de la misma (desde pH = 3,5 a pH= 9,5) y disminuye el ζ respecto al PE sin At, lo cual está en concordancia con los resultados anteriores. El nivel de confluencia de los tres sistemas en valores de ζ cercanos sería indicativo de la formación del par iónico Hi-F, en el que el microentorno del polianión está rodeado de moléculas del FH⁺ que neutralizan su carga.

Este fenómeno fue observado por Palena MC (2012), quien generó dispersiones inter polielectrolito entre Eudragit® E y Eudragit® L utilizando At o ácido benzoico como fármacos modelo, y obtuvo un nivel de confluencia del ζ que tiende a cero a medida que se neutraliza la totalidad de los grupos ionizables de dichos PE.

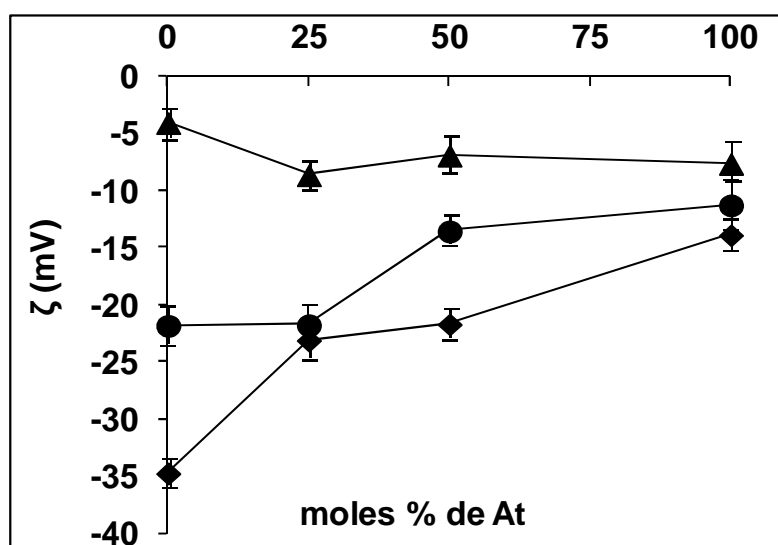


Figura 3.5: Variación del potencial electrocinético en función de el agregado de moles % de At, para: (▲) HiH-At, (◆) HiNa-At y (●) HiH-Na₅₀-At.

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

En la figura 3.6, se correlacionó la conductividad estequiométrica de las dispersiones Hi-At con la raíz cuadrada de la concentración molar de At ($[At]^{0.5}$) según Jimenez Kairuz AF (2004) para el sistema Hi-At₁₀₀ en comparación con el clorhidrato de At (At HCl), de acuerdo con la ley de Kohlrauch.

El At HCl, siendo la sal de una base con un alto grado de disociación, origina un perfil elevado en conductividad específica con pendiente negativa cumpliendo con la ley de Kohlrauch (Rajeev J, 2011; Bockris y Redy, 1998). Las dispersiones Hi-At₁₀₀ exhiben conductividades estequiométricas menores que la solución de At, lo que estaría asociado a la menor movilidad de las moléculas AtH⁺ como consecuencia de las interacciones con la macromolécula aniónica. Para el sistema HiH-Na-At₁₀₀ (perfil no mostrado), el comportamiento fue similar al de los complejos binarios Hi-F. Este efecto ha sido descrito para hidrogeles de Carbomer neutralizados con NaOH y F modelo (Jimenez Kairuz AF, 2004).

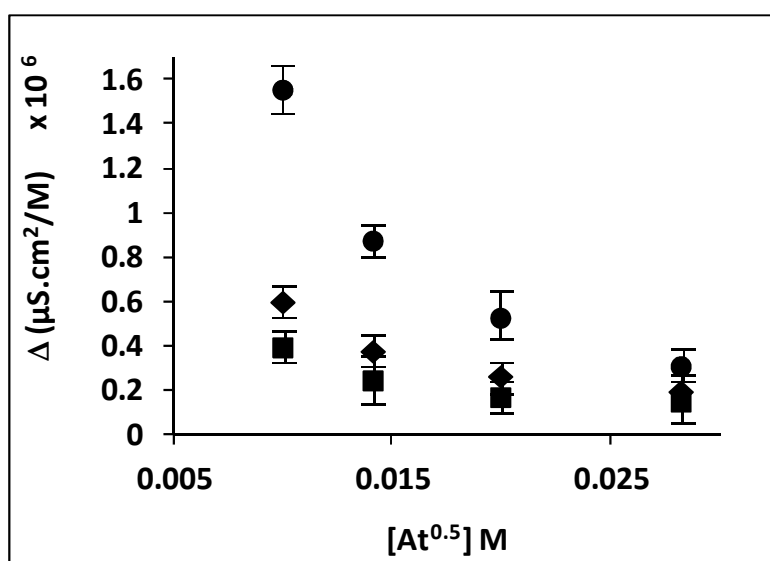


Figura 3.6: Conductividad estequiométrica en función de la raíz cuadrada de la concentración para: (■) HiH-At₁₀₀, (◆) HiNa-At₁₀₀ y (●) At HCl.

3.3.3. Determinación de la afinidad del complejo Hi-F

3.3.3.1. En sistemas bifásicos solvente orgánico/ agua

Con el propósito de caracterizar el grado de condensación iónica de los F en los sistemas desarrollados y los equilibrios involucrados en la interacción entre éstos y los PE, se determinó la distribución de las especies en el equilibrio, utilizando la técnica de partición con

solvente orgánico. La metodología utilizada para determinar la distribución de especies en equilibrio consistió en la medición del coeficiente de partición aparente (CP_{ap}) de la base libre entre la dispersión y un solvente orgánico inmisible. Este método se desarrolló de acuerdo a Jimenez Kairuz AF (2003). El cálculo de la distribución de especies requiere de algunas consideraciones previas: la concentración molar total de F acuoso $[F_T]_{aq}$ en la dispersión se encuentra distribuida de la siguiente manera (ecuación 1):

$$[F_T]_{aq} = [F]_{aq} + [FH^+]_{aq} + [RCOO\cdot FH^+]_{aq} \quad (\text{ec. 1})$$

Ciclohexano (CH) es un buen solvente para extraer selectivamente la base libre F desde la matriz de la dispersión. De esta manera se determina un valor experimental del coeficiente de partición aparente (CP_{ap}) según la ecuación 2:

$$CP_{ap} = \frac{[F]_{org}}{([F]_{aq} + [FH^+]_{aq} + [RCOO\cdot FH^+]_{aq})} \quad (\text{ec. 2})$$

donde los subíndices “org” y “aq” representan a la fase orgánica y acuosa respectivamente.

Para resolver la distribución de especies en la dispersión, es necesario: (a) conocer el coeficiente de partición verdadero (CP_v) del F en el sistema de solventes seleccionado, lo que permite inferir $[F]_{aq}$ (ecuación 3):

$$CP_v = \frac{[F]_{org}}{[F]_{aq}} \quad (\text{ec. 3})$$

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

(b) A partir de la medición del pH de las dispersiones en el equilibrio luego de la partición se determina la $[H^+]$. La ecuación 4 expresa la K_a del F en cuestión, lo que permite obtener la relación entre base libre y base protonada del mismo:

$$K_a = \frac{[F][H^+]}{[FH^+]} \quad (\text{ec. 4})$$

De esta manera, es posible calcular las concentraciones de F en sus distintas especies: $[F]$, $[FH^+]$ y $[RCOO \cdot FH^+]$. Esto es válido al considerar el sistema como dos compartimentos, tal como se muestra en la figura 3.7, formado por los solventes inmiscibles, en donde la única especie que particiona es la base en su forma neutra (F), mientras que (FH^+) y H_i quedan retenidos en la fase acuosa. A medida que F particiona a la fase orgánica, FH^+ se disocia en agua, y como consecuencia de esta disminución, esta especie se regenera a partir de $RCOO \cdot FH^+$ actuando este par iónico como un reservorio de F, hasta que, una vez saturada la fase orgánica se alcanza el equilibrio químico.

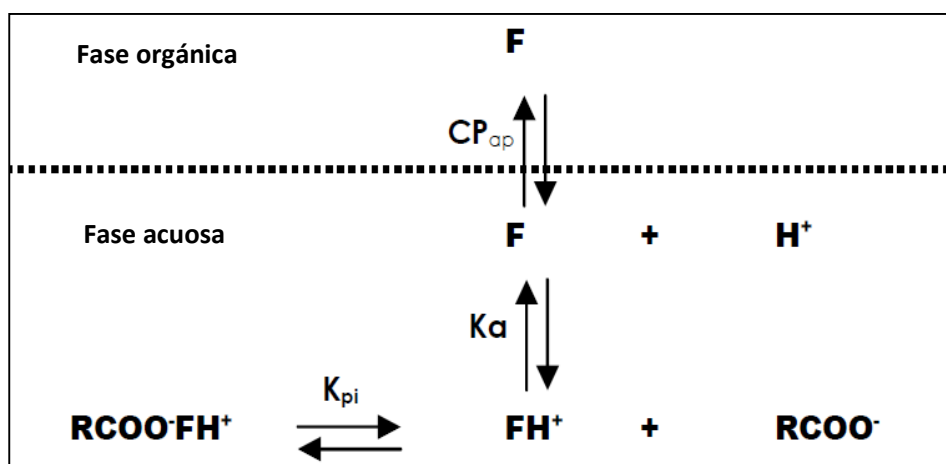


Figura 3.7: Representación esquemática de la partición del F desde dispersiones (Hi-F) con un solvente orgánico inmiscibles entre sí.

El cálculo de la afinidad entre PE y F se obtiene aplicando la ley de acción de masas y calculando la constante de afinidad de formación de par iónico (K_{pi}).

$$K_{pi} = \frac{[RCOO\text{-}FH^+]}{[RCOOH][F]} \quad (\text{ec. 5})$$

Combinando esta ecuación con la ecuación 4, y reemplazando $[F]$ se obtiene la ecuación 6, donde:

$$K_{pi} = \frac{[RCOO\text{-}FH^+][H^+]}{[RCOOH]K_a[FH^+]} \quad (\text{ec. 6})$$

Para resolver esta ecuación, es necesario conocer:

$$[RCOOH]_{\text{est}} = [RCOOH] + [RCOO^-] + [RCOO\text{-}FH^+] \quad (\text{ec. 7})$$

donde $[RCOOH]_{\text{est}}$ corresponde a la concentración estequiométrica del PE en la dispersión.

Dado que se conoce $[RCOOH]_{\text{est}}$ y que $[RCOO\text{-}FH^+]$ se determina experimentalmente, resta conocer $[RCOOH]$ o $[RCOO^-]$. Para calcular $[RCOO^-]$ se aplica el balance de cargas:

$$[RCOO^-] + [OH^-] = [H^+] + [FH^+] \quad (\text{ec. 8})$$

Dado que en las condiciones experimentales utilizadas se cumple que:

$$[RCOO^-] > [OH^-] \text{ y } [FH^+] > [H^+] \quad (\text{ec. 9})$$

La ecuación anterior se reduce a la siguiente expresión:

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

$$[RCOO^-] = [FH^+]$$

(ec. 10)

Con el fin de conocer el grado de acomplejamiento PE-F, las proporciones de las especies F , FH^+ y el F acomplejado $[R-COO^-FH^+]$ se determinaron a través de la extracción selectiva del F neutro con CH. La tabla 3.2 informan los parámetros fisicoquímicos de los diferentes F seleccionados como modelos para la realización de los ensayos de partición, el sistema de solventes utilizados y el coeficiente de partición verdadero (CP_v) calculados para cada F en el sistema de solventes. El CP_v fue determinado experimentalmente para cada F, en el sistema de solventes seleccionado. Se supuso que el CP_v entre agua y el solvente orgánico es representativo del CP_v entre la dispersión y el CH.

Tabla 3.2: Datos fisicoquímicos de F necesarios para llevar a cabo las particiones en el sistema de solventes CH/agua.

Propiedades	Lidocaína	Propranolol
pKa	7,92	9,45
Sistema	CH/Agua	CH/Agua
CP_v	13,09	49,24

La tabla 3.3 informa las proporciones de reactivos (NaOH o HCl para ajustar el pH de las dispersiones), concentración del F modelo utilizado en cada dispersión para cada porcentaje de neutralización utilizado, y el pH antes y después del equilibrio de las dispersiones utilizadas.

Tabla 3.3: Proporción de los reactivos y pH de las dispersiones utilizadas para determinar la distribución de especies en el equilibrio.

Complejo	Composición Estequiométrica			pH	
	[F] (M)	[NaOH] (M)	[HCl] (M)	inicial	equilibrio
HiNa-Li ₂₅	9,08E-04		7,50E-04	7,02	6,24
HiNa-Li ₅₀	1,82E-03		1,50E-03	7,14	6,24
HiNa-Li ₁₀₀	3,63E-03		3,00E-03	7,24	6,29
HiNa-Pr ₂₅	9,00E-04		8,00E-04	6,58	6,28
HiNa-Pr ₅₀	1,80E-03		1,60E-03	6,68	6,46
HiNa-Pr ₁₀₀	3,60E-03		3,40E-03	6,72	6,49
HiH-Li ₂₅	9,18E-04	2,00E-03		7,35	6,79
HiH-Li ₅₀	1,84E-03	1,50E-03		7,42	6,80
HiH-Li ₁₀₀	3,67E-03	5,00E-04		7,19	6,51
HiH-Na-Li ₅₀	1,84E-03	5,00E-04		7,71	6,67

Tabla 3.4: Distribución de especies en el equilibrio después de la extracción selectiva de F

Complejo	[F] _{ac} (mol %)	Distribución de Especies (mol %) _{ac}			Log K _{pi}
		[F]	[FH ⁺]	[RCOO-FH ⁺]	
HiNa-Li ₂₅	14,0	0,94 ± 0,02	43,0 ± 1,0	56,0 ± 1,0	4,25
HiNa-Li ₅₀	31,1	0,8 ± 0,2	37,0 ± 5,0	62,0 ± 4,0	4,36
HiNa-Li ₁₀₀	64,6	0,8 ± 0,1	34,6 ± 0,5	64,6 ± 0,4	4,36
HiNa-Pr ₂₅	15,1	0,02 ± 0,01	40,0 ± 1,0	60,0 ± 2,0	5,89
HiNa-Pr ₅₀	30,8	0,03 ± 0,01	38,0 ± 2,0	61,0 ± 2,0	5,78
HiNa-Pr ₁₀₀	78,6	0,02 ± 0,01	21,0 ± 3,0	79,0 ± 3,0	6,14
HiH-Li ₂₅	18,4	1,9 ± 0,1	27,0 ± 3,0	72,0 ± 3,0	4,04
HiH-Li ₅₀	39,8	1,5 ± 0,1	19,0 ± 1,0	79,1 ± 0,8	4,18
HiH-Li ₁₀₀	83,2	0,72 ± 0,02	18,0 ± 2,0	82,0 ± 2,0	4,56
HiH-Na-Li ₅₀	34,3	1,6 ± 0,1	28,0 ± 2,0	70,0 ± 2,0	4,05

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

Por otro lado, la tabla 3.4 informa de la distribución de las especies después de la partición del complejo Hi-F con CH. Dicho cuadro también muestra la concentración estequiométrica del F en el complejo luego del equilibrio y el $\log K_{pi}$.

En la figura 3.8 podemos observar la distribución de especies luego de alcanzar el equilibrio para todos los sistemas ensayados, estos resultados revelan que una alta fracción de F (> 60%) se encuentra formando pares iónicos con Hi. Por ejemplo en HiNa-Li₁₀₀ luego de la partición con CH, la cantidad remanente de Li en la dispersión es de 64,6 %, la cual está distribuida de la siguiente manera: (L)= 0,80 %, (LiH⁺)= 34,6 % y (RCOO-LiH⁺)= 64,61 %.

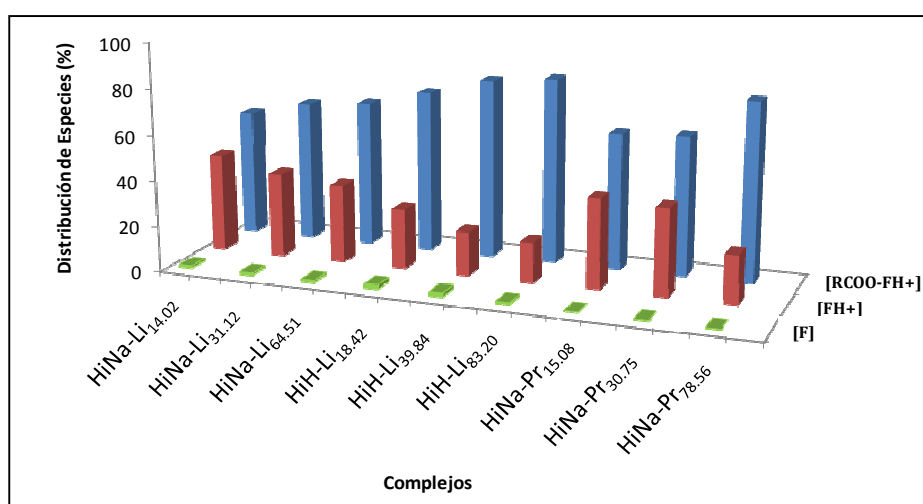


Figura 3.8: Distribución de especies luego de alcanzar el equilibrio para todos los sistemas ensayados mediante extracción por CH.

Como puede verse en la tabla 3.4 y en la figura 3.8: (a) El aumento de la proporción molar de F produce una mayor proporción de pares iónicos formados ($R-COO-FH^+$). (b) La comparación entre los complejos constituidos por HiH-Li y HiNa-Li reveló que el primero mantiene la capacidad de formación del complejo iónico a pesar de su depolimerización parcial tras su paso por la membrana de intercambio iónico. De hecho, dispersiones HiH-Li exhibieron una proporción de par iónico superior a la del PE de origen (HiNa) debido mayoritariamente a una menor cantidad de iones inorgánicos (Na^+). La Li formando parte del complejo ternario (HiH-Na-Li), exhibió una proporción de F acomplejado que se encuentra entre los valores de ambos complejos binarios. De acuerdo con estos resultados, el $\log K_{pi}$ de los complejos con Li, no mostraron diferencias apreciables en sus valores (valores entre 4,04 y 4,56). (c) La serie de complejos con Pr exhibieron mayores valores de $\log K_{pi}$ que aquellos

obtenidos con Li lo cual está de acuerdo con el comportamiento ácido-base de las moléculas ensayadas.

3.3.3.2. En sistemas bifásicos agua/ agua

En el diseño de SPF, es importante conocer tanto su capacidad de carga como también su mecanismo de liberación. En particular, en los sistemas PE-F es necesario el conocimiento de la distribución de especies en el equilibrio como se nombró en el punto anterior. En nuestro grupo de investigación se puso a punto la técnica de determinación de especies en el equilibrio mediante diálisis de las dispersiones PE-F en un sistema agua/agua. Conserva los principios de la extracción por solventes, anteriormente detallada, con la principal ventaja que esta técnica respecto a la anterior prescinde del uso de solventes orgánicos, además se pueden obtener resultados reproducibles y se pueden analizar una variedad de F con diferentes propiedades fisicoquímicas, tales como la lipofilicidad, factor limitante en la determinación de especies en el equilibrio mediante partición. En esta técnica, nos valimos de la difusión selectiva de la especie neutra del F desde el compartimiento donador hacia el receptor. Tanto el H_i como FH^+ tienen impedido su paso por la membrana de diálisis principalmente por el peso molecular y por estar impedido electrostáticamente, respectivamente. Una vez alcanzado el equilibrio de diálisis, es posible determinar las especies presentes en el compartimiento receptor. Para ello, es necesaria la determinación de la $[H^+]$, así como también la concentración molar del F en éste compartimiento. En estas condiciones, debido a que F es la única especie capaz de difundir libremente entre ambos compartimentos, la concentración del F neutro en el compartimiento donador y receptor son iguales. Conociendo $[F]$ en el compartimiento donador y la $[H^+]$ en la misma fase, es posible determinar $[FH^+]$, y por defecto la fracción de $[FH^+]$ formando parte del complejo iónico.

Con el fin de conocer el grado de formación de par iónico PE-F, las proporciones de las especies F, FH^+ y el F acomplejado $[R-COO-FH^+]$ se determinaron a través de la diálisis de los complejos en un sistema bifásico agua/ agua separados por una membrana semipermeable de acetato de celulosa. La tabla 3.5 informa de las proporciones de reactivos de las dispersiones $HiH-F$ y $HiNa-F$ utilizadas para determinar la distribución de especies en el equilibrio para At y Li seleccionados como F modelo. Por otro lado, la tabla 3.6 informa la distribución de las especies en el equilibrio después de la diálisis de los complejos en el sistema bifásico. Dicho

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

cuadro también muestra la concentración estequiométrica de F en el equilibrio, el pH de las dispersiones (pH_D) y del compartimento receptor (pH_R), así como también el $\log K_{pi}$.

Tabla 3.5: Proporción de reactivos de las dispersiones utilizadas para determinar la distribución de especies en el equilibrio.

Compuesto	Neutralización Inicial (% F)	Iones iniciales (M)		Concentración (F) [M]
		[Cl ⁻]	[Na ⁺]	
HiNa-At	25	2,80E-05	1,22E-04	3,07E-05
	50	5,50E-05	1,22E-04	6,14E-05
	100	1,12E-04	1,22E-04	1,22E-04
HiNa-Li	25	7,00E-06	1,22E-04	2,88E-05
	50	1,50E-05	1,22E-04	5,76E-05
	100	3,70E-05	1,22E-04	1,22E-04
HiH-At	25	-	2,22E-04	3,07E-05
	50	-	1,87E-04	6,14E-05
	100	-	1,62E-04	1,22E-04
HiH-Li	25	-	2,87E-04	2,88E-05
	50	-	2,47E-04	5,76E-05
	100	-	2,34E-04	1,22E-04

Tabla 3.6: Distribución de especies en el equilibrio después de la diálisis de los complejos en un sistema bifásico agua/ agua.

Compuesto	% F _D inicial	pH _D	pH _R	% F _D final	Distribución de especies (%)			log K _{pi}
					[RCOO-FH ⁺]	FH ⁺	F	
HiNa-At	25	6,79	7,65	18,39	75,2 ± 0,5	24,7 ± 0,9	0,10 ± 0,02	4,78
	50	7,00	7,69	36,68	78,8 ± 0,3	21,1 ± 0,2	0,08 ± 0,01	4,88
	100	7,20	7,80	66,62	80,0 ± 1,0	19,8 ± 0,1	0,07 ± 0,01	4,94
HiNa-Li	25	6,79	7,41	13,14	70,7 ± 0,8	26,3 ± 0,3	2,9 ± 0,6	3,29
	50	7,01	7,56	23,7	75,7 ± 0,3	20,8 ± 0,2	3,5 ± 0,9	3,24
	100	7,09	7,61	53,4	77,7 ± 0,2	19,2 ± 0,4	3,0 ± 1,0	3,34
HiH-At	25	6,45	7,52	20,91	77,0 ± 0,9	22,8 ± 0,7	0,20 ± 0,05	5,39
	50	6,59	7,61	43,18	79,7 ± 0,2	20,0 ± 0,5	0,30 ± 0,06	5,41
	100	6,97	7,69	78,43	85,0 ± 0,2	14,2 ± 0,9	0,80 ± 0,05	5,42
HiH-Li	25	6,38	7,50	19,35	74,3 ± 0,4	25,0 ± 0,2	0,70 ± 0,1	3,72
	50	6,51	7,64	39,92	76,8 ± 0,2	22,2 ± 0,4	0,8 ± 0,5	3,86
	100	6,71	7,70	74,92	80,6 ± 0,7	18,3 ± 0,4	1,0 ± 0,6	3,87

Como puede verse en la tabla 3.6, el aumento de la proporción molar de F agregado al Hi aumenta el porcentaje de pares iónicos formados ($R-COO-FH^+$) así como se observó en la extracción por solvente. Mediante esta técnica se verificó la capacidad acomplejante de la especie neutra del HiH para ambos F modelo, At y Li. Se verificó que las dispersiones HiH-F exhibieron una proporción de par iónico superior a la del PE de origen (HiNa) en gran parte por la presencia de una menor cantidad de iones inorgánicos en dispersión. La serie de complejos con At exhibieron mayores $\log K_{pi}$ que aquellos obtenidos con Li, lo cual está de acuerdo con las características ácido-base de las moléculas ensayadas.

En la figura 3.9 se puede observar el % de F agregado antes del equilibrio y luego de alcanzado el mismo para los complejos HiH-Li y HiNa-Li.

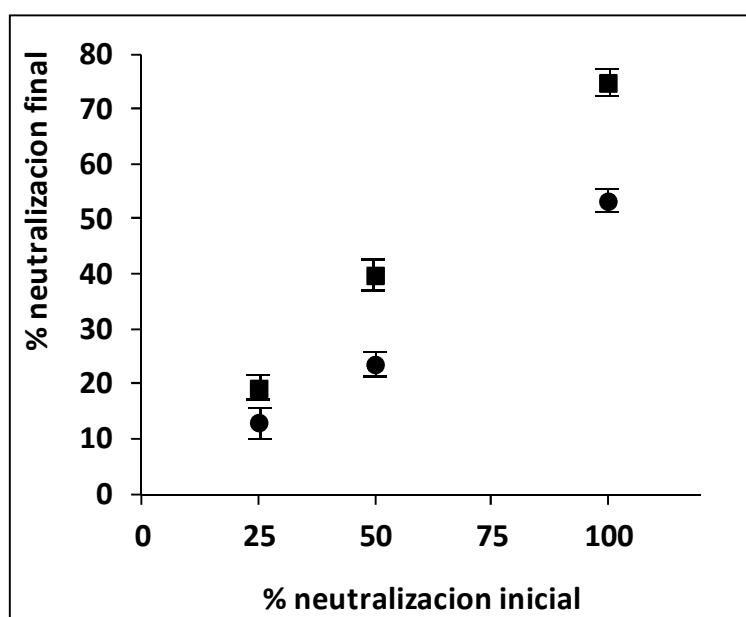


Figura 3.9: Porcentaje de F agregado antes del equilibrio y el remanente luego del equilibrio para los complejos (■) HiH-Li y (●) HiNa-Li.

Como se puede ver, existe una correlación lineal entre el F que se agregó inicialmente para preparar los complejos (25-100%) y el que quedó remanente luego de haber alcanzado el equilibrio. Este hecho demuestra que se cumple con la ley de acción de masa tras alcanzado el equilibrio de diálisis. Este comportamiento también se observó para la serie de complejos de HiH-At y HiNa-At.

3.3.4. Reversibilidad del sistema: Efecto de la adición de otras especies sobre los equilibrios

Como se puede asumir del modelo propuesto, el agregado de iones al sistema debería generar desplazamientos de especies como consecuencia de intercambios iónicos y reagrupamientos de cargas (equilibrio 3 y 4). Por lo tanto nos resultó muy interesante evaluar el efecto que produce el agregado NaCl sobre el pH de las dispersiones y la distribución de especies, así como también el efecto que puede resultar del agregado de un no electrolito como glucosa.



Se determinó el efecto que produce sobre los equilibrios de formación de par iónico la adición de NaCl mediante mediciones de pH y distribución de especies en el equilibrio. En la figura 3.10, podemos observar el efecto que tiene sobre los equilibrios de diálisis, el agregado de una sal neutra en el compartimiento donador.

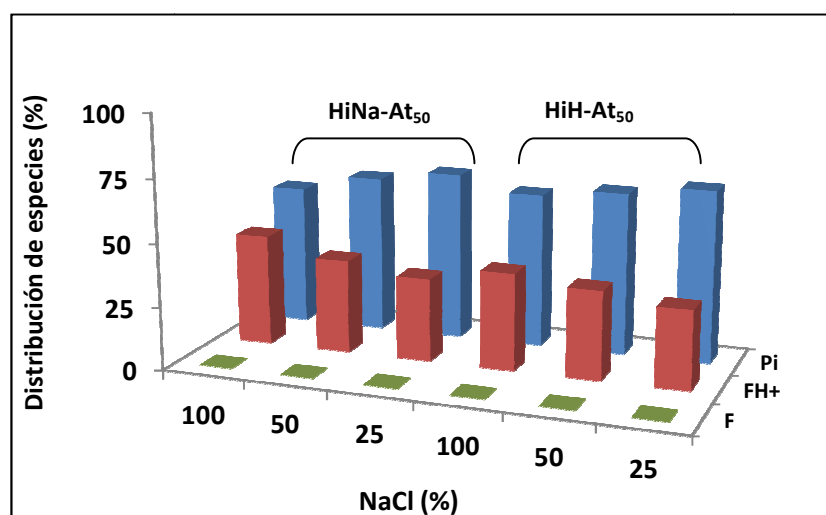


Figura 3.10: Distribución de especies en el equilibrio mediante la diálisis de los complejos HiH-At₅₀ y HiNa-At₅₀ con en agregado en el compartimiento donador de proporciones crecientes de NaCl respecto a los grupos ionizables del PE.

La metodología de diálisis permitió medir los cambios en las proporciones de las diferentes especies producidos por la adición de concentraciones crecientes de NaCl. En la figura 3.10, se observa el incremento de la proporción de FH^+ en el seno de la solución, lo que se refleja por una paulatina disminución de la concentración de $RCOO-FH^+$ a medida que aumenta la proporción de NaCl adicionado. El intercambio se complementa con la presencia de iones Cl^- en el seno de la solución. Debido a esto, la proporción de base libre no se modifica significativamente y la fracción de F que difunde al compartimento receptor se mantiene prácticamente constante. Este fenómeno demuestra también la reversibilidad del sistema Hi-F en presencia de NaCl en concentración fisiológica.

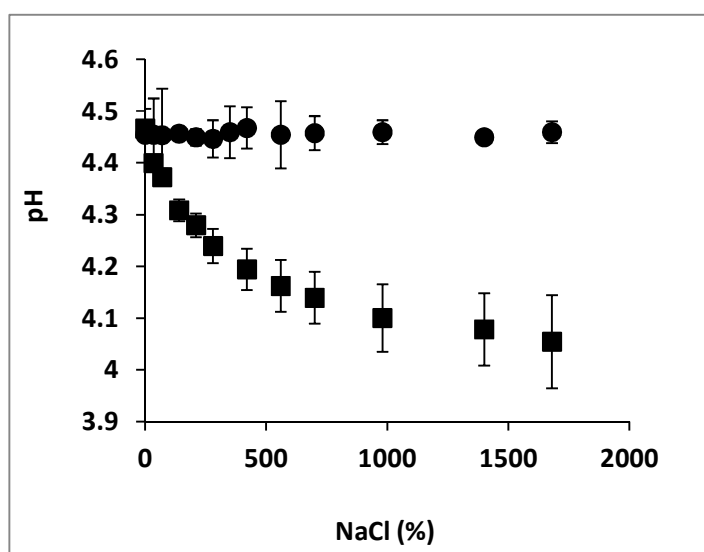


Figura 3.11: Variación del pH en dispersiones HiH-Na-At₂₅ tras el agregado de porcentajes crecientes de: (■) NaCl 0,9 % p/v y (●) Glucosa, respecto a la cantidad de grupos ionizables del PE.

La figura 3.11 muestra que la adición de NaCl produce una importante disminución de pH en dispersiones al 0.1% p/v de HiH-Na-At₂₅. Este comportamiento indica un intercambio iónico de acuerdo con los equilibrios 3 y 4. La liberación del ácido conjugado FH^+ tiene un efecto protogénico que origina la disminución de pH observada. Además, el desplazamiento de F no es total y estaría limitado por las afinidades de FH^+ y Na^+ por el PE, por lo que mayores agregados de sal neutra no generan cambios proporcionales y significativos de pH. Se determinó también el efecto sobre el pH de las dispersiones con el agregado de un no-electrolito como la glucosa. En este caso no se observaron cambios en el pH, lo que se puede interpretar como que la glucosa no produce desplazamientos de F desde el complejo (Hi-F). Cabe aclarar que esta observación también se cumple para los complejos binarios HiH-At₂₅ y

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

HiNa-At₂₅, con diferentes porcentajes de cargado del PE con el F y para otros F modelos básicos como Li.

Este fenómeno fue observado por Jimenez Kairuz AF (2004) para la serie de complejos entre Carbomer acomplexados con Li, en donde el agregado de concentraciones crecientes de NaCl producía un efecto protogénico con la posterior disminución del pH del sistema. Un efecto contrario, pero que nos estaría indicando reversibilidad en el sistema PE-F fue observado para PE básicos como el Eudragit E (Quinteros MD, 2008), en los cuales el agregado de NaCl produce una elevación del pH del sistema.

El modelo propuesto en la figura 3.12 presenta el sistema PE-F, contemplando las interacciones relevantes que ocurren tanto en el entorno del PE como en el seno de la solución (Jimenez Kairuz AF, 2004).

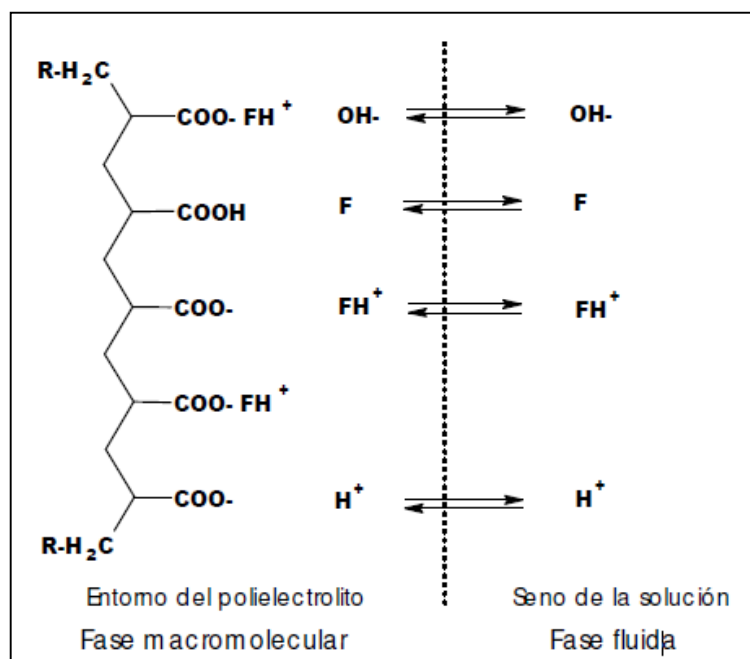


Figura 3.12: Modelo que representa la distribución de todas las especies en equilibrio en un sistema Hi-F.

En las dispersiones PE-F, debido a la atracción electrostática de las cargas negativas de la fase macromolecular, en condiciones de equilibrio, la concentración de especies catiónicas, H^+ , FH^+ , en el entorno del PE debería ser mayor que en el seno de la solución. Del mismo modo, la concentración de OH^- debería ser mayor en el seno de la solución que en el entorno del PE. Además, en el seno de la solución por requerimiento de electro-neutralidad y en ausencia de otras especies, se cumple que:

$$[OH^-] = [H^+] + [FH^+] \quad (\text{ec. 14})$$

De acuerdo con el modelo propuesto, el entorno del PE se caracteriza por un menor valor de pH que el seno de la solución y por una alta proporción de FH^+ presente bajo la forma de pares iónicos. Este modelo además supone que la concentración de especies neutras del F es igual en ambos entornos (entorno del PE y seno de la solución). Este modelo propuesto, nos permite explicar el comportamiento del Hi como SPF en condiciones de equilibrio.

3.3.5. Difracción de rayos X de los complejos Hi-F

HiNa y HiH, como la mayoría de los polímeros, presentan un patrón de difracción nulo, correspondiente a un sólido amorfo, que se caracteriza por presentar una banda dispersa de baja intensidad a lo largo de todo el espectro de $2\theta/\theta$. En cambio los F cristalinos, en general, producen un espectro de rayos X característico, presentando picos intensos a determinadas valores de $2\theta/\theta$. En las figuras 3.13 se muestran los patrones de rayos X característicos para la serie de Hi (HiNa y HiH) y la de los F seleccionados como modelos de molécula contraíón (At y Li).

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

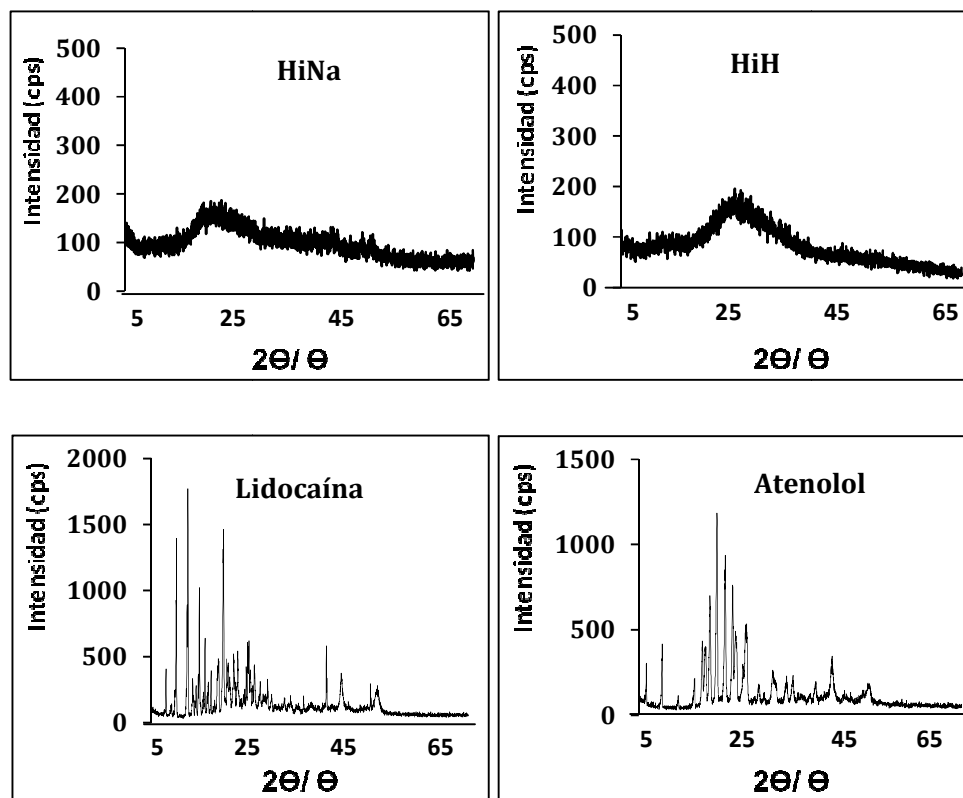


Figura 3.13: Difracción de rayos X de HiH, HiNa y los fármacos modelo seleccionados en el intervalo $2\theta/\theta$.

Como puede verse, tanto el HiH como el HiNa, presentan un diagrama de difracción nulo, que se caracteriza por presentar una banda dispersa de baja intensidad. En contraste, Li y At presentan un difractograma de sólido cristalino.

La figura 3.14 muestra el difractograma para los complejos Hi-At₅₀ y sus respectivas mezclas físicas. Cabe aclarar que se obtuvieron resultados similares para las demás series de complejos Hi-At y Hi-Li. Como se puede observar en la figura, en los materiales PE-F obtenidos por liofilización, donde se comprobó la interacción electrostática, las señales del F cristalino desaparecen completamente y el difractograma corresponde al de sólidos amorfos. Por otro lado, cuando se analizaron las mezclas físicas de Hi con At en proporciones estequiométricas similares a los complejos, la cristalinidad del F se mantuvo y los espectros presentaron similitudes con los del F puro, aunque con menor intensidad probablemente por un fenómeno de dilución de la muestra.

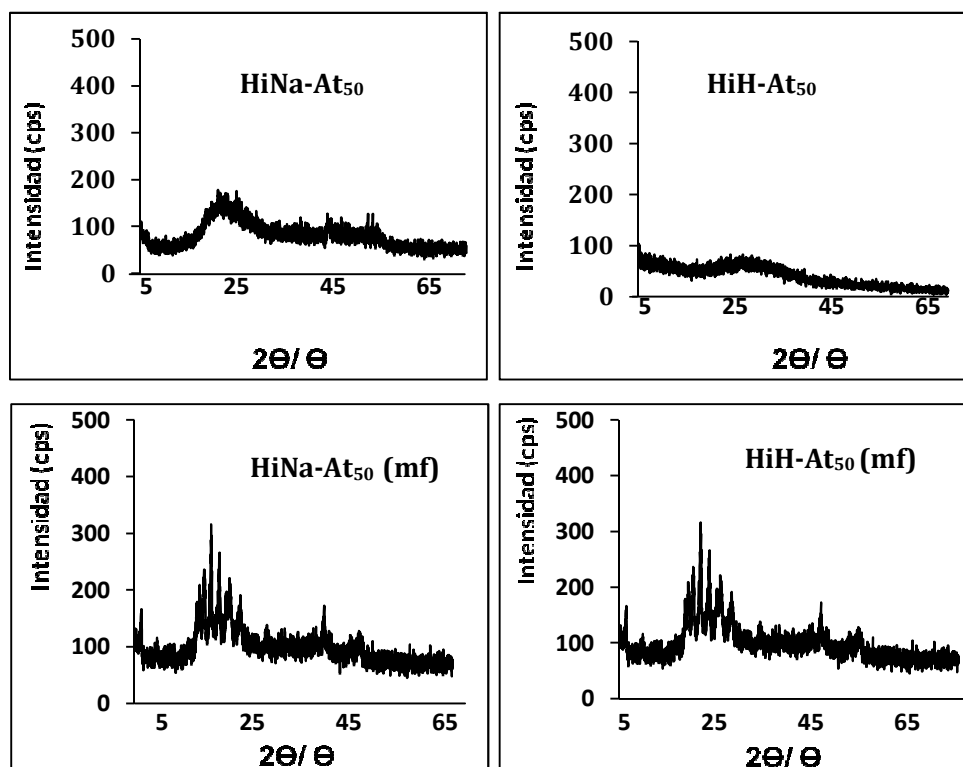


Figura 3.14: Difracción de RX de los complejos iónicos entre HiNa-At₅₀ y HiH-At₅₀ y sus respectivas mezclas físicas (mf).

Existen antecedentes en nuestro grupo de investigación que los complejos binarios obtenidos por interacción iónica entre un F cristalino con un polímero dan origen a un material amorfo (Esteban S, 2009; Quinteros DA, 2008; Ramírez Rigo MV, 2006; Jiménez Kairuz AF, 2004). La ausencia de F libre como consecuencia de la alta condensación iónica con el PE, implica que los complejos no presenten el difractograma característico de cada F en su forma pura.

3.3.6. Espectroscopia infrarroja de los complejos Hi-F

El análisis de los espectros FTIR de Hi, así como también los productos Hi-F será motivo de discusión en esta sección del capítulo.

Cuando se produce la neutralización del HiNa para obtener el HiH (figura 3.15), se pueden observar cambios significativos en el espectro IR de la molécula. Principalmente se observa la aparición de una banda a los 1732 cm⁻¹ correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo COOH del polímero ácido. Se observa a su vez la desaparición de un pico a los

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

1600 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo COO^- de la sal sódica lo cual habla claramente de la protonación del Hi. Además, se puede ver la desaparición de una banda a los 1415 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-O del grupo COO^- . Se puede observar también la aparición de una banda a los 1220 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C-O del COOH . Por último, se detecta la desaparición de la banda a los 1560 cm^{-1} , esta banda corresponde al estiramiento del enlace N-H del grupo amida como consecuencia de la formación de puente H con los monómeros colindantes. Su desaparición refleja la pérdida de la capacidad de la molécula para interactuar mediante este enlace.

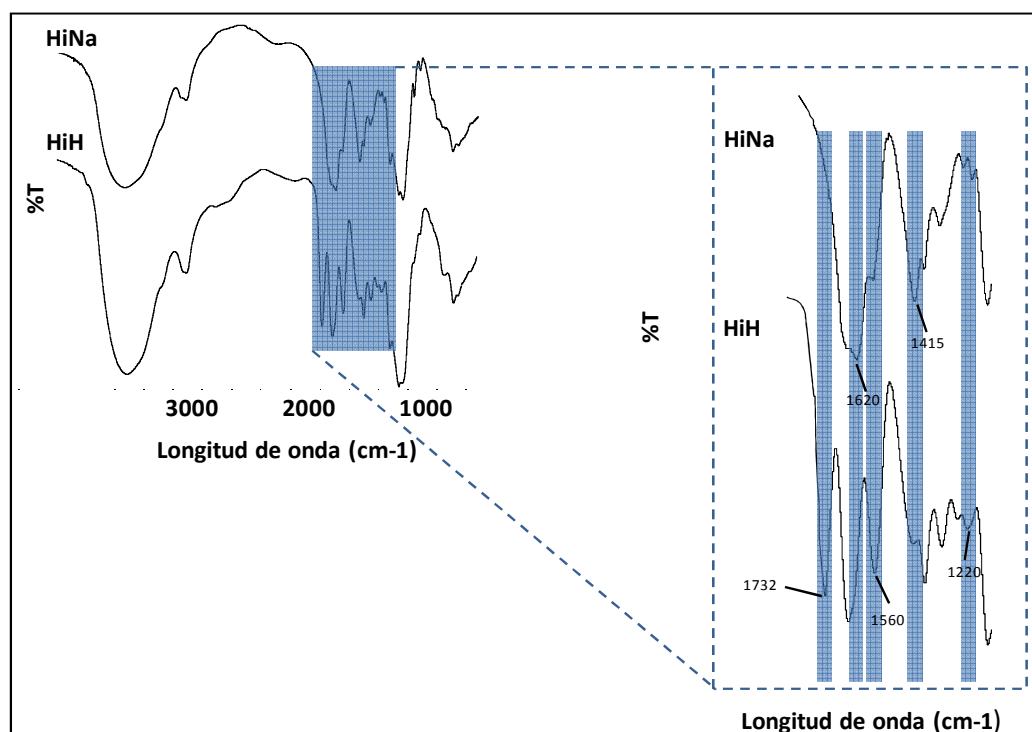


Figura 3.15: Espectros FTIR comparativos de la molécula de HiNa y HiH.

De la misma manera se procedió para analizar todas las series de materiales (Hi-F) obtenidos en forma sólida, en la tabla 3.7 se informan las asignaciones de frecuencias más importantes, correspondientes a los grupos que conforman cada molécula de PE y de F.

Tabla 3.7: Asignaciones de frecuencias por FTIR más importantes de los PE y los F modelos seleccionados.

Asignaciones	$\nu(\text{cm}^{-1})$			
	HiNa ^(a)	HiH ^(a)	Atenolol	Lidocaína
C=O (COOH)	-	1732	-	-
C=O amida	1675	1675	1642	1659
C-O (COOH)	-	1220	-	-
C=O (COO ⁻)	1600-1620	-	-	-
C-O ⁻ (COO ⁻)	1390; 1415	-	-	-
NH amida	1565	1565	1400; 1500	1499
C-O C _{anti} simétrico	1165; 1145	1165; 1145	1235	-
NH y NH ₂	-	-	3165	3020; 3290
OH	3300	3300	3340	-

^(a) Haxaire K, 2003.

El análisis espectroscópico permite diferenciar claramente la presencia de interacciones PE-F. En la figura 3.16 se observan los espectros de Li, los complejos iónicos HiH-Li y la mezcla física (mf) de ambos compuestos HiH y Li. Como se puede ver, cuando se lleva a cabo el proceso de cargado del HiH con el contraión Li, se ve la desaparición progresiva de la señal a los 1732 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del enlace C=O del grupo COOH. Al mismo tiempo se puede ver que hay una aparición de un hombro a los 1600-1620 cm^{-1} que por deconvolución se observó que se debía a un pico correspondiente a la vibración del enlace C=O en el grupo COO⁻. Por último, la mezcla física se presenta como una suma de las asignaciones de HiH y Li.

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

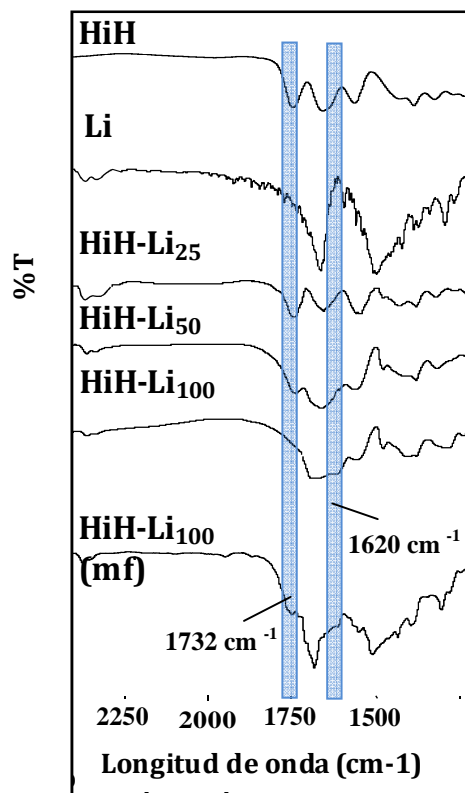


Figura 3.16: Espectros FTIR de Li frente a materiales HiH-Li con diferentes proporciones de Li y la mezcla física de ambos compuestos (mf).

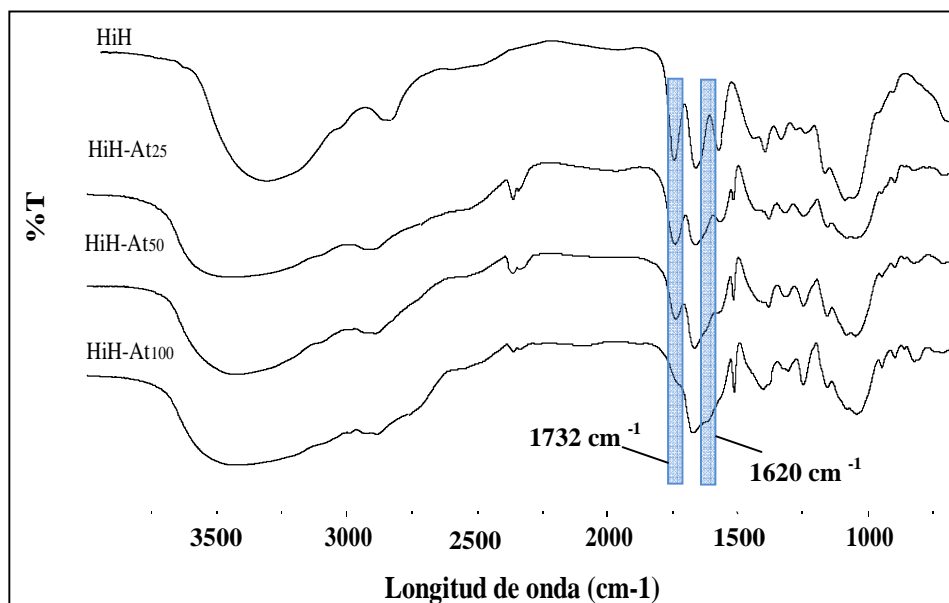


Figura 3.17: Espectros FTIR de los complejos HiH-At con diferentes proporciones de At.

La figura 3.17 muestra que el mismo fenómeno se observa para el At cuando es seleccionado como F modelo y se acompleja al HiH. Existe una disminución de la intensidad de la banda correspondiente a la vibración del grupo COOH mientras que hay una aparición de la banda correspondiente a la vibración del grupo carboxilato.

La figura 3.18 muestra los espectros FTIR de los complejos iónicos HiNa-At con distintos porcentajes de neutralización del PE con At, el F y sus respectivas mezclas físicas. Existe una banda en el HiNa a los 1565 cm^{-1} que corresponde a la vibración del enlace N-H de la amida del PE encargada de establecer puente hidrógeno con el grupo carboxilato del PE como se dijo anteriormente. Se observa en el gráfico que esta banda disminuye a medida que aumenta el porcentaje de neutralización con At, esto puede deberse a que el acomplejamiento del PE con el F suprime posiblemente la posibilidad del grupo COO^- para interactuar con las moléculas de polímeros aledañas formando puente hidrógeno con el grupo amida vecino. Este hombro disminuye progresivamente a medida que se aumenta el porcentaje de neutralización con el F contraión. En este caso, no se puede observar el aumento de la frecuencia de vibración del grupo COO^- a los 1415 cm^{-1} con el aumento del porcentaje de neutralización ya que hay superposición con picos característicos del F y el PE. Por otro lado, At presenta una banda a 3165 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo amino (enlace N-H) de la molécula. Cuando el F esta acomplejado, se puede observar que este pico característico desaparece lo que nos sugiere que los grupos amino se encuentran protonados e interactuando electrostáticamente con el PE. Por último, la mezcla física se presenta como una suma de las asignaciones de HiNa y el F.

Estos resultados son consistentes con los obtenidos por rayos X, confirmando que el F se encuentra interactuando electrostáticamente con el PE, y el material puede ser considerado como uno nuevo y diferente a una mezcla física de los mismos.

3- Caracterización de los sistemas Hi-F en dispersión y en estado sólido

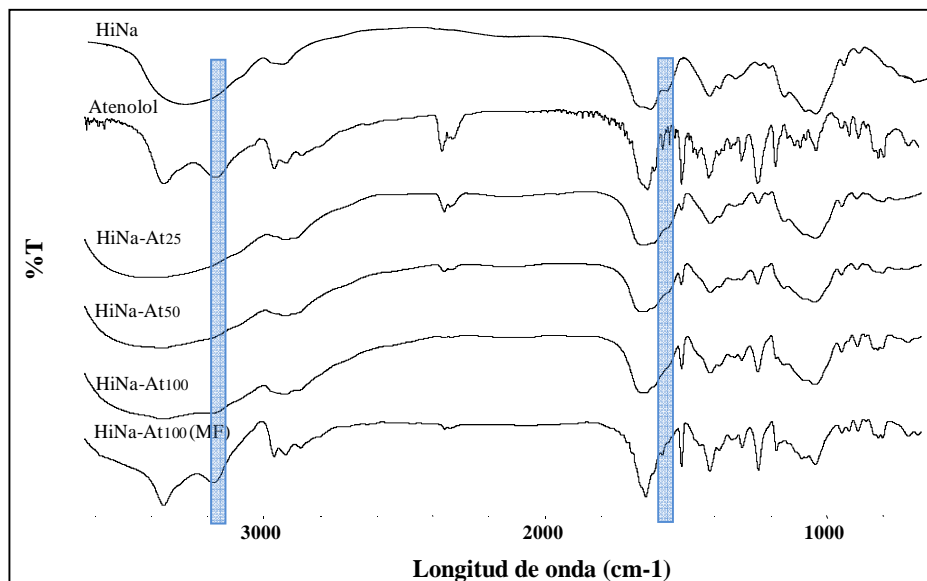


Figura 3.18: Espectros FTIR de At base frente a materiales (HiNa-At) con diferentes proporciones de At y la mezcla física (mf) de ambos compuestos.

3.4. Conclusiones

- El pH de las dispersiones Hi-F está directamente relacionado con el Hi utilizado así como también de la basicidad del F seleccionado.
- Las dispersiones HiNa-F exhiben un ζ alto y negativo reflejando la buena de la estabilidad física de estas dispersiones.
- Los valores de conductividad obtenidos son coherentes y están en concordancia con los valores de ζ respecto a la formación de complejos iónicos Hi-F.
- Los complejos Hi-F se comportan como un reservorio de F, en el cual una alta proporción del mismo está presente en la forma de pares iónicos ($RCOO\cdot FH^+$).
- Las constantes de afinidad (K_{pi}) para la formación de pares iónicos con los F ensayados están en el orden de 10^4 a 10^6 . Valores similares a los observados en los PE previamente estudiados en el grupo.
- Los complejos PE-F son reversibles en cuanto a que la adición de sales neutras a las dispersiones Hi-F produce intercambio iónico con desplazamiento parcial del F, mientras que la adición de no-electrolitos no afecta los equilibrios del sistema.

- La utilización conjunta de las técnicas de FTIR y difracción de rayos X de polos para llevar a cabo la caracterización de los complejos iónicos PE-F, permitieron identificar y caracterizar detalladamente los materiales Hi-F en estado sólido, diferenciándolos de una simple mezcla física de Hi y F.
- Se presentan como sólidos amorfos estables.
- Los materiales sólidos Hi-F obtenidos por liofilización evidencian interacción iónica entre los grupos ionizables del Hi y los de los fármacos modelos utilizados.

Capítulo 4

*Mecanismo y cinética
de liberación de los
fármacos desde los
complejos Hi-F*



4.1. Introducción

El estudio de la cinética de liberación desde un vehículo disperso o desde sistemas portadores bajo la forma de semisólidos ha sido objeto de investigación por muchos años. Un método muy simple y reproducible fue desarrollado para medir la liberación *in-vitro* de F desde estos sistemas utilizando celdas bicompartimentales de difusión, separadas por una membrana sintética (Garg R, 2014). Estos equipos son conocidos como celdas de Franz y son actualmente recomendados por la FDA (*Food and Drug Administration*) para la monitorización de la liberación de principios activos desde cremas, ungüentos e hidrogeles (*United States Pharmacopeia 37-National Formulary 32 -USP37-NF32-*; FDA- 1997). La Federación Farmacéutica Internacional publicó una guía de recomendaciones para la realización de ensayos de liberación *in-vitro* para nuevas formas farmacéuticas donde también las incluye (Brown CK, 2011). En la mayoría de las publicaciones científicas se utilizan este tipo de celdas para la evaluación de la liberación de F desde sistemas dispersos nanoparticulados (Nerella A, 2014; Budhiana A, 2008).

En los mencionados ensayos, el compartimento donador está constituido por un receptáculo en el cual se coloca el sistema a ser analizado, mientras que el compartimento receptor contiene el medio en el que se desea analizar el sistema. Por último, la interfase entre ambas es ocupada por una membrana semipermeable cuyo tamaño de poros no permite el paso de las macromoléculas como las del PE.

El análisis cinético de los perfiles de liberación mediante modelos matemáticos permite realizar una aproximación a los mecanismos involucrados en el proceso de liberación de los F desde la forma farmacéutica. En la actualidad, no existe un modelo que cubra o se ajuste perfectamente a todos los procesos físicos y químicos que pueden ocurrir en las distintas formulaciones, y por lo tanto resulta necesario evaluar cada sistema en particular (Batoool H, 2014; Fu Y, 2010; Siepmann J, 2008).

El modelo matemático más sencillo para hacer un análisis de la liberación de F fue propuesto por Higuchi en el año 1963. En este modelo, la fracción de F liberado es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, como se observa en la siguiente ecuación 1 (Higuchi T, 1963).

$$\frac{F_t}{F_\infty} = k_1 \sqrt{t} \quad (\text{ec. 1})$$

donde F_t y F_∞ representan la fracción de F liberado a un determinado tiempo “t” y la cantidad total contenida en el sistema, respectivamente. La K_1 representa la constante de liberación.

Este modelo matemático describe la liberación de F desde numerosos tipos de sistemas, como por ejemplo los transdermales, matriciales y formas semisólidas, cuando el mecanismo que gobierna la liberación es la difusión. Este tipo de cinética se ha observado principalmente en sistemas hidrofílicos hinchables conteniendo F de bajo PM y solubles en agua.

En el caso de sistemas compuestos por complejos PE-F, donde las interacciones entre estos son esencialmente del tipo iónicas, se ha propuesto que, además de la difusión del F desde el entorno del PE, existiría un aporte significativo del intercambio iónico, siendo necesaria la disociación de los pares iónicos para permitir la liberación del F desde el sistema (Jimenez Kairuz AF, 2004, 2003). Los complejos que se originan por neutralización de los grupos ácidos de un PE con F básicos se encuentran, en una gran proporción, bajo la forma de pares iónicos. Cuando se coloca agua en el compartimento receptor, la liberación del fármaco es llevada a cabo esencialmente por la especie neutra. Sin embargo, en presencia de fluidos biológicos la liberación del F es comparativamente más rápida como consecuencia del intercambio iónico. En ambas condiciones, la disociación del par iónico es la etapa limitante en la cinética de liberación, de esta manera, el sistema PE-F se comporta como un reservorio del F capaz de liberar el mismo de manera lenta al medio (Ardusso MS, 2010; Ramirez Rigo MV, 2006; Jiménez-Kairuz AF, 2004, 2003; Vilches AP, 2002). Por otra parte se ha estudiado el mecanismo de liberación de F ácidos desde dispersiones con Eudragit E100, observándose el mismo comportamiento de reservorio del F (Quinteros DA, 2008).

El objetivo de este capítulo es estudiar la cinética y el mecanismo de liberación *in-vitro* de los F desde los complejos iónicos, la reversibilidad de la interacción electrostática Hi-F, el efecto que tiene el agregado de electrolitos y no electrolitos, y los factores que pueden contribuir a modular la velocidad y cinética de liberación para predecir el comportamiento que los mismos tendrán *in-vivo*. A su vez se intentará determinar si el HiH, a pesar de su depolimerización parcial, conserva sus propiedades como SPF y produce un efecto modulador sobre la liberación del F. El análisis de la estos parámetros, y su vinculación con los estudios

4- Mecanismos y cinética de liberación de los fármacos desde los complejos Hi-F

fisicoquímicos de los mismos, permitirá acceder al conocimiento del comportamiento de estos sistemas y definir sus potenciales aplicaciones como SPF.

4.2. Materiales y Metodologías

Se utilizó el HiNa y HiH descrito previamente en el capítulo 2. At fue seleccionado como F modelo para realizar los estudios de liberación. Se preparó una solución al 1% p/v de glicina pro análisis (Gli- Cicarelli laboratorios, Arg) y una solución al 0.9% p/v de Cloruro de Sodio pro análisis (Cicarelli Laboratorios). Se utilizó agua deionizada para la realización de los ensayos.

4.2.1. Metodología de preparación de los complejos

La metodología llevada a cabo para la preparación de las dispersiones al 0,5% p/v de los complejos HiNa-At_x, HiH-At_x, y la mezcla equivalente de HiH y HiNa (HiH-Na-At_x), con "x" = 25-100% se describió previamente en el capítulo 3. Se prepararon además dos series de complejos HiNa-At₇₅ a los cuales se les agregó un 25% (moles %) respecto a los grupos -COO- del HiNa de NaCl o Gli en estado sólido para obtener los complejos HiNa-At₇₅-NaCl₂₅ y HiNa-At₇₅-Gli₂₅, respectivamente. Finalmente se preparó un complejo de HiH-At₇₅ al cual se le agregó suficiente NaOH para obtener una dispersión de pH similar al del complejo HiNa-At₇₅.

4.2.2. Mediciones de pH

Los valores de pH de las dispersiones Hi-F al 0,5% p/v se registraron de acuerdo a lo descrito previamente en el capítulo 2.

4.2.3. Estudios de liberación en celdas bicompartimentales

Este estudio se llevó a cabo utilizando celdas de difusión bicompartimentales del tipo Franz (ver figura 4.1). Las celdas fueron montadas con una membrana semisintética de acetato de celulosa (Sigma® 12.000 Da) previamente hidratada en agua durante 15 minutos. El área efectiva de difusión fue de 1.25 cm². En el compartimento donador se colocó exactamente 1 mL de la dispersión de Hi-F y se mantuvo en contacto con el compartimento receptor. La

cantidad de Hi-F colocada en cada caso fue la necesaria para garantizar que se mantengan las condiciones de sumidero, es decir que el volumen del medio sea al menos tres veces superior al requerido para obtener una solución saturada del F (USP37-NF32). En un ensayo en paralelo, se colocó en el compartimento donador una solución del F en una concentración equivalente a la utilizada en las dispersiones que se utilizó como referencia. Como medio receptor se utilizó agua o una solución de NaCl al 0.9% p/v previamente filtrados y desgasificados. El sistema se mantuvo a 37 °C y se aseguró la homogeneidad del mismo mediante agitación suave y constante. Se tomaron muestras de 0,9 mL del medio receptor a intervalos de tiempo preestablecidos con reposición del medio fresco. La concentración de F liberado se midió espectrofotométricamente a la longitud de onda de máxima absorción del F. Los resultados informados son producto del promedio de tres mediciones independientes entre sí, y fueron analizados utilizando el modelo cinético de Higuchi (ec. 1).

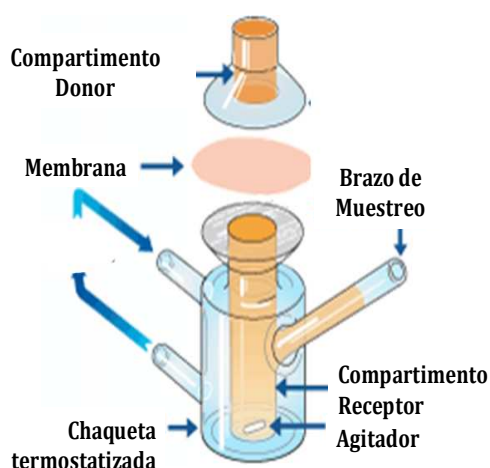


Figura 4.1: Celdas bicompartimentales del tipo Franz utilizadas para evaluar la cinética de liberación de los complejos Hi-F.

Se realizó un ensayo complementario denominado liberación facilitada, en el cual, una vez colocado el complejo Hi-At en el compartimento donador y comenzado el ensayo, se agregaron cantidades crecientes de NaCl en solución (50 y 200%) respecto a los grupos ionizables -COOH del PE en el mismo compartimento del complejo para facilitar así la liberación del F desde el entorno del PE.

4.3. Resultados y Discusión

4.3.1. pH de las dispersiones

La tabla 4.1 muestra el pH del conjunto de dispersiones al 0,5% p/v de PE utilizadas para llevar a cabo los ensayos de liberación.

Tabla 4.1: Composición estequiométrica y el pH de las dispersiones al 0,5% p/v de PE utilizadas en los ensayos de liberación de At.

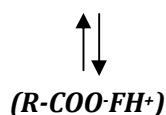
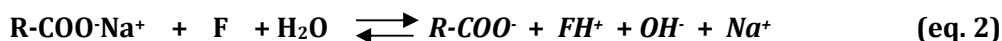
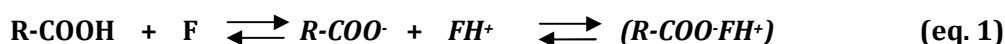
Complejo	pH (±0,05)
HiH-At ₂₅	3,56
HiH-At ₅₀	3,92
HiH-At ₇₅	4,66
HiH-At ₁₀₀	5,27
HiH-Na ₅₀ -At ₇₅	9,03
HiNa-At ₂₅	9,85
HiNa-At ₅₀	10,08
HiNa-At ₇₅	10,11
HiNa-At ₁₀₀	10,30
HiNa-At ₇₅ -Gli ₂₅	9,45
HiNa-At ₇₅ -NaCl ₂₅	9,83
HiH-At ₇₅ + NaOH ₁₀₀	10,36

4.3.2. Liberación en agua y en solución de NaCl al 0,9%

La figura 4.2 muestra los perfiles de liberación de los complejos Hi-At en comparación con el perfil de difusión de la solución de referencia de At. La liberación de At hacia agua desde las dispersiones Hi-At ocurre en forma lenta respecto a la referencia y la velocidad es proporcional a la cantidad de At total en la dispersión. Los complejos obtenidos a partir de HiH presentan un menor porcentaje de F liberado respecto al complejo HiNa-At denotando que el HiH conserva no solamente su capacidad acomplejante del F contraíón, sino que además conserva la capacidad de modular la liberación del mismo. La mayor proporción de F liberado desde los complejos HiNa-At_x respecto a los HiH-At_x, puede darse como consecuencia

del mayor pH del primer sistema, lo que suministra una mayor proporción de especies neutras del F capaces de difundir libremente al compartimento receptor. En estos casos, la difusión sería exclusivamente de la especie neutra de At ya que AtH^+ estaría retenido por el gradiente electrostático negativo provisto por el polianión. Además, el Na^+ presente en el HiNa compite con AtH^+ para interactuar con los grupos $-COO^-$ del PE. La mayor viscosidad exhibida por complejos constituidos a partir de HiNa no tiene un efecto relevante en la modulación de la liberación del F si se lo compara con su homólogo HiH que presenta una viscosidad menor. Cuando se agregó suficiente NaOH al complejo HiH-At₇₅ para obtener un valor de pH similar al complejo HiNa-At₇₅, se obtuvieron perfiles de liberación similares al de este último sistema (dato no mostrado).

La velocidad de difusión de At es mayor que el de AtH^+ . A medida que At difunde desde el entorno del complejo PE-F hacia el compartimento receptor, como se observa en los equilibrios 1 o 2, el sistema responde proporcionando más F libre al medio.



4- Mecanismos y cinética de liberación de los fármacos desde los complejos Hi-F

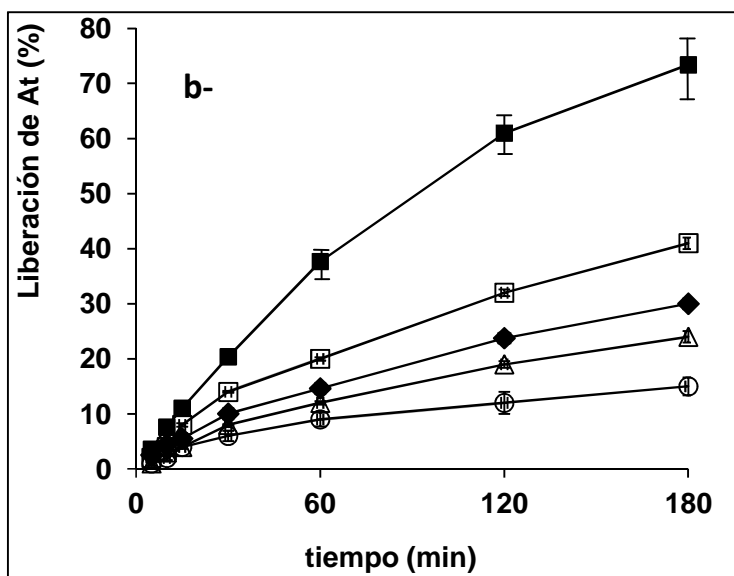
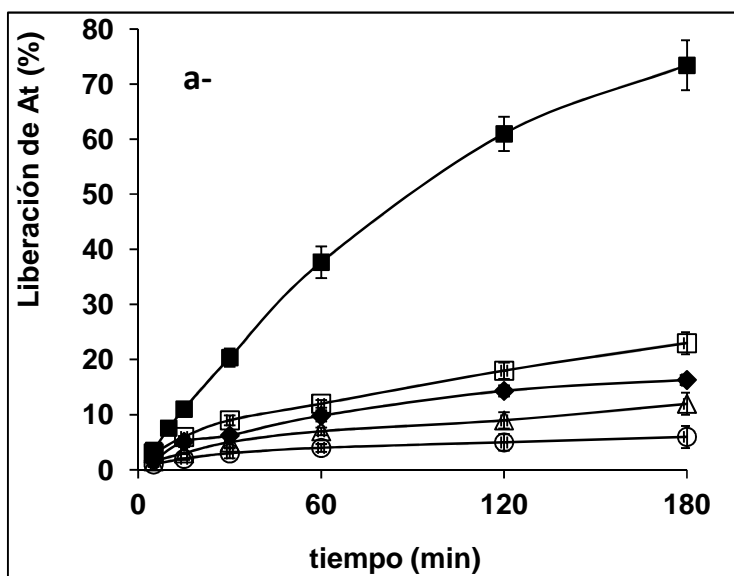


Figura 4.2: Perfiles de liberación de At desde dispersiones a- HiH-At_x y b- HiNa-At_x en agua, donde x=100 (□), 75 (◆), 50 (Δ), 25 (○). Solución de At (■).

La figura 4.3 muestra el porcentaje de At liberado en función de la raíz cuadrada del tiempo para los complejos HiH-At₇₅, HiNa-At₇₅ y HiH-Na-At₇₅. Como se puede observar en la figura, se verifica que los perfiles de liberación para cada uno de los complejos se ajustan perfectamente a la ecuación propuesta por Higuchi que sugiere que la liberación del F desde los complejos ocurre a través de un mecanismo difusional del F desde el entorno del PE. Por otra parte, y como se viene planteando, el complejo constituido por HiNa y At, tiene una cinética de liberación mayor que el formado por HiH y At. El dato curioso de destacar es que el complejo constituido por la mezcla ternaria entre HiH, HiNa y At posee una cinética de liberación que predeciblemente se ubica entre los perfiles expuestos con anterioridad.

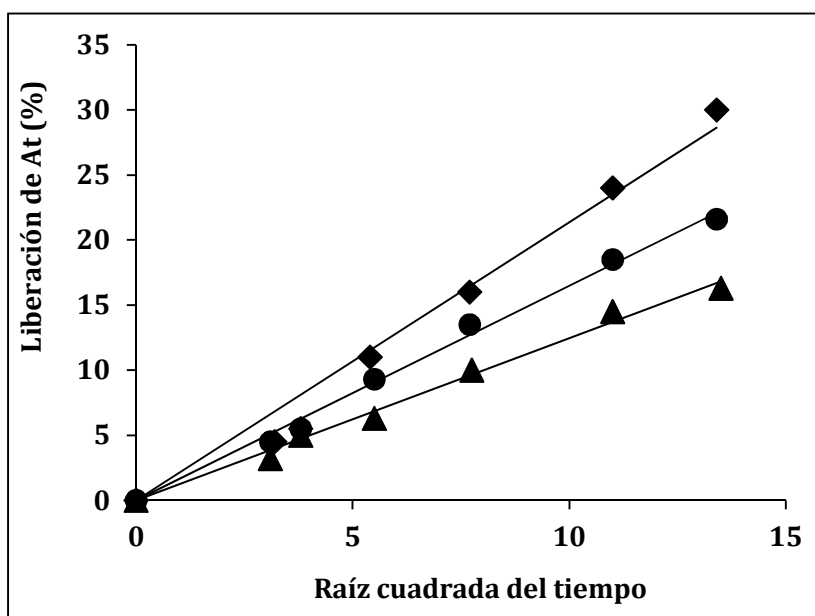


Figura 4.3: Perfil de liberación de At desde las dispersiones hacia agua en función de la raíz cuadrada de tiempo. HiNa-At₇₅ (♦); HiH-Na-At₇₅ (●); HiH-At₇₅ (▲)

La tabla 4.2 informa los valores de la k de liberación en agua obtenidos a través de la ecuación 1 para la serie de complejos de HiH-At y HiNa-At con distintos porcentajes de neutralización.

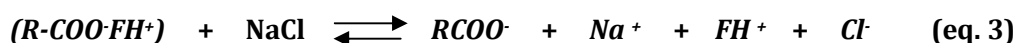
4- Mecanismos y cinética de liberación de los fármacos desde los complejos Hi-F

Tabla 4.2: Constante de la cinética de liberación en agua: Pendiente de la ecuación de Higuchi (ec. 1), % F liberado en función de la raíz cuadrada del tiempo para ambos complejos de HiH-At y HiNa-At.

% F	k de liberación	
	HiNa-At	HiH-At
25	1,8	0,6
50	2,0	1,2
75	2,3	1,3
100	2,8	1,8

Como se puede observar en la tabla 4.2, la cinética de liberación tiene correlación directa con la proporción de F incorporado en el sistema. Esto está en línea con los mecanismos de liberación propuestos para otros complejos PE-F previamente estudiados y con los resultados obtenidos en el capítulo anterior, respecto a la distribución de especies en el equilibrio. Como se determinó, existe una correlación entre la proporción de F incorporado al PE y la de pares iónico formados ($R-COO-FH^+$), y por lo tanto, a la cinética de liberación de F desde los complejos. Esto se da como consecuencia que, a medida que hay una mayor proporción de par iónico formado, existe una mayor capacidad del complejo PE-F a proveer al medio una mayor proporción de F.

La figura 4.4, muestra la adición de Gli (no electrolito) y NaCl en concentraciones similares (25 moles %) al complejo iónico HiNa-At₇₅. Como se puede observar, el agregado de Gli no afecta a la velocidad de liberación de At desde complejos (perfecta superposición con el perfil del complejo HiNa-At₇₅). Sin embargo, la adición de la misma proporción de NaCl produce un aumento en el porcentaje de F liberado a través del mecanismo de intercambio iónico presentado en el siguiente equilibrio.



Gli al ser un no-electrolito, no produce perturbación alguna en la interacción electrostática PE-F. Por su parte, el agregado de NaCl tiene dos consecuencias directas: la presencia de iones Na^+ produce un desplazamiento de la molécula de AtH^+ desde el entorno

próximo al PE y, los iones Cl^- presentes en la dispersión proporcionan el contraión de AtH^+ para difundir libremente a través de la membrana bajo la forma de AtH^+Cl^- .

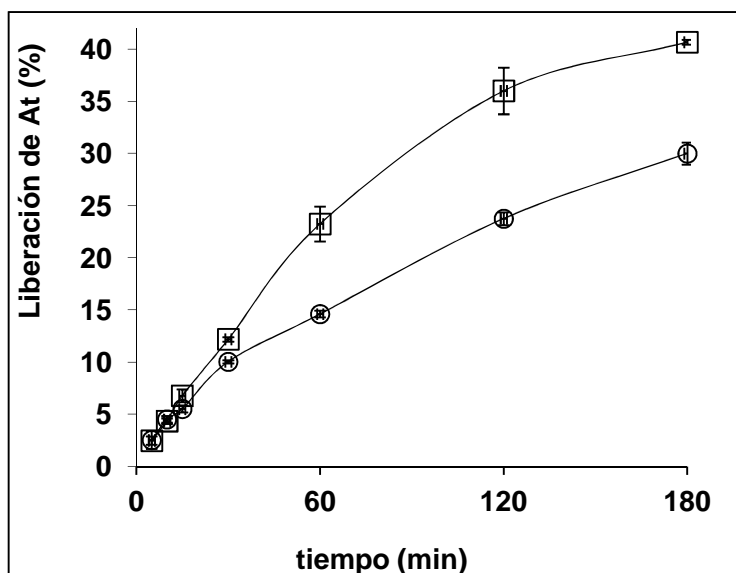


Figura 4.4: Perfiles de liberación de At hacia agua desde las dispersiones (\square) HiNa-At₇₅-NaCl₂₅ y (\circ) HiNa-At₇₅-Gli₂₅.

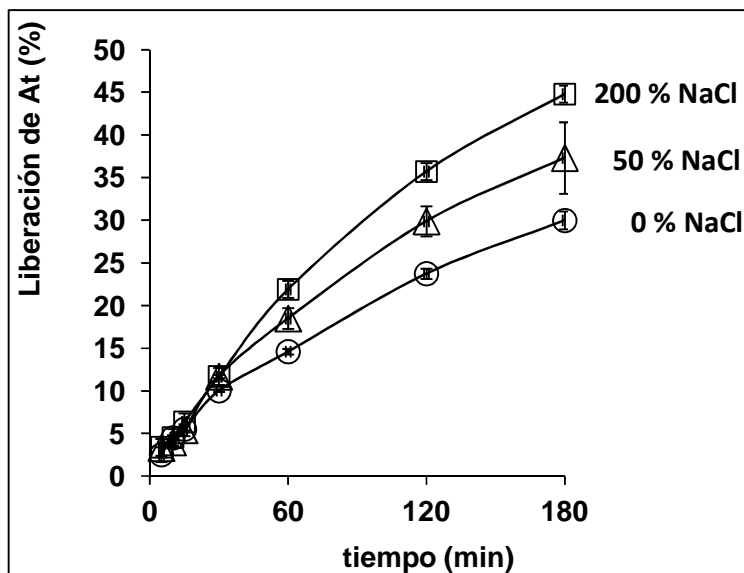


Figura 4.5: Perfiles de liberación de At desde dispersiones HiNa-At₇₅ hacia agua con el agregado en el compartimento donador de: (\circ) = % NaCl; (Δ) 50 % NaCl; (\square) 200 % NaCl.

4- Mecanismos y cinética de liberación de los fármacos desde los complejos Hi-F

Los perfiles de la figura 4.5 corresponden al ensayo de liberación facilitada del complejo HiNa-At₇₅, en el cual se observa que existió una proporción mayor de At liberado cuando se agregaron cantidades crecientes de NaCl sobre el complejo en el compartimento donador.

Por último la figura 4.6 muestra el perfil de liberación de los complejos HiH-At₇₅ cuando se hace una modificación de la constitución del compartimento receptor y el agua es reemplazada por una solución de NaCl al 0,9% p/v, se observa una mayor proporción de At liberado desde el complejo cuando en el compartimento receptor hay solución fisiológica.

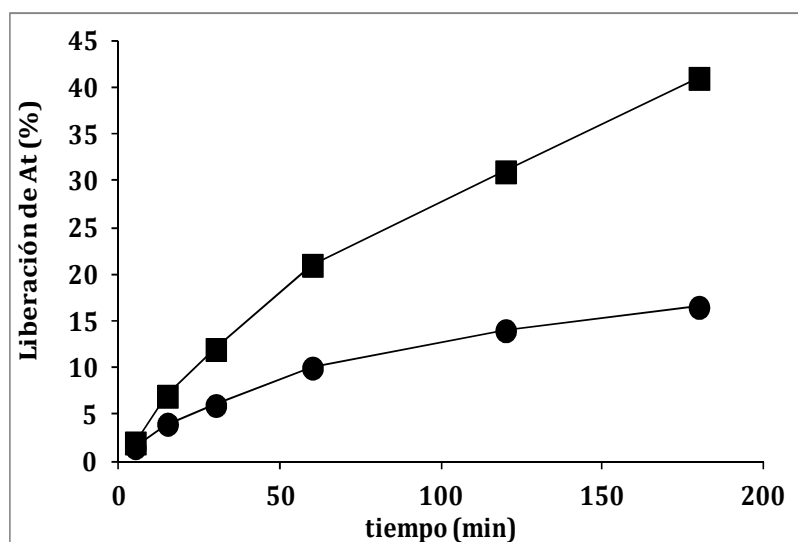


Figura 4.6: Perfiles de liberación de At desde dispersiones HiH-At₇₅ hacia agua (●) y NaCl 0.9% (■).

Estos resultados observados en las figuras 4.5 y 4.6 se dan como consecuencia de la presencia de electrolitos (Na^+ y Cl^-) en solución que alteran el equilibrio de formación de complejos iónicos PE-F como se observó con anterioridad.

Estos fenómenos fueron observados previamente por Jimenez Kairuz AF (2004) para la serie de complejos entre Carbomer acomplejados con Li y Metoclopramida, en donde la presencia de electrolitos como el NaCl generaba un mayor porcentaje de F liberado desde los complejos iónicos. Por su parte Guzmán ML (2013) obtuvo complejos iónicos entre Eudragit E100 y ácido benzoico y observó que el porcentaje de F liberado desde el complejo era directamente proporcional a la concentración de NaCl agregado en el compartimento donador.

El conjunto de resultados obtenidos relativos a las propiedades de liberación de los complejos revela claramente que los equilibrios presentados por las ecuaciones 1 y 2 ejercen el control cinético de liberación del fármaco.

Adicionalmente no se evidenció un efecto de estallido, también conocido como efecto “burst”, que se caracteriza por una liberación masiva del F en los inicios del ensayo, en ninguno de los perfiles, indicando que no existirían altas proporciones del F libre o sin interactuar con el PE.

Los resultados sugieren que bajo las condiciones de liberación utilizadas, usando agua como medio receptor, el control cinético sería una consecuencia del estado estacionario de la base libre en el entorno del PE, el cual se comportaría como un reservorio de F. La concentración de F en el estado estacionario podría estar gobernada tanto por la disociación de $(RCOO-FH^+)$ como por el pH en el entorno del PE. Esta propiedad es comparable con lo observado en sistemas binarios estudiados con anterioridad en nuestro grupo de investigación (Ramirez Rigo MV, 2006; Jimenez Kairuz AF, 2004; Vilches AP, 2002).

4.4. Conclusiones

- Los sistemas Hi-F se comportan como un reservorio reversible del F, en el cual una alta proporción del F está presente en la forma de pares iónicos $(RCOO-FH^+)$.
- El HiH, el cual se encuentra parcialmente depolimerizado, conserva la capacidad acomplejante con F contraiones y ejerce un efecto modulador de su liberación.
- La liberación del F responde a un modelo cinético proporcional a la raíz cuadrada del tiempo, donde la liberación del F desde el entorno del PE ocurre por un mecanismo difusional.
- Bajo las condiciones ensayadas, la velocidad de disociación de los pares iónicos es rápida y, el PE suministra proporciones de F desde su entorno hacia el seno de la dispersión a medida que el F difunde hacia el compartimento receptor.
- La velocidad de liberación del F puede ser incrementada por la difusión o inclusión de sales neutras en el complejo, no así por no electrolitos que no perturben el equilibrio de formación del par iónico.

Segunda Parte



Capítulo 5

*Evaluación de los
complejos Hialuronano-
Doxorrubicina sobre
líneas celulares tumorales
y fisiológicas*



5.1. Introducción

La eficacia terapéutica de la mayoría de los fármacos antitumorales depende en gran medida de su capacidad para cruzar la barrera celular y alcanzar su diana intracelular. Debido a la falta de especificidad y selectividad de esta clase de F hacia las células tumorales, numerosos efectos secundarios aparecen como resultado de su administración.

Para la administración de F anticancerígenos por vía parenteral, y con el fin de evitar o disminuir los efectos secundarios que trae aparejada su administración, se han diseñado y desarrollado numerosos sistemas transportadores “inteligentes” basados en polímeros sintéticos y/o naturales (Choi KY, 2012). En general, el suministro intracelular del F antineoplásicos ha sido mejorado mediante la conjugación de éstos con moléculas tales como anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas, y varios otros ligandos, sobre la superficie de portadores diversos que lo direccionan hacia la masa tumoral (Lukyanov AN, 2004; Qian ZM, 2002; Eliaz RE, 2001). En relación con este punto, el Hi ha cobrado un interés particular en los últimos años en el diseño de sistemas portadores de F antineoplásicos. Se determinó que las células tumorales, respecto a las células normales, sobreexpresan cierto tipo de receptores denominados, por su sigla en inglés, Cluster Differentiation 44 (CD44). Este tipo de receptores de membrana tiene numerosas funciones dentro de las cuales podemos citar: participar en los procesos celulares específicos tales como la migración, la proliferación y diferenciación celular, entre otros. El CD44, posee 7 pasos a través de la membrana celular, y en su dominio extracelular posee un sitio para el anclaje con Hi. La interacción del Hi con los receptores CD44 se ha descrito con anterioridad (Bourguignon LY, 2014; Qhattal HS, 2011; Hussaini SS, 2011; Knudson W, 2004). Esto, sumado a las bondades que aporta el Hi para el diseño de formulaciones parenterales (Hirakura T, 2010; Lee F, 2009; Hahn SK, 2005), ha hecho que los científicos centren su atención en el Hi para el diseño de vectores portadores de F antitumorales (Ghalaei PM, 2014; Son MG, 2014; Luo Y, 2002).

Los receptores CD44 pueden ser objetivo para el tratamiento de tumores mediante el direccionamiento de la terapia antineoplásica (Haygood CL, 2014; Marhaba R, 2008). Se ha demostrado que liposomas derivatizados con Hi generan un aumento en la captación celular de F antitumorales vía endocitosis a través de la interacción de este polímero con los receptores CD44 (Qhattal HS, 2011). Se conoce que la interacción Hi-CD44 se da como consecuencia de una cadena de fenómenos que desencadenan una cascada de señalizaciones intracelulares con consecuente degradación del Hi a nivel intracelular. Por esta razón, Hi

podría ser considerado un excelente vehículo para propender una entrega tumor-específica de agentes quimioterapéuticos (Choi KY, 2012; Slomiany MG, 2009; Naor D, 2002).

En la actualidad, un interesante número de artículos científicos publican la utilización de sistemas conteniendo Hi derivatizado covalentemente ya sea con los F antitumorales o formando parte de estructuras superiores- complejas (Song S, 2014; Serafino A, 2011; Shuang SA, 2010; Luo Y, 2002). Estos productos surgen de procesos complejos de síntesis que involucran numerosos pasos. Sin embargo, en la frondosa bibliografía sobre este tema no se encuentra descrita la utilización del Hi como sistema portador de FA mediante la formación de complejos iónicos reversibles Hi-FA. Debido a la vasta experiencia que se tiene en nuestro grupo de investigación acerca de la obtención de complejos iónicos PE-F (Battistini FD, 2013; Guzman ML, 2012; Quinteros DA, 2008), se conoce que tales complejos pueden prepararse de un modo muy simple, manteniendo la estructura original de Hi y podrían constituir una interesante opción farmacoterapéutica. En el presente trabajo, nos centramos en el uso de Hi como polímero portador de Fármacos Antineoplásicos (FANP), para evaluar la capacidad del sistema Hi-FANP como agente terapéutico frente a líneas celulares tumorales.

La hipótesis de trabajo es que la alta capacidad que exhiben las células tumorales de epitelio pulmonar para incorporar el Hi, a través de los receptores CD44, puede ser ventajosa para introducir Fármacos Antineoplásicos (FANP), acomplejados con Hi mediante uniones reversibles. Se espera entonces incorporar, por este mecanismo, una mayor concentración intracelular de los FANP, con respecto a la incorporación de los FANP libres en solución y, en consecuencia, aumentar su eficacia y especificidad antineoplásica.

Una segunda hipótesis, subsidiaria, consiste en atender los mecanismos de eflujo que poseen las células tumorales para eliminar los FANP desde su interior, mediante la incorporación concomitante en el Hi de un fármaco inhibidor del proceso de eflujo (FIE).

Un importante número de FANP poseen grupos básicos protonables, condición necesaria para interaccionar con Hi. Entre otros, se pueden citar el topotecan y las antraciclina Daunorrubicina y Doxorrubicina. Atento a la vigencia terapéutica de la Doxorrubicina (Dx), se seleccionó éste FANP para realizar una evaluación detallada de las propiedades de los complejos Hi-Dx frente a cultivos de líneas celulares tumorales humanas.

Doxorrubicina (figura 5.1) es un FANP ampliamente utilizado en varios tipos de cánceres. Al igual que otras antraciclina, actúa por intercalación en las cadenas de ADN del núcleo celular (Shen F, 2008).

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

Actualmente Doxorubicina es ampliamente utilizado como inyectable ya sea como solución o como polvo liofilizado para reconstituir en el tratamiento de distintos tipos de tumores (Alfa-beta SACIFyS, 2015; Flórez J, 2008). Su principal limitación es la elevada inespecificidad en su acción y el elevado efecto vesicante que conlleva su administración (Flórez J, 2008; Tessler J, 2004).

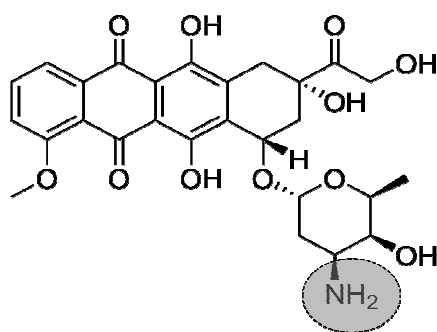


Figura 5.1: Estructura química de Dx. Se destaca en círculo los grupos funcionales amino que intervienen en la reacción con el Hi.

Se han informado mecanismos de eflujo en células tumorales que contribuyen a disminuir la concentración intracelular de Dx (Rogalska A, 2014; Shen F, 2008). Es conocido también que un buen número de principios activos tienen la capacidad de inhibir el mecanismo de eflujo mediado por la denominada Glicoproteína-P (Pg-p) (Rogalska A, 2014; Shen F, 2008; Wang EJ, 2000). Entre tales fármacos sobresale el Verapamilo (Vr), fármaco de uso reconocido en terapéutica como agente antiarrítmico bloqueador de canales de Calcio tipo L (Sweetman SC, 2009; Brunton LL, 2007). Vr posee en su estructura un grupo amino terciario, que puede interaccionar con los grupos carboxílicos de Hi para formar complejos iónicos (figura 5.2).

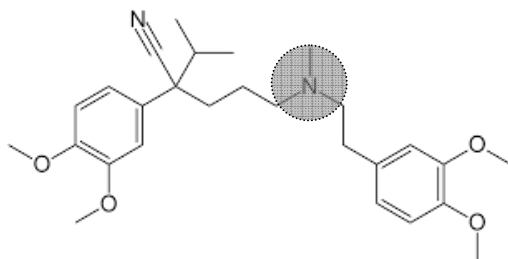
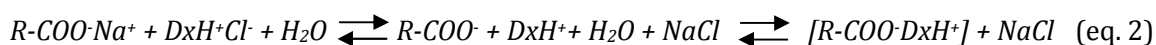
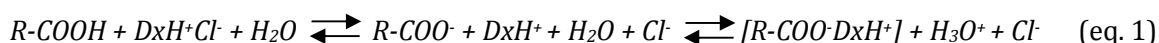


Figura 5.2: Estructura química de Vr. Se destaca en círculo los grupos funcionales amino que intervienen en la reacción con el Hi.

En vista de que el Hi podría ser portador de más de un principio activo, se consideró de interés explorar, en forma preliminar, la potencialidad de Vr (como FIE modelo) para incrementar la eficacia de los complejos Hi-Dx. Se propuso entonces preparar complejos mixtos de Hi conteniendo el FANP (Dx) y el FIE (Vr).

Este estudio tiene como primer objetivo la evaluación de la potencialidad del Hi como portador de Dx (como modelo de FANP), para su direccionamiento hacia células tumorales que sobreexpresan los receptores de membrana CD44. Un segundo objetivo consiste en atender los mecanismos de eflujo que poseen las células tumorales para eliminar de su interior los FANP, mediante la incorporación concomitante en el Hi de Vr como modelo de FIE. Resumiendo, los puntos principales tratados en este capítulo son:

(i) estudio de la capacidad del Hi para generar dispersiones acuosas de complejos iónicos reversibles con Dx de acuerdo a las siguientes ecuaciones (equilibrio 1 y 2):



(ii) Evaluación del efecto del pH y la presencia de iones sobre el equilibrio y la cinética de liberación de Dx a partir de los complejos.

(iii) Evaluación de la capacidad de los complejos iónicos Hi-Dx para internalizar Dx vía endocitosis de los receptores CD44, y de la tasa de muerte de células tumorales en comparación con una solución de referencia de Dx.

(iv) Evaluación de la selectividad de los complejos iónicos Hi-Dx hacia las células tumorales que sobreexpresan los receptores CD44 respecto a células fisiológicas que no lo sobreexpresan.

(v) Evaluación del efecto que tiene el pre tratamiento de las células CD44 (+) con una dispersión de Hi con el fin de corroborar la participación de los receptores CD44 en la internalización del complejo Hi-Dx.

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

(vi) Evaluación de la capacidad del complejo ternario Hi-Dx-Vr para atender los aspectos relacionados no solamente a los mecanismos de internalización del FANP, sino también a los implicados en el eflujo de los mismos mediante la utilización de FIE.

5.2. Materiales y Metodología

Se utilizó el HiNa y HiH descritos previamente en el capítulo 2. Los fármacos seleccionados para obtener los productos (Hi-F) son de calidad farmacopea: Doxorubicina HCl (Dx) (Laboratorio Filaxis®) y Verapamilo HCl (Vr) (Parafarm, Bs. As., Arg.). Los reactivos y solventes son de calidad pro análisis. Se utilizó agua deionizada para la realización de los ensayos.

5.2.1. Metodología de preparación de los complejos

Se prepararon 2 series de complejos Hi-Dx y de Hi-Dx-Vr de acuerdo a lo descrito previamente en el capítulo 3 para cada una de las especies del Hi, HiH-Dx_x, HiNa-Dx_x y HiH-Dx_x-Vr_x y HiNa-Dx_x-Vr_x. El subíndice "x" indica el porcentaje de grupos carboxílicos de HiH o grupos carboxilato de HiNa neutralizados con Dx o Vr.

Para llevar a cabo los ensayos de distribución de especies en el equilibrio y de velocidad de liberación, los complejos se prepararon mediante la mezcla de soluciones acuosas de Dx.HCl y HiH o HiNa, acidificado previamente con HCl para obtener un pH final entre 2,8 y 3,0 con el fin de evitar la precipitación del complejo.

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular, los complejos se prepararon de la misma manera pero utilizando medio de cultivo en lugar de agua como disolvente y sin la adición de HCl. Cabe aclarar que no se realizaron estudios de estabilidad de los PE ni de los complejos Hi-Dx en los medios de cultivos.

5.2.2. Mediciones de pH

Los valores de pH de las dispersiones al Hi-F se registraron de acuerdo al capítulo 2.

5.2.3. Distribución de especies en las dispersiones mediante diálisis

La metodología y el equipamiento utilizado para la determinación de la distribución de especies en el equilibrio mediante diálisis fueron descritos en el capítulo 3.

5.2.4. Estudios de liberación en celdas bicompartimentales de difusión

La metodología y el equipamiento utilizado para la determinación de la cinética de liberación del F desde los complejos iónicos Hi-F fueron descritos en el capítulo 4. Para el estudio de los complejos ternarios (Hi-Dx-Vr), la cuantificación se llevo a cabo mediante espectrofotometría UV sin mayores procesamientos debido al no solapamiento de los espectros de Dx ($\lambda = 480$ nm) y Vr ($\lambda = 278$ nm).

5.2.5. Evaluación de los complejos Hi-Dx sobre cultivo celular

5.2.5.1. Cultivo celular

Se utilizaron dos líneas celulares como modelo: células que sobreexpresan los receptores CD44 y una línea que no los sobreexpresa, todas de origen humano: a) la línea de células pulmonares CD44 (+), llamadas A549, células adenocarcinómicas del epitelio basal del pulmón, ATCC® CCL185™ (Shuangshuang S, 2014; Hussaini SS, 2011), y b) la línea celular de placenta CD44 (-), llamadas HTR8 SVneo, células trofoblásticas del 1 trimestre inmortalizadas con antígeno SV40 T (Graham CH, 2013; Kobayashi Y, 2013; Novakovic B, 2011; Marzioni D, 2001), de las cuales se sabe que tienen una expresión 10^6 veces menor de los receptores CD44 de membrana respecto a una célula cancerígena (Kobayashi Y, 2013).

Las células fueron cultivadas a partir del cultivo de siembra que se almacena en un freezer a -80 °C en suero fetal bovino y DMSO. Para las células A549, se utilizó como medio de cultivo Medio Dulbecco Modificado de Eagles (DMEM - Gibco® por Life Technologies™, Nueva York), enriquecido con glucosa, glutamina, piridoxina, piruvato y bicarbonato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina. Mientras que para las células HTR8 SVneo se utilizó como medio de cultivo DMEM-F12 (DMEM-F12 - Gibco® por Life Technologies™, Nueva York), enriquecido con HAM's F12, glucosa, glutamina, piridoxina, piruvato y bicarbonato, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomina.

5.2.5.2. Preparación de las células

Para reactivar las células después de su almacenamiento en el freezer de -80°C , es esencial descongelarlas rápidamente. Se procedió de la siguiente manera: El criovial se calentó a 37°C y la suspensión celular se resuspendió en 10 mL del medio de cultivo correspondiente. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante que contenía DMSO. El sedimento se resuspendió nuevamente en medio de cultivo y se transfirió a una placa de cultivo, que luego se colocó en la incubadora para promover la proliferación celular hasta confluencia. Las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5 % en una estufa diseñada para tal fin.

Una vez que todas las células se adhirieron a la placa de cultivo, y cuando la confluencia de la placa fue del 100%, se procedió a su “levantamiento” para su utilización. Para separar las células de la superficie de las placas, se requiere el uso de una solución 1X de tripsina/EDTA (Gibco, Invitrogen, Reino Unido). Los cultivos se lavaron primero en 10 mL de PBS estéril, seguido de la adición de 1 mL de solución de tripsina/EDTA. La placa se incubó a 37°C durante aproximadamente 5 minutos, o hasta que el desprendimiento se pudo detectar. Posteriormente, la dispersión de células se colocó en un tubo de centrifuga que contenía 5 mL de medio para inactivar la tripsina, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en medio de cultivo (suspensión madre). En este punto es donde se lleva a cabo el recuento de células a utilizar. El mismo se realizó manualmente utilizando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico con lente de 10X (microscopio Nikon®). Se extrajo una alícuota de 5 μL de la suspensión de células madre y se la mezcló con 20 μL de una solución de Azul Tripán (Sigma-Aldrich, Chem, USA). Se colocó por capilaridad en la cámara de Neubauer la suspensión de células para su posterior cuantificación.

Una vez determinado el número total de células en la solución madre, distintas alícuotas de la suspensión conteniendo una cantidad exacta de células se colocaron en las placas correspondientes para su posterior utilización. Para estos ensayos se utilizaron 2 tipos de placas: placa multi-well de 96 pozos con capacidad para 1.10^4 en 100 μL de medio, y placa de 6 pozos con capacidad para 4.10^5 en 2 mL de medio.

Para los diferentes experimentos, los cultivos fueron sometidos a los siguientes procedimientos:

- (i) Control (células incubadas con medio de cultivo únicamente).
- (ii) Dispersión de HiH-Dx₅₀ o HiNa-Dx₅₀ (células a las que se añadieron alguno de los complejos HiH-Dx₅₀ o HiNa-Dx₅₀).
- (iii) Dispersión de polímeros de referencia (células a las que se añadieron únicamente HiH o HiNa en una concentración equivalente a la de Hi o HiNa, respectivamente).
- (iv) Solución de Dx de referencia (células tratadas con solución de Dx en una concentración equivalente a la de los complejos).
- (v) Dispersión de HiH-Dx₅₀-Vr₅₀ o HiNa-Dx₅₀-Vr₅₀ (células a las que se añadieron alguno de los complejos ternarios HiH-Dx₅₀-Vr₅₀ o HiNa-Dx₅₀-Vr₅₀).

5.2.5.3. Ensayos de viabilidad celular/ ensayo de citotoxicidad

Para llevar a cabo este ensayo se procedió de la siguiente manera: Diez mil células A549 o HTR8 SVneo se sembraron en cada pozo de una placa de 96. Se utilizaron tres placas, cada una correspondiente a un tiempo ensayado (24, 48, y 72 h). Previamente, se confeccionó de una curva de dosis-respuesta para determinar la concentración adecuada de Dx que nos permitiera apreciar la tasa de muerte celular en función del tiempo. Cada placa contenía, sembrado por quintuplicado, cinco condiciones: (i) – (iv). Tanto la solución de Dx como la dispersión de los complejos contenían una concentración equivalente de Dx cercana a 0,01 μ M.

Para la cuantificación de la viabilidad celular, se procedió de acuerdo a la técnica descrita por Mosmann T (1983). Brevemente, a las 24 h, 10 μ L de la solución de MTT ((3 - (4,5 - dimetiltiazol-2)-2,5-difeniltetrazolio)) Sigma-Aldrich Chem., USA) en una concentración de 5 mg/mL fue añadida a cada pozo de una de las placas conteniendo las células, y se incubaron durante 2 h a 37 °C. Luego de la incubación, el medio se eliminó y el formazán precipitado se disolvió en 100 μ L de DMSO (Cicarelli, Sta Fe, Argentina). Se leyó la absorbancia a 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV multi (Glomax MultiElectron System Promega, Lector Multimodulo). Los resultados se expresaron como porcentaje de células viables con relación al control. El mismo procedimiento se realizó en las placas de las 48 y 72 h. Tres experimentos independientes se realizaron por quintuplicado.

De manera complementaria, se determinaron las Áreas Sobre la Curva (ASC) de estos gráficos entre 0 y 72 h como un indicador de eficacia. A mayor ASC obtenida, menor es el

recuento celular y por ende mayor eficacia. Las ASC fueron calculadas utilizando el método de los trapecios utilizando Microsoft Excel® como procesador.

5.2.5.4. Microscopía de fluorescencia

El microscopio de fluorescencia es una variación del microscopio de luz ultravioleta en el que los objetos son iluminados por rayos de una determinada longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por las moléculas que han absorbido la excitación primaria y reemitido una luz con mayor longitud de onda. Para dejar pasar sólo la emisión secundaria deseada, se deben colocar filtros apropiados debajo del condensador y encima del objetivo.

Para la microscopía de fluorescencia en este trabajo, nos valimos de la fluorescencia intrínseca de la molécula de Dx, y además del espectro diferenciado de absorción ($\lambda_{Abs.}$ 480 nm) y emisión ($\lambda_{Em.}$ 592 nm) que posee esta molécula de Dx. Para este ensayo se procedió de la siguiente manera: cuatrocientas mil células A549 o HTR8 SVneo contenidas en 2 mL de medio de cultivo fueron sembradas en cada pozo de una placa de 6 pozos. Se utilizó una única placa para cada línea celular, en cada pozo se colocaron 3 vidrios de 1 cm de diámetro correspondiente a un tiempo ensayado (24, 48, y 72 h). En cada pozo se sembraron alguna de las siguientes condiciones: (i) – (iv). Para estos ensayos se utilizó una concentración equivalente de Dx de 1 μ M para facilitar la visualización de la luz emitida por Dx. A cada intervalo de tiempo, cada vidrio fue extraído de la placa y fue visualizado sin tratamiento adicional utilizando un microscopio óptico (ver figura 5.3 a continuación) Nikon (Nikon Eclipse TE2000-U, EE.UU.). Se determinó cuantitativamente la fluorescencia de color rojo correspondiente a la emisión de Dx en las células tratadas.

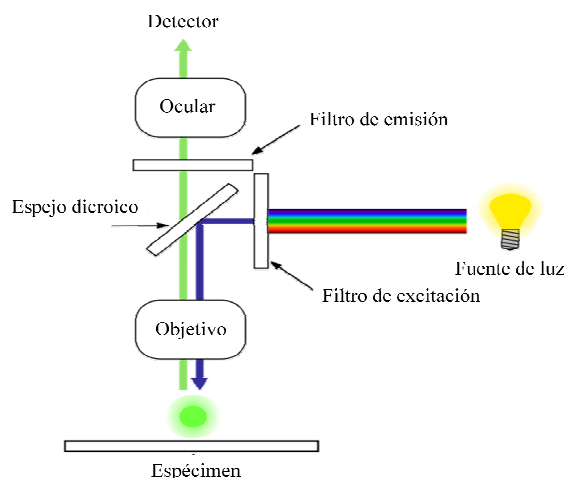


Figura 5.3: Estructura y funcionamiento del microscopio de fluorescencia utilizado para la detección de la emisión de Dx del interior celular.

5.2.5.5. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología biofísica basada en la utilización de luz láser, empleada en el recuento y clasificación de células según sus características morfológicas, presencia de biomarcadores, y en la ingeniería de proteínas. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un fino tubo transparente sobre el que se incide un delgado rayo de luz láser, la luz transmitida y dispersada por el pasaje de las células a través del tubo se recoge por medio de unos dispositivos de detección, permitiendo hacer inferencias en cuanto a tamaño y complejidad de las células. También permite el análisis multiparamétrico simultáneo de otras características físicas y químicas, evaluando en promedio más de dos mil partículas por segundo.

Para realizar el ensayo de citometría de flujo, cuatrocientas mil células A549 o HTR8 SVneo contenidas en 2 mL de medio de cultivo fueron incubadas durante un período de 24 h en una placa de 6 pozos. Se evaluaron mediante esta técnica células de las condiciones (i) a la (v). Tanto la solución de Dx referencia como la de los complejos iónicos contenían una concentración de Dx de 1 μM . Una vez transcurridas las 24 h de tratamiento, las células fueron lavadas con PBS, siguiente tripsinización para su levantamiento. Finalmente se resuspendieron en 1 mL de PBS. Para la fijación de las células, las mismas se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante mientras que el sedimento se resuspendió en 1 mL de etanol 70% p/v a 4 °C, y se almacenaron durante 1 h en heladera (8 °C). Finalmente, los tubos fueron centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos y se les retiró

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

el sobrenadante de etanol. El sedimento de células se resuspendió en 100 μ L de PBS para su posterior análisis en el citómetro de flujo. Se midió la intensidad de la fluorescencia emitida por Dx (λ_{Em} . 592 nm). La fluorescencia de las células se leyó inmediatamente utilizando un citómetro de flujo FACS Canto II (ver figura 5.4 a continuación), equipado con tres láseres, uno azul (488 nm), uno rojo (633 nm, 17 mW HeNe) y uno violeta (405 nm, 30 mW). Los resultados se procesaron utilizando el software FCS express (versión de prueba).

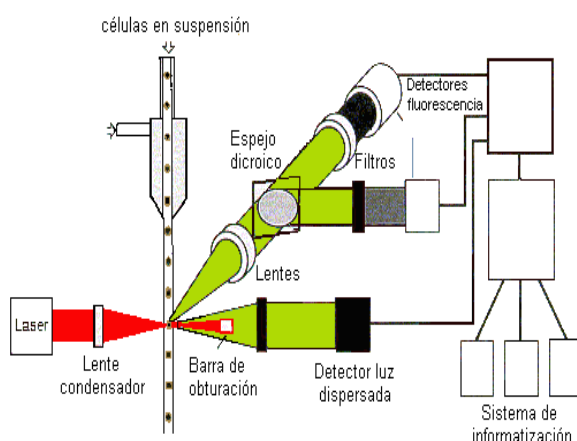


Figura 5.4: Estructura y funcionamiento del citómetro de flujo utilizado para la detección de la emisión de Dx del interior celular.

Siguiendo la misma metodología descrita, e intentando elucidar el mecanismo de acción por el cual el Hi ingresa a las células tumorales, se evaluó el efecto que tiene el pre-tratamiento de las células CD44 (+) con una dispersión de Hi para forzar la endocitosis de los receptores y así evaluar la participación que tienen los CD44 en la internalización del complejo Hi-Dx. Para ello, una vez colocadas sobre la placa, 24 h previo a recibir el tratamiento con la solución de Dx o con los complejos iónicos Hi-Dx, las células fueron pre-tratadas con una dispersión de PE (HiH o HiNa) de concentración similar a la de los polímeros referencia. Una vez transcurrido este tiempo, las células recibieron el tratamiento correspondiente.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Distribución de especies en las dispersiones mediante diálisis

En capítulos anteriores se describió esta técnica para la determinación de las especies en el equilibrio mediante diálisis utilizando F contraiones modelos. En el presente capítulo se evaluará la distribución de especies en el equilibrio para los complejos Hi-Dx utilizando la técnica de diálisis.

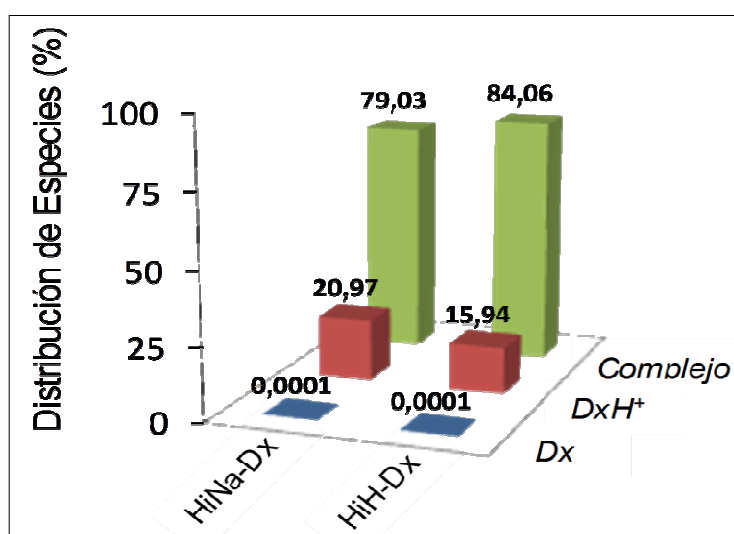


Figura 5.5: Distribución de especies en el equilibrio mediante diálisis para complejos de *HiNa-Dx* y *HiH-Dx*.

Como se puede observar, la figura 5.5 muestra la alta proporción de Dx que se condensa electrostáticamente con Hi tanto en *HiNa-Dx₂₅* y complejos *HiH-Dx₂₅* (en ambos casos superior a 75%), lo que nos está dando una idea de la alta capacidad de carga y afinidad que este polímero tiene por la Dx, y a su vez, produciendo constantes de afinidad (K_{pi}) elevadas del orden de las obtenidas con F modelo detallados en el capítulo 3. Por otra parte, la diferencia en el porcentaje de formación de par iónico entre *HiNa-Dx* y *HiH-Dx* puede deberse en gran medida a la mayor proporción de iones que se generan en la formación de *HiNa-Dx*. Por último, la comparación entre los complejos de Dx con HiH y HiNa reveló que el primero mantiene la capacidad acomplejante respecto a la sal sódica del PE

5.3.2. Liberación *in vitro* de Dx desde los complejos Hi-Dx

Las figuras 5.6 a y b, muestran una cinética de liberación lenta de Dx desde los complejos iónicos cuando en el compartimento receptor se colocó agua o NaCl al 0,9 % p/v como medio receptor.

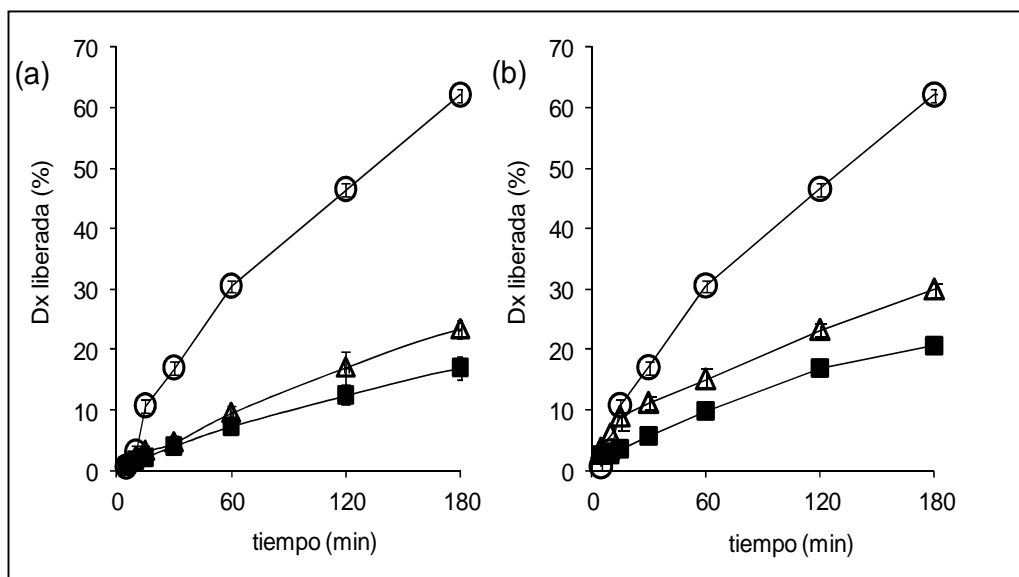


Figura 5.6: Liberación de Dx en celdas bicompartimentales del tipo Franz desde complejos iónicos (a) HiH-Dx y (b) HiNa-Dx. (o) solución referencial de Dx; (■) complejo Hi-Dx cuando el medio receptor es agua; (Δ) complejo Hi-Dx cuando el medio receptor es NaCl 0,9 % p/v.

Los resultados aquí observados están en línea con los obtenidos en los ensayos de liberación de F modelo desde los sistemas Hi-F en el capítulo 4. Los sistemas Hi-Dx se comportan como un reservorio de Dx, y la liberan lentamente a partir de los complejos. El control en la liberación se mantiene a pesar de la presencia de una sal neutra, lo que revela la alta afinidad del fármaco por los grupos carboxílicos de Hi. Estos resultados proporcionan una valiosa información sobre las interacciones esperadas entre los complejos y los fluidos biológicos.

5.3.3. Ensayo de viabilidad/ citotoxicidad celular

Los ensayos de proliferación celular son pruebas metabólicas para medir la actividad mitocondrial, sustentándose en base a que el daño celular se traducirá inevitablemente en la pérdida de la capacidad celular para mantener y proporcionar energía para la normal función metabólica celular y el crecimiento.

El ensayo de proliferación celular MTT es uno de estos ensayos metabólicos. Es un ensayo colorimétrico cuantitativo, que se ha utilizado para estudiar la supervivencia de celular. El principio de este ensayo se basa en la evaluación de la actividad mitocondrial a través de la medida de la capacidad enzimática de la succinato deshidrogenasa de las células metabólicamente activas (viables). Estas enzimas reducen la sal de tetrazolio MTT que es una solución amarilla a un producto insoluble a nivel intracelular de color púrpura denominado formazán. Como regla general se puede deducir que, a mayor cantidad de formazán generado, hay un mayor número de células viables (Mosmann T, 1983). Para la cuantificación del formazán, es necesario disolverlo para su posterior cuantificación a través de espectrofotometría UV.

Para llevar a cabo los ensayos de viabilidad celular con las células de cáncer pulmonar (A549) y las células placentarias (HTR8 SVneo), se utilizaron dispersiones de los complejos en medio de cultivo con una concentración de Dx de 0,01 μM (pH cercano a 7).

La figura 5.7 a y b, muestra el efecto en el tiempo en términos de reducción en el recuento de células A549 o HTR8 SVneo cuando se añadieron los complejos iónicos HIH-Dx, HiNa-Dx o una solución de Dx referencia al cultivo celular.

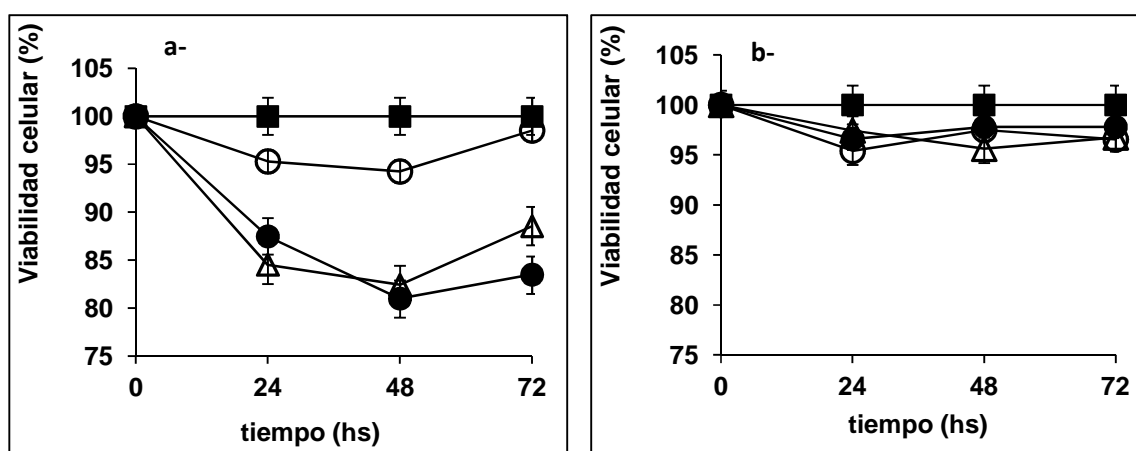


Figura 5.7: Viabilidad celular (%) en función del tiempo (hs) para células: a- A549; b- HTR8 SVneo. (■) Células control; (○) Dx referencia; (●) HiH-Dx; (△) HiNa-Dx. En todos los casos la concentración de Dx fue de 0,01 μM . (■) Cultivo celular control.

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

Como puede verse en la figura 5.7 a, aunque tanto HiH-Dx como HiNa-Dx y Dx referencia produjeron una disminución en el recuento de células A549 en comparación con el control, los complejos ocasionaron una mayor disminución en la viabilidad celular respecto a la solución de Dx referencia. La diferencia en éste fenómeno se observó a partir de las 24 h del ensayo y continuó durante las 48 y 72 h.

Sobre las células HTR8 SVneo (figura 5.7 b), ambos complejos Hi-Dx así como la solución Dx referencia produjeron una disminución en la viabilidad celular en comparación con las células de control. Sin embargo, no hay ninguna diferencia entre la disminución producida por los complejos iónicos respecto a la Dx referencia.

En línea con las propiedades intrínsecas de Hi, que es considerado como un polímero no inmunogénico, no tóxico y biodegradable, no hubo diferencias respecto de la viabilidad celular entre los polímeros Hi y el control tanto en células A549 como en las HTR8 SVneo (resultados no mostrados por superposición con el control).

De los gráficos de viabilidad celular vs. tiempo, se calcularon las áreas sobre la curva (ASC) entre 0 y 72 h como un indicador de la eficacia de los sistemas Hi-Dx. Como regla general, a mayor ASC obtenido, menor es el recuento de células y por ende mayor la eficacia del compuesto.

Tabla 5.1: Áreas Sobre la Curva de Dx referencia y los complejos iónicos Hi-Dx para las células A549 y HTR8 SVneo. Los resultados se expresan como el coeficiente entre las ASC obtenidas en cada caso y el área de la solución Dx.

Compuesto	Célula	ASC	ASC_{Hi-Dx}/ASC_{Dx}
Dx	A549	278	1.00
	HTR8	240	1.00
HiH	A549	140	0.50
	HTR8	127	0.52
NaHi	A549	180	0.65
	HTR8	134	0.55
HiNa-Dx	A549	845	3.03
	HTR8	251	1.05
HiH-Dx	A549	837	3.01
	HTR8	249	1.03

La tabla 5.1 muestra las ASC de todas las condiciones que fueron ensayadas, así como también la relación $ASC_{Hi-Dx}/ASC_{Dx.HCl}$. Se observó una actividad diferencial de Hi-Dx hacia células A549 respecto a las células HTR8 SVneo. Por otro lado, se observó en las células A549, que tanto HiH-Dx como HiNa-Dx produjeron aéreas 3 veces mayores a aquella obtenida por la solución de Dx referencia. Para las células HTR8 SVneo, no hubo diferencia entre el ASC de complejos Hi-Dx y la solución Dx.HCl.

5.3.4. Microscopia de Fluorescencia

Para llevar a cabo este ensayo nos valimos de la fluorescencia intrínseca de la Dx como indicativo de la captación celular del F, como regla general, consideramos que a mayor fluorescencia observada en las células, mayor fue la captación de Dx por parte de las mismas y viceversa.

La figura 5.8 muestra la microscopia de fluorescencia de las células A549. En el gráfico se observan las distintas condiciones: Células tratadas con solución de Dx referencia y aquellas tratadas con los complejos iónicos HiH-Dx o HiNa-Dx. Como mencionamos con anterioridad, la intensidad de la fluorescencia observada por microscopía es indicativa de la cantidad de Dx dentro de las células.

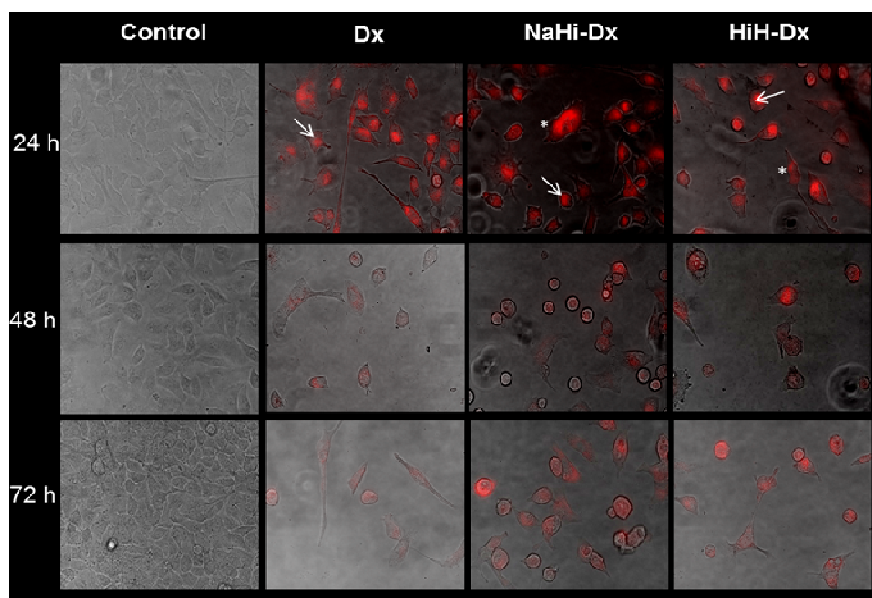


Figura 5.8: Intensidad de fluorescencia en función del tiempo (h) para células A549 tratadas con solución de referencia de Dx y complejos iónicos Hi-Dx, en concentraciones equivalentes de Dx 1 μ M. Las imágenes son el resultado de la superposición de la imagen óptica y la de fluorescencia. Las flechas indican algunos núcleos de las células conteniendo Dx. Los * indican los endosomas conteniendo el complejo iónico.

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

Como se puede observar en la figura 5.8, en todos los casos, y para los tres tiempos ensayados, el número de células observadas respecto al control fue notablemente menor para aquellas células tratadas ya sea con Dx referencia como con los complejos iónicos. Luego de un período de 24 h de incubación, se detecta la presencia de Dx acumulada a nivel intracelular. Se puede observar que la misma se encuentra ubicada a nivel del núcleo principalmente (flecha en el gráfico), sitio donde se detecta la fluorescencia más intensa, que coincide con el sitio de acción de este F, post internalización desde el exterior de la membrana citoplasmática. Así mismo, puede observarse una diferencia mayor en la intensidad de fluorescencia en aquellas células tratadas con la solución de Dx referencia respecto a las tratadas con los complejos iónicos Hi-Dx. Otro aspecto a tener en cuenta es que en aquellas células tratadas con el complejo PE-F, se detectó la presencia de pequeños puntos rojos (*) además de los presentes en el núcleo, lo que indica que los complejos se encuentran atrapados inicialmente dentro de los compartimientos endosomales después de la absorción celular. Estos datos demuestran que el Hi no sólo es un vehículo eficiente en términos de concentraciones para transportar Dx a nivel intracelular, sino que también sugieren que el mecanismo de internalización del complejo es diferente al de Dx libre. En las muestras de 48 y 72 h, la intensidad de fluorescencia más alta se observó en aquellas células tratadas con ambos complejos iónicos Hi-Dx en comparación con las tratadas con la solución de Dx referencia. Este fenómeno fue observado anteriormente por Upadhyay KK (2010), el cual obtuvo polímerosomas compuestos de poli (g- bencil L-glutamato)-b-hialuronano, mostrando una mayor internalización de Dx respecto a un control como consecuencia de la internalización vía receptores CD44 en las células del cáncer de mama (MCF-7) que sobreexpresan estos receptores (Upadhyay KK, 2010). Por otro lado Shuangshuang S (2014) evaluó el efecto de nanopartículas basadas en Hi sobre la internalización de un F antitumoral en células cancerígenas que sobreexpresan los receptores CD44 (MCF-Y y A549) respecto a una solución control del agente antineoplásico observándose una mayor internalización en las células tratadas con los sistemas nanoparticulados.

En la figura 5.9 se presentan los resultados obtenidos con la línea celular HTR8 SVneo, observando el nivel de fluorescencia como indicativo de la concentración de Dx intracelular en función del tiempo para estas células. En este caso también cabe aclarar qué y para los tres tiempos ensayados, el número de células observadas fue notablemente menor para las células tratadas con Dx en cualquiera de su forma respecto al control. Luego de un período de 24 h de

incubación, aquí también se detecta la presencia de Dx acumulada a nivel intracelular. Se puede observar que la misma se ubica a nivel del núcleo. Aquí no se detectó la presencia de pequeños puntos rojos correspondientes a los compartimientos endosomales observados en las células de tumor pulmonar.

Como se esperaba, y en línea con los resultados obtenidos a través de la técnica de viabilidad celular, no se observa una diferencia en la intensidad de la fluorescencia cuando las células fueron tratadas ya sea con la solución de Dx referencia o con los complejos iónicos Hi-Dx, este fenómeno se observó a los tres tiempos ensayados. Esto nos estaría indicando que no existe un incremento en la captación por parte de esta línea celular del F cuando se compara la Dx referencia y los complejos iónicos Hi-Dx.

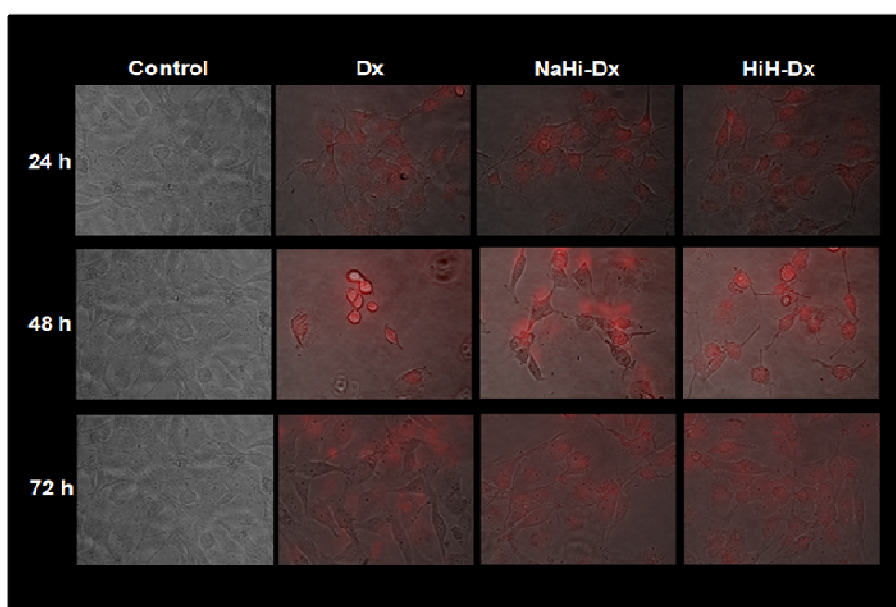


Figura 5.9: Intensidad de fluorescencia en función del tiempo (hs) para células HTR8 SVneo tratadas con solución de referencia de Dx y complejos iónicos Hi-Dx, en concentraciones equivalentes de $1 \mu\text{M}$ de Dx. Las imágenes son el resultado de la superposición de la imagen óptica y la de fluorescencia.

5.3.5. Citometría de flujo

Para corroborar los resultados anteriormente discutidos, se llevó a cabo un ensayo de citometría de flujo complementario. Las células A549 como a las HTR8 SVneo fueron sometidas a tratamiento por un periodo de 24 h con la solución Dx referencia o con los complejos iónicos Hi-Dx.

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

La figura 5.10 A, B y C, muestra los histogramas en donde se ilustra el número de eventos frente a la intensidad de fluorescencia relativa al control (PE-A) del fluoróforo (Dx). Como regla general: mayores desplazamientos hacia la derecha en el eje de las "x" (campos de mayor intensidad de fluorescencia) mayor es la cantidad de Dx internalizada a nivel intracelular. Cabe aclarar que en todos los casos, la fluorescencia observada ya sea en la solución de Dx referencia o en los complejos iónicos Hi-Dx debe ser atribuida a la Dx ubicada en el interior celular.

Como puede observarse en todos los casos, el polímero HiH ni el HiNa por sí mismos producen algún tipo de corrimiento hacia campos de mayor fluorescencia respecto a las células control lo cual es lógico debido a la ausencia de fluoróforo en la dispersión de células. En la figura 5.10 A, se observan los histogramas de las células HTR8 SVneo: Si se comparan los perfiles de los complejos iónicos Hi-Dx respecto a la solución de Dx referencia, no se observa diferencia significativa en sus corrimientos hacia campos de intensidad de fluorescencia mayores. Estos resultados concuerdan con los obtenidos con anterioridad mediante otras técnicas y pueden estar asociados con la falta de sobreexpresión de los receptores de CD44 en este tipo de línea celular.

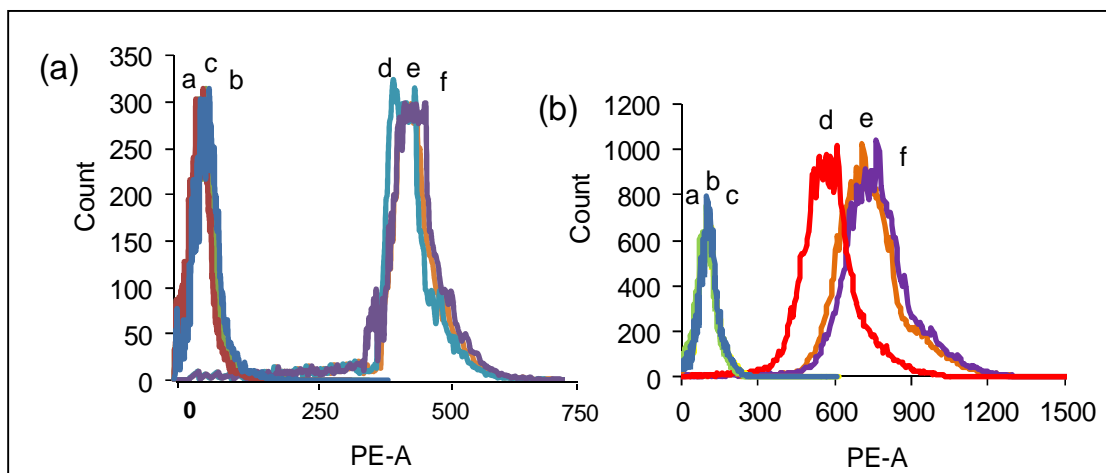


Figura 5.10: Numero de eventos en función a la intensidad de fluorescencia en (a) células HTR8 SV neo, (b) células A549. a-Control; b- HiH, c- HiNa; d- Dx referencia; e- HiH-Dx; f- HiNa-Dx

En la figura 5.10 B se puede ver que tanto el complejo HiH-Dx como el HiNa-Dx producen un corrimiento del histograma hacia campos de mayor intensidad de fluorescencia respecto a la solución de Dx referencia. Estos resultados son indicativos de un aumento en la captación intracelular de Dx cuando el mismo se encontraba formando parte del complejo iónico. Este fenómeno concuerda y corrobora lo observado con las técnicas de viabilidad celular y microscopia de fluorescencia, sugiriendo que la presencia de los receptores de membrana CD44 sobre expresados en las células de cáncer pulmonar favorecería la entrada de Dx en el interior de la misma.

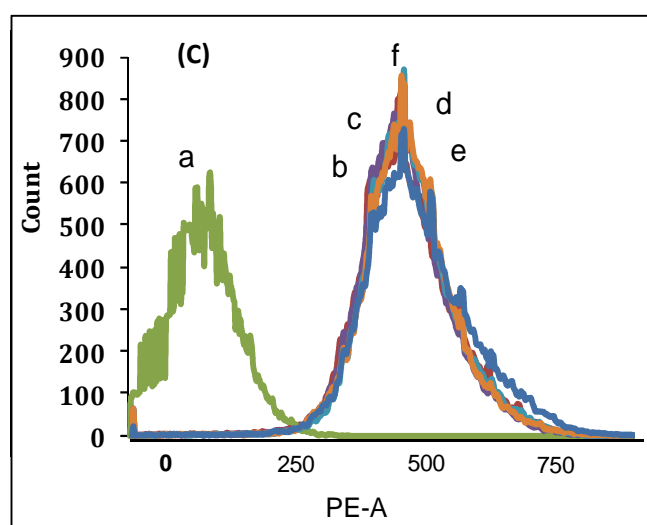


Figura 5.10 C: Número de eventos en función a la intensidad de fluorescencia en células A549 pre-tratadas con Hi, para: a- control; b-Dx referencia; c- Dx (pre-tratadas con HiH); d- Dx (pre-tratadas con HiNa), HiH-Dx (pre-tratadas con HiH); f- HiNa-Dx (pre-tratadas con HiNa)

Cuando las células A549 fueron pre-tratadas ya sea con HiH o HiNa, 24 h antes del ensayo, de manera tal de pre-ocupar los receptores CD44 de la superficie de la membrana (figura 5.10 C), no se observaron diferencias en el corrimiento de los histogramas hacia campos de intensidad de fluorescencia mayores entre las células tratadas con la solución de Dx referencia y complejos iónicos Hi-Dx. Por lo tanto, parece que el pre-tratamiento de las células A549 con Hi produce la internalización de los receptores CD44, evitando que estén disponibles para producir la endocitosis posterior del complejo icónico Hi-Dx. Este resultado refuerza el punto de vista sobre el papel de los receptores CD44 en el aumento de la concentración de Dx en las células diana, cuando se utiliza Hi como portador.

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

El mecanismo implicado en este proceso, en el que el complejo Hi se une a los receptores de membrana CD44 sobre expresados en las células cancerígenas ha sido descrito anteriormente (Shuangshuang S, 2014; Choi KY, 2012). Esta unión produce una cascada de señalización intracelular que da como resultado la internalización del receptor unido a la membrana, y como consecuencia de esto una elevada concentración de Dx internaliza en la célula. Valiéndonos de este proceso, es que postulamos el mecanismo por el cual suponemos que se produce una mayor internalización de Dx a nivel intracelular (figura 5.11).

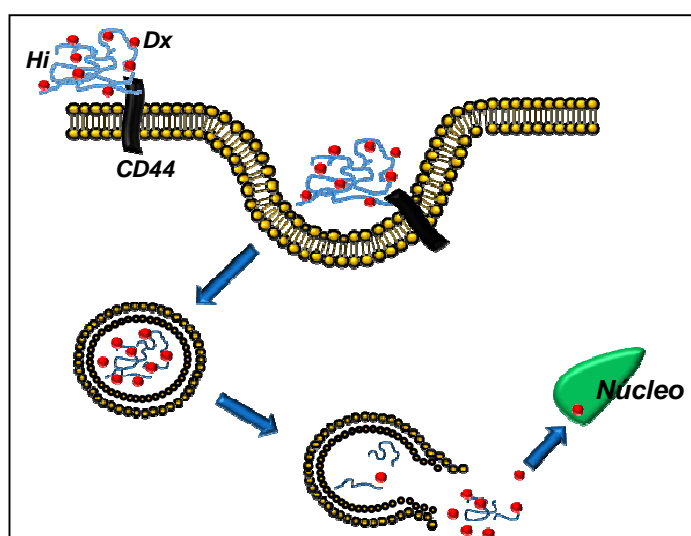


Figura 5.11: Esquema propuesto del complejo CD44-Hi-Dx, implicado en la mayor internalización de Dx a nivel intracelular en células tumorales.

5.3.6. Utilización complementaria de Vr

Como se señaló previamente, se propuso preparar complejos de Hi conteniendo Dx como modelo de FANP y Vr como modelos de FIE. Se obtuvieron dispersiones claras, estables de complejos de composición HiNa-Dx₅₀-Vr₅₀ y HiH-Dx₅₀-Vr₅₀ que fueron sometidos a ensayos de liberación de los principios activos.

La figura 5.12 muestra los perfiles de liberación obtenidos en celdas de Franz de Dx y Vr desde el complejo HiNa-Dx₅₀-Vr₅₀ utilizando agua como medio receptor. Allí puede observarse que el sistema portador modula la liberación de ambos principios activos, liberando con mayor velocidad el Vr, probablemente debido a su menor PM respecto de Dx o al gran poder de intercalación de Dx en las cadenas de Hi debido a su planaridad lo cual

generaría interacciones del tipo hidrofóbicas con las cadenas del PE. Cabe aclarar que el mismo fenómeno se observa para los complejos iónicos HiH-Dx₅₀-Vr₅₀. Cuando se analiza la liberación de Vr desde el complejo binario (HiNa-Vr₅₀) (dato no mostrado), se obtiene un perfil de liberación de Vr 10% menor respecto a la liberación del mismo desde el complejo ternario en los 180 minutos del ensayo. Este fenómeno se le puede atribuir a un posible efecto estérico propiciado por la Dx en el complejo.

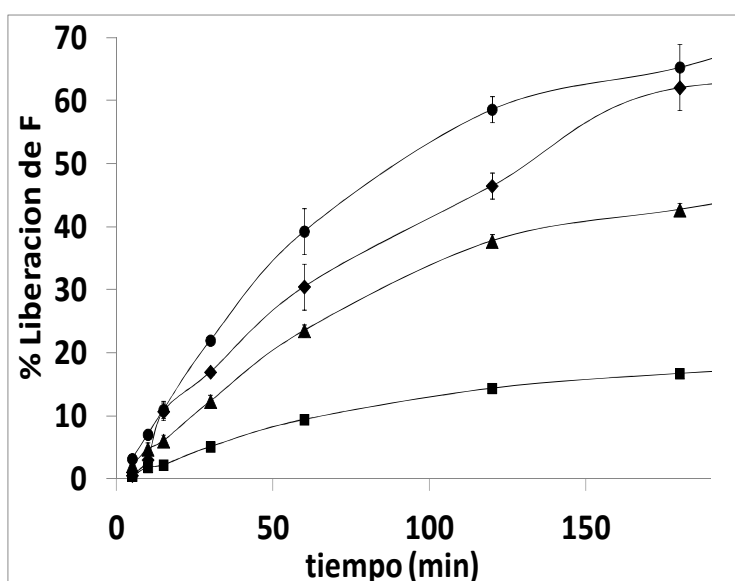


Figura 5.12: Liberación de los principios activos desde el complejo HiNa-Dx-Vr en celdas de Franz, utilizando agua como medio receptor: (♦) Vr referencia; (●) Dx referencia; (■) Liberación de Dx desde el complejo HiNa-Dx-Vr; (▲) Liberación de Vr desde el complejo HiNa-Dx-Vr.

Por último, se realizó entonces un ensayo comparativo de eficacia *in-vitro* de los complejos ternarios (Hi-Dx-Vr) frente a las células A549 respecto a los complejos binarios (Hi-Dx). La figura 5.13 muestra un claro desplazamiento hacia la derecha del histograma (campos de mayor intensidad de fluorescencia) correspondiente a las células tratadas con Hi-Dx-Vr, indicando una mayor concentración intracelular de Dx cuando se utilizó el complejo HiNa-Dx-Vr en comparación con HiNa-Dx, revelando la importancia de inhibir el proceso de eflujo concomitantemente a la acción del FANP. El aporte a esta diferencia en el corrimiento hacia campos de mayor intensidad de fluorescencia puede estar relacionado con ambos mecanismos, tanto a la mayor internalización de Dx por parte del complejo Hi-Dx como por la menor tasa de eflujo de Dx como consecuencia de la inhibición de este mecanismo propiciado

5- Evaluación de los complejos Hi-Dx frente a líneas celulares tumorales y fisiológicas

por Vr. Este corrimiento diferencial hacia campos de intensidad de fluorescencia también se observó en los complejos ternarios HiH-Dx-Vr respecto a los complejos binarios. Cabe aclarar que los corrimientos de los complejos ternarios fueron similares a los obtenidos por la solución combinada de los F (Dx y Vr).

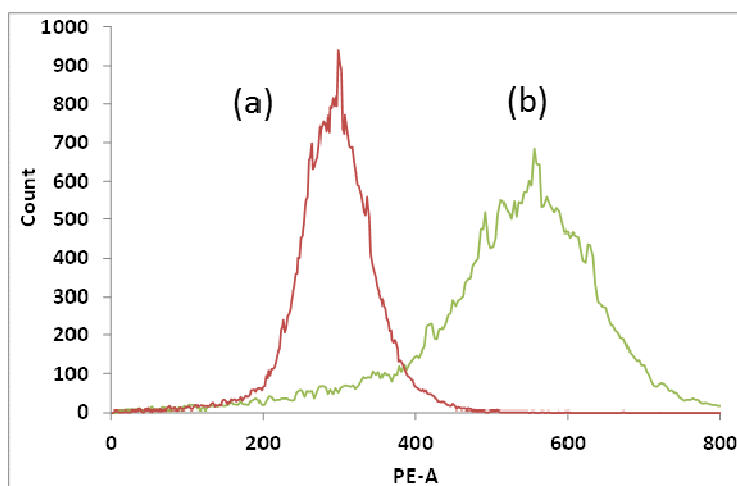


Figura 5.13: Número de eventos en función a la intensidad de fluorescencia en células A549, para: a- Complejo HiNa-Dx; b- Complejo HiNa-Dx-Vr.

5.4. Conclusiones

Los resultados presentados en las secciones precedentes permiten destacar los siguientes aspectos:

- El Hi, tanto en sus formas HiNa como HiH, forma dispersiones estables de los complejos iónicos con Dx, comportándose como un portador de fármacos, con capacidad de modular su liberación en medios biológicos simulados.
- Los ensayos frente a cultivos de líneas celulares tumorales y normales, monitoreados por tres metodologías diferentes indicaron:
 - Mayor selectividad y eficacia de los complejos Hi-Dx frente a las células tumorales respecto a las no tumorales.
 - Mayor eficacia de los complejos Hi-Dx respecto a Dx de referencia sobre las células tumorales.

- La integral definida entre 0 y 72 h de las curvas de viabilidad celular (ASC) indicó un aumento de 3 veces en la eficacia de los complejos, respecto a la Dx de referencia.

- Se vinculó el aumento de la eficacia de los complejos Hi-Dx en las células neoplásicas con el mayor número de receptores CD44 que estas poseen.
- El efecto del pre-tratamiento con Hi sobre las células A549 está en consonancia con la interpretación de los resultados descriptos sobre el rol de los receptores CD44.
- Por otra parte, el ensayo utilizando el complejo combinado Hi-Dx-Vr indicó una mayor concentración intracelular de Dx en relación al complejo Hi-Dx, lo que puede vincularse a la inhibición del proceso de eflujo por acción de Vr, lo que constituye un resultado auspicioso.

Capítulo 6

*Evaluación de los
complejos Hialuronano-
Timolol en el tratamiento
de la hipertensión ocular*



6.1. Introducción

Es bien sabido que las formulaciones oftálmicas líquidas convencionales poseen baja biodisponibilidad debido al gran drenaje lagrimal constante en el ojo. El drenaje normal de una dosis de F aplicado a nivel tópico ocular comienza inmediatamente después de la instilación y se completa esencialmente dentro de los 5 minutos posteriores (Gupta S, 2010), haciendo que el volumen administrado sea arrastrado fuera de su sitio de acción, dificultando su acción medicamentosa. La biodisponibilidad de formulaciones oftálmicas es errática y muy baja (entre el 1-10%), en gran parte por el corto tiempo de residencia precorneal de soluciones oftálmicas (Dave V, 2015; Gupta S, 2010). Más del 75% de una gota de una solución oftálmica aplicada localmente se pierde a través del drenaje naso-lagrimal, y es absorbido sistémicamente a través de la conjuntiva; por lo tanto, la disponibilidad de fármacos oculares es generalmente muy baja. Este porcentaje de fármaco que se absorbe a nivel sistémico a su vez es un grave inconveniente en términos de seguridad (Schoenwald RD, 1997). El cumplimiento posológico también es una problemática a considerar, sobre todo entre los pacientes que tienen enfermedades crónicas como por ejemplo el glaucoma (Nordstrom BL, 2005). A todos estos aspectos farmacocinéticos de las formulaciones oftálmicas se le suman las propiedades fisicoquímicas desfavorables de muchos fármacos utilizados, tales como la permeabilidad, solubilidad. Como consecuencia de estos factores, los objetivos actuales en el diseño de nuevos sistemas transportadores de fármacos en formulaciones oftalmológicas se orientan a lograr: a) la prolongación del contacto precorneal de la formulación en cuestión; b) un aumento en la permeabilidad del fármaco; y c) una reducción en la tasa de eliminación del fármaco.

La estrategia de utilizar complejos PE-F como portadores de fármacos en diferentes formas farmacéuticas y para diferentes categorías terapéuticas se propone actualmente en el campo de la administración de fármacos (Guzmán ML, 2012; Ramírez-Rigo MV, 2009; Quinteros DA, 2008).

El uso de polímeros biodegradables como vehículos de fármacos oftálmicos, ha sido el objeto de numerosos estudios científicos. Entre ellos, Hi se introdujo de manera temprana como un componente viscosante de formulaciones oftálmicas debido a sus propiedades fisicoquímicas únicas, tales como la alta capacidad de retención de agua, ser no irritante, ser viscoelástico con un comportamiento pseudoplástico, y ser mucoadhesivo. Hi y Hi con modificaciones o derivatizaciones químicas, han sido investigado ampliamente en los últimos

años para el diseño de sistemas portadores de fármacos para la vía ocular (Marjorie J, 2011; Annick L, 2005). En este campo, Saettone MF (1991, 1989) reportó algunos resultados de complejos iónicos de Hi con diversos F para formulaciones oftálmicas. Además, se registró una patente que cubre formulaciones oftálmicas basadas en las denominadas sales de Hi con F para la terapia ocular (Della Valle F, 1995). Por otro lado, se reportaron varios trabajos acerca del uso de Hi modificado como portador de F en formulaciones oftálmicas: Bucolo (Bucolo C, 1998) obtuvo esteres parciales de Hi con Timolol y pilocarpina, aumentando la biodisponibilidad de estos F en comparación con la preparación comercial en conejos normotensos.

Debido a la frondosa bibliografía recientemente detallada respecto al uso de Hi como ingrediente activo en formulaciones oftálmicas, y basándonos en los antecedentes acerca de las interacciones iónicas PE-F. El objetivo de este capítulo se centra en el logro de información detallada respecto a las propiedades de los complejos iónicos Hi-F con el fin de identificar sus efectos, los pasos que determinan el inicio, la intensidad y duración del efecto farmacoterapéutico.

Para este trabajo, nos propusimos utilizar Hi como sistema portador de F oftálmicos. Se seleccionó el Timolol Maleato (TM – figura 6.1) como F antiglaucomatoso contraíón. El TM, es un agente antihipertensivo, es un beta bloqueante no selectivo, es decir bloquea la acción de la epinefrina tanto en receptores adrenérgicos β_1 y receptores adrenérgicos β_2 . No tiene actividad simpaticomimética intrínseca ni actividad estabilizadora de membranas. Sin actividad estimulante o depresora cardíaca directa significativa ni actividad anestésica local (U.S National Library of Medicine, 2015; Sweetman SC, 2009; Brunton LL, 2007). En la actualidad TM es ampliamente utilizado en el tratamiento de la hipertensión ocular. Se comercializa como gotas oftálmicas de administración tópica (Alfa-beta SACIFyS, 2015).

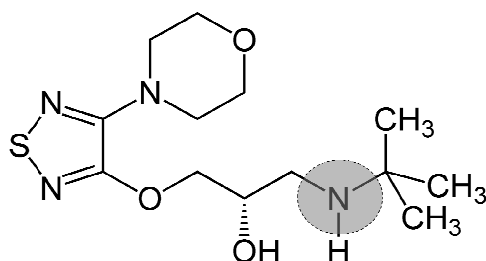


Figura 6.1: Estructura química de TM. Se destaca en círculo los grupos funcionales amino que intervienen en la reacción con el Hi.

Haremos hincapié en la generación de un conocimiento, aún no detallado en bibliografía, acerca de la afinidad de los grupos carboxílicos de Hi como SPF, y los grupos amino ionizables del TM bajo diferentes condiciones, así como también en brindar información acerca de los pasos limitantes involucrados en el éxito terapéutico del complejo iónico. Nuestro interés es proporcionar información más detallada sobre este punto con el fin de contribuir a generar bases más sólidas para evaluar la potencialidad del Hi como sistema portador de F, conveniente para ser utilizado en indicaciones terapéuticas específicas.

En este capítulo se desarrollará un estudio detallado acerca de las capacidades del complejo Hi-TM para formar pares iónicos, modular *in-vitro* la liberación del F en cuestión, así como también evaluar la permeabilidad del TM proveniente del complejo Hi-TM mediante ensayos *ex-vivo* de permeación transcorneal, y su capacidad *in-vivo* para disminuir la presión intraocular en conejos normotensos.

6.2. Materiales y Metodología

Se utilizó el HiNa y HiH descrito en el capítulo 2. El TM (Timolol Maleato- Parafarm, Bs. As., Arg) seleccionado para obtener los productos (Hi-TM) es de calidad farmacopea. Los reactivos y solventes son de calidad pro análisis. Sucrosa (Sigma-Aldrich, USA) fue utilizada para ajustar la Osmolaridad. Se utilizó agua deionizada para la realización de los ensayos.

6.2.1. Metodología de preparación de los complejos

La metodología llevada a cabo para la preparación de las dispersiones de los complejos HiNa-TM₁₀₀ y HiH-TM₁₀₀ se describió en el capítulo 3. Se ajustó el pH de las dispersiones mediante el agregado gota a gota de NaOH hasta alcanzar un valor cercano a la neutralidad. Para los ensayos *in-vivo* se ajustó la Osmolaridad de las dispersiones Hi-TM₁₀₀ mediante el agregado de Sucrosa. A su vez, las dispersiones fueron esterilizadas previo a su utilización mediante filtración final.

6.2.2. Mediciones de pH y Osmolaridad

Los valores de pH de las dispersiones al Hi-F se registraron de acuerdo al capítulo 2.

Para la determinación de la Osmolaridad se utilizó un Osmometro de presión de vapor (VAPRO® modelo 5520 - Wescor, inc). La muestra a analizar (10 µl) se coloca sobre un soporte de papel, el mismo se introduce en el equipo y se cierra la cámara de muestras. El cierre inicia la secuencia de medición automática. La Osmolaridad se expresa en unidades de mili Osmoles por litro (mOsm/l).

6.2.3. Liberación *in vitro* de TM desde los complejos Hi-TM

La metodología y el equipamiento utilizado para la determinación de la cinética de liberación del F desde los complejos iónicos Hi-F fueron descriptos en el capítulo 4.

6.3.4. Evaluación de los complejos Hi-TM para el tratamiento de la presión intraocular

6.2.4.1. Animales de experimentación

Se utilizaron conejos machos, blancos, normotensos *New Zeland* con un peso corporal entre 2-2,5 kg. A los conejos se les proporcionó alimentos y agua *ad-libitum* en una habitación a temperatura controlada (21 ± 5 °C). Fueron expuestos a periodos de 12 h de luz/oscuridad. El procedimiento para la manipulación de animales se realizó de acuerdo a la resolución sobre el uso de animales en la investigación según ARVO (Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología), el Consejo Directivo de Comunidades Europeas (86/609/CEE) y el Comité de empleo de animales de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, que revisó y aprobó los protocolos. Tras una semana de adaptación en las instalaciones, los animales fueron ingresados en la sesión experimental.

6.2.4.2. Evaluación de la irritación *in-vivo*

La capacidad de producir irritación ocular y/o los potenciales efectos dañinos de las muestras en evaluación fueron valorados utilizando una versión ligeramente modificada de la prueba de Draize (Tartara LI, 2012; Palma SD, 2009). Para este ensayo se utilizaron 6 conejos por cada formulación evaluada. Las formulaciones testeadas se colocaron en el saco conjuntival del ojo derecho de cada conejo, mientras que el ojo izquierdo se utilizó como control en el que se aplicó una solución de NaCl 0,9% p/v. Además, se utilizó 1 conejo como

6- Evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular

control positivo al cual se le administró una solución de Lauril Sulfato de Sodio al 2%. Se determinó la irritación pre y post-exposición de las formulaciones en los párpados, la conjuntiva, la córnea y el iris mediante la observación del órgano con adecuada iluminación, utilizando un oftalmoscopio binocular indirecto (Neitz IO- α small pupils Tokyo, Japan) equipado con un lente de 20 dioptrías (Nikon, Tokio, Japón). En cada observación a tiempo 0, 30, 60, 120, 240, 480 y 600 min, una gota de fluoresceína sódica al 0,25% se instiló en cada ojo para contrastar la potencial lesión en la córnea.

6.2.4.3. Ensayos de mucoadhesión

Para llevar a cabo el ensayo de mucoadhesión, se seleccionaron 6 conejos, a continuación, 50 μ l de fluoresceína sódica al 0,25 % p/v fueron colocados en el fondo del saco conjuntival del ojo derecho de cada conejo, mientras que en el ojo izquierdo, se colocaron 50 μ L de una dispersión de HiH o HiNa al 0,5 % p/v conteniendo fluoresceína (0,25 % p/v). En este caso, no existe interacción alguna entre fluoresceína y Hi, esta dispersión corresponde a una mezcla física. Se observó el comportamiento de la formulación, particularmente la eliminación de fluoresceína utilizando un oftalmoscopio binocular indirecto con filtro de cobalto azul (Neitz IO- α small pupils Tokyo, Japan) equipado con un lente de 20 dioptrías (Nikon, Tokio, Japón). Se asignaron puntajes basándonos en la eliminación de fluoresceína del ojo. El rango de las puntuaciones fue de 3 a 0 tanto en la cornea, fondo del saco y menisco lagrimal. Valores mayores corresponden a la matriz completa de fluoresceína mientras que el valor cero corresponde a la matriz sin fluoresceína, los valores medios se corresponden con situaciones intermedias.

6.2.4.4. Mediciones de presión intraocular

Se midió la presión intraocular (en mm de Hg) usando un tonómetro Perkins MK2 (Saint Clement Clarke, Inglaterra) calibrado de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Antes de la medición de la PIO, se utilizó un blefaróstato infantil para mantener los párpados abiertos durante las mediciones.

Para este ensayo se utilizaron diez conejos por condición. En todos los casos, la PIO se midió a tiempo 0, 2, 4, 6, 8, y 10 h. Previo a esto, se determinó la PIO en reposo del animal

durante dos días previos a la aplicación de la formulación (PIO basal). De esta manera se estableció la línea de base normal de cada animal antes del tratamiento. Los experimentos se realizaron siempre a la misma hora del día. Entre cada condición evaluada, se dejó transcurrir un periodo de tres semanas para permitir la eliminación completa del compuesto evaluado. Se utilizó como solución referencia un colirio comercial de TM denominado Zopirol® (Maleato de Timolol, 0,5 % p/v). Por otro lado se evaluaron los complejos iónicos de HiH-TM₁₀₀ y HiNa-TM₁₀₀ (PE al 0,5 % p/v, TM al 0,5 % p/v) los cuales poseían un pH y Osmolaridad biocompatibles. Los resultados se expresan como el porcentaje de cambio de la PIO (% PIO) en función de la PIO basal (media mm de Hg \pm error estándar de la media).

Finalmente se determinó el área sobre la curva (ASC) utilizando el eje de las abscisas como límite superior para cada uno de los perfiles de PIO calculados mediante el método de los trapecios, utilizando el programa Excel®.

6.2.4.5. Estudios de permeación transcorneal

Los experimentos de permeación transcorneal se realizaron utilizando un sistema bicompartimental de difusión modificado (ver figura 6.2). La celda, hecha de plástico acrílico, está constituida por un compartimento donador y un compartimento de receptor (volúmenes de 1,0 y 5,0 mL, respectivamente), separados entre sí por una membrana natural: la cornea de conejo. La solución utilizada en el medio receptor fue buffer isotónico Ringer (p/v: 0,44 de NaCl, 0,37 H₂NaPO₄, 1,51 Na₂HPO₄, 6x10⁻³ NaNO₃) de pH 7,4. Tanto el compartimento donador como el receptor son aireados constantemente con una mezcla de 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ para mantener oxigenada la córnea y de esta forma conservarla viable a lo largo del ensayo.

Cuatro conejos albinos fueron sacrificados de acuerdo con los protocolos. En primer lugar, se anestesiaron con fenobarbital (Fada Fenobarbital, Fada Pharma), antes de ser sacrificados con una mezcla de 10 % de O₂ y 90 % de CO₂ en una cámara hermética de acrílico. Inmediatamente, las córneas, con un anillo de 2 mm de esclera, se extirparon y se montaron en la cámara de permeación. Una alícuota de 5 mL de la solución Ringer se añadió a la cara endotelial (medio receptor), mientras que 1,0 mL de cada formulación se añadió a la cara epitelial (medio donador). La temperatura en la cámara de difusión se mantuvo a (35,5 \pm 0,5) °C utilizando un baño de agua termostático. Alícuotas de muestra del compartimento receptor fueron retiradas a tiempos preestablecidos e inmediatamente reemplazados por medio fresco.

6- Evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular

Las concentraciones de F fueron determinados por espectrofotometría UV a la longitud de onda de máxima absorción del Timolol (295 nm).

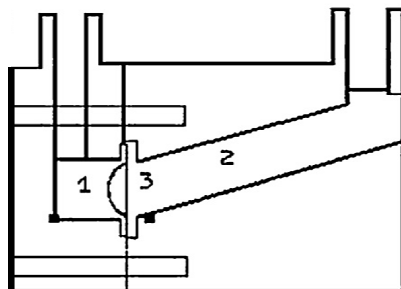


Figura 6.2: Equipo utilizado para llevar a cabo estudios de permeación transcorneal de los complejos Hi-F. 1- Compartimento donador; 2- Compartimento receptor; 3- Cornea.

6.2.4.6. Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como el promedio \pm la desviación estándar. El análisis estadístico se realizó utilizando el Test T para muestras independientes ($p < 0.05$) con el programa InfoStat®.

6.3. Resultados y discusiones

6.3.1. Distribución de especies en el equilibrio mediante diálisis

La distribución de las especies en el equilibrio se determinó a través de la diálisis de los complejos iónicos Hi-TM. La figura 6.3 informa los resultados obtenidos mediante esta técnica, donde se muestran los porcentajes de especies presentes en el equilibrio para cada uno de los complejos iónicos ensayados.

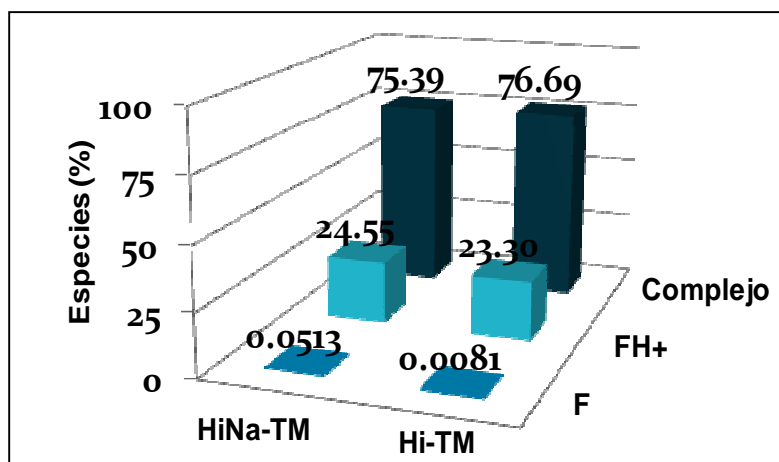


Figura 6.3: Distribución de especies en el equilibrio mediante diálisis de los complejos binarios HiH-TM y HiNa-TM.

Como puede verse en la figura, en los complejos ensayados se obtiene una alta condensación contraiónica (Hi-TM) superior a 75% para ambos casos, lo que nos está dando una idea de la alta capacidad de carga y afinidad que este polímero tiene por la TM, y a su vez, produciendo constantes de afinidad (K_{pi}) elevadas del orden de las obtenidas con F modelo detallados en el capítulo 3. Por otra parte, la comparación entre los complejos de TM con HiH y HiNa reveló que el primero mantiene la capacidad acomplejante respecto a la sal sódica del PE. Por último, la diferencia en el porcentaje de formación de par iónico entre HiNa-TM y HiH-TM puede deberse en gran medida a la mayor proporción de iones que se generan en la formación de HiNa-TM.

6.3.2. Liberación *in-vitro* de TM desde los complejos Hi-TM

La figura 6.4 muestra la liberación lenta del TM desde los complejos iónicos. Los resultados aquí observados están en línea con los obtenidos en los ensayos de liberación de F modelo desde los sistemas Hi-F. Los sistemas Hi-TM se comportan como un reservorio del F, y lo liberan lentamente a partir de los complejos PE-F. El control en la liberación se mantiene a pesar de la presencia de una sal neutra, lo que revela la alta afinidad del fármaco por los grupos carboxílicos de Hi.

6- Evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular

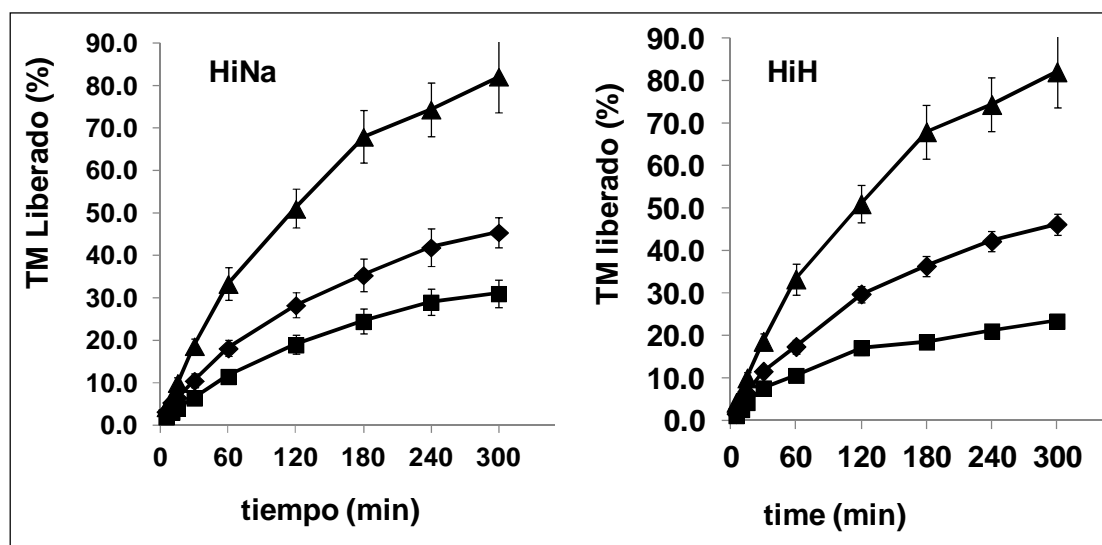


Figura 6.4: Perfil de liberación de TM desde los complejos iónicos HiH-TM y HiNa-TM. (▲) Solución de TM referencia; (◆) Liberación desde el complejo cuando se coloca NaCl 0.9% como medio receptor; (■) Liberación desde el complejo cuando se coloca agua como medio receptor.

6.3.3. Ensayos *in-vivo* de irritación y mucoadhesividad

Los ensayos de mucoadhesión mostraron las excelentes propiedades bioadhesivas ya bien conocidas del HiNa como se observa en la figura 6.5. Para la dispersión conteniendo la mezcla física entre HiNa y fluoresceína, esta última se mantuvo en el ojo de los conejos ensayados durante todo el período ensayado (60 min). Si bien es sabido que HiNa tiene prolongado tiempo de residencia a nivel de las mucosas, es posible que si bien el PE aun reside a nivel tópico en el ojo, la fluoresceína sea lavada desde el sistema debido a que no hay ningún tipo de interacción entre la fluoresceína y el HiNa. Por otro lado, en la solución de fluoresceína referencia, la fluorescencia desapareció dentro de los primeros 15 minutos de ensayo. Este fenómeno no debe atribuirse sólo a la mucoadhesividad del HiNa, sino que también hay una contribución de la viscosidad de dicho PE en la retención de fluoresceína por un periodo más largo. Cabe aclarar que la solución de HiH con fluoresceína también fue ensayada mediante esta metodología, observándose que la misma fue lavada también en los primeros minutos ensayados (dato no mostrado por superposición). Este fenómeno puede darse como consecuencia de la pérdida de la mucoadhesividad del HiH debido a su despolimerización parcial de sus cadenas, aspecto que fue discutido en capítulos anteriores (Schwartz HE, 2005).

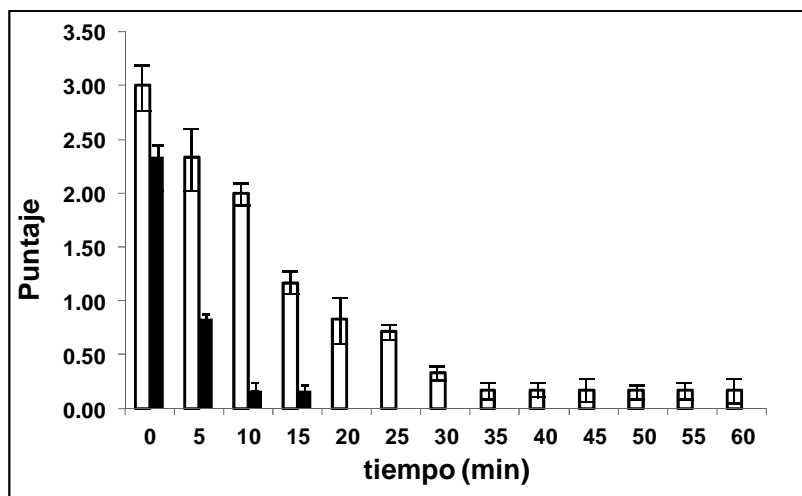


Figura 6.5: Ensayo de mucoadhesividad para el HiNa mezclado con una solución de fluoresceína (HiNa-fluoresceína - barras vacías-) respecto a una solución de fluoresceína referencia (barras completas).

Las dispersiones del complejo iónico compuestas por HiNa o HiH con TM no evidenciaron ninguna irritación a nivel tópico de la conjuntiva ni de la córnea, así mismo, no se observó irritación intraocular durante las 10 h de estudio, lo que se correlaciona con las propiedades del Hi de ser no irritante y no inflamatorio. El conjunto de figuras 6.6 muestra las fotografías de los ojos de los conejos sobre los cuales se llevó a cabo el ensayo de irritación. Estas fotografías comprueban lo anteriormente expuesto. La figura 6.7 muestra la fotografía de los conejos utilizados como control positivo a los cuales se les administró una solución de lauril sulfato de sodio.



HiH-TM



HiNa-TM

Figura 6.6: Fotografía óptica de los ojos de los conejos tratados con los complejos HiH-TM y HiNa-TM en donde se evidencia la ausencia de irritación a nivel tópico ocular.

6- Evaluación de los complejos Hi-TM en el tratamiento de la hipertensión ocular

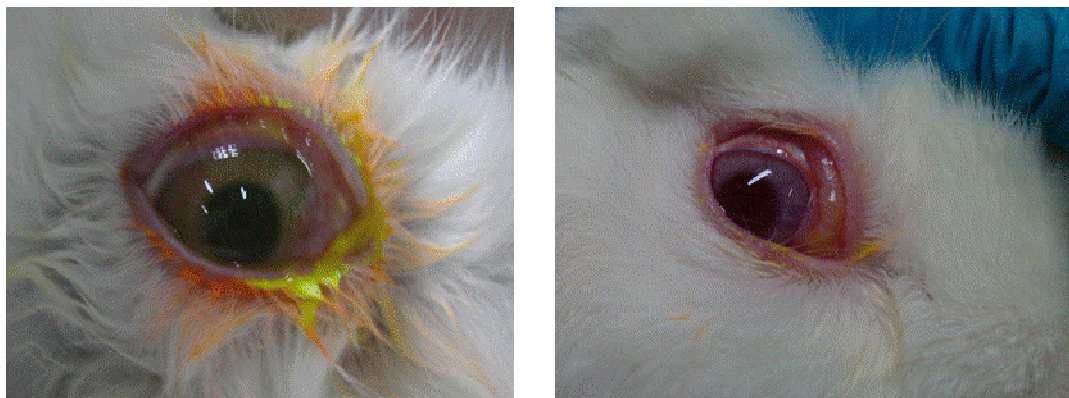


Figura 6.7: Fotografía óptica de los ojos de los conejos tratados con lauril sulfato de sodio en donde se evidencia la presencia de irritación a nivel tópico ocular.

6.3.4. Ensayos de medición de presión intraocular

La figura 6.8 muestra la disminución de la PIO de los complejos iónicos HiNa-TM y HiH-TM comparado con una formulación comercial de TM denominada Zopiro[®]. En el gráfico también se observa la PIO basal de los conejos utilizados como control. Como se puede observar, la aplicación de los complejos iónicos HiNa-TM y HiH-TM en el ojo de los conejos normotensos produjo una notable disminución de la PIO, similar a la producida por la formulación comercial Zopiro[®] (punto "A" en el gráfico). Es importante destacar que esta disminución es comparable en el tiempo y el magnitud con las gotas oculares comerciales. El complejo iónico entre HiNa y TM alcanza la máxima disminución de la PIO a las 4 h de transcurridos el ensayo, correspondiente a un 30% de reducción de la PIO (punto "B" en el gráfico). A las 8 h posteriores a la administración (punto "C") la formulación comercial no presentó ningún efecto hipotensor sobre la PIO, mientras que el complejo HiNa-TM continuó reduciendo este parámetro en aproximadamente un 22%. El efecto hipotensor se mantuvo más allá de las 10 h (punto "D") y desapareció aproximadamente 12 horas después de la aplicación (extrapolación de puntos C y D). En el gráfico se observa el perfil de PIO de aquellos conejos tratados con el complejo iónico HiH-TM, y como se puede observar no se evidencia diferencia significativa con la solución de Zopiro comercial, en parte por el lavado del complejo desde la superficie ocular mediado por los procesos fisiológicos del ojo.

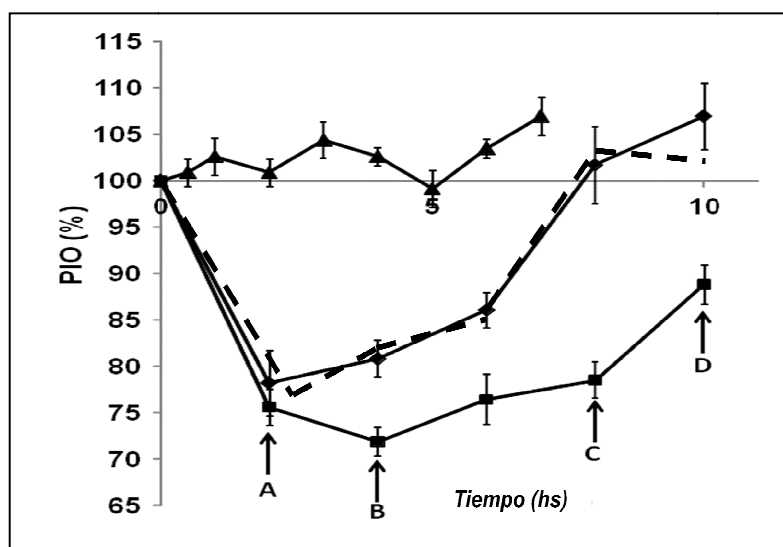


Figura 6.8: Perfiles de PIO en función del tiempo de conejos normotensos. (▲) PIO basal; (---) Complejo iónico HiH-TM; (◆) Zopirol; (■) Complejo iónico HiNa-TM.

Se determinaron las ABC como un indicativo de eficacia de las formulaciones ensayadas. La tabla 6.1 muestra los resultados obtenidos mediante esta metodología. Si las áreas sobre las curvas (ASC) son considerados como una indicativo de eficacia, se puede detectar que el área del complejo iónico HiNa-TM es aproximadamente 2 veces mayor a la formulación comercial Zopirol®. A su vez, el HiH-TM no muestra diferencia alguna en términos de eficacia con la formulación comercial.

Tabla 6.1: Parámetros obtenidos del procesamiento de los datos del grafico de PIO. Se muestran los valores de los puntos A, B, C, D, y las aéreas sobre la curva (ASC) para cada compuesto ensayado.

	% máximo de disminución de PIO	Tiempo de máxima disminución de PIO	Duración del efecto (hs)	Área Sobre la Curva (ASC)
Zopirol®	20	2	8	12.44
HiNa-TM	30	4	12	21.8
HiH-TM	15	2	7	12.95

La prolongación del efecto farmacodinámico del TM, se puede atribuir a un aumento en el tiempo de permanencia de la formulación en el ojo de los conejos debido a su mucoadhesividad, viscosidad, y la capacidad portadora y de liberación sostenida del complejo

iónico HiNa-TM. En contraste, la formulación que contiene HiH como un portador de TM no muestra una prolongación del efecto del F como consecuencia de su baja viscosidad, lo que está estrechamente relacionado con propiedades bioadhesividad.

6.3.5. Estudios *ex-vivo* de permeación transcorneal

Es importante señalar que el epitelio corneal es la principal barrera para la absorción del fármaco en el ojo (Boddu HS, 2014; Radhika M, 2014; Laude A, 2010). En comparación con otros tejidos epiteliales como por ejemplo el intestinal, nasal, bronquial y el traqueal, el epitelio corneal es relativamente impermeable, sin embargo es más permeable que el estrato córneo (Cholkar K, 2015, 2013; Lopes LB, 2014). Para llevar a cabo estos ensayos *ex-vivo* de permeación transcorneal, se seleccionó aquella formulación que *in-vivo* presentó un efecto superior de la formulación comercial de manera tal de cumplir con uno de los principios de las 3R en el manejo de animales de experimentación (la reducción) (PILAS 2015; Russel WM, 1959).

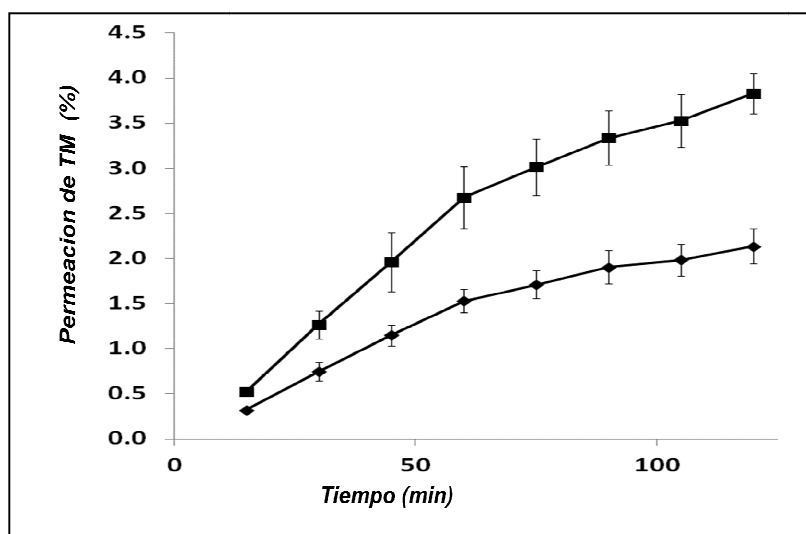


Figura 6.9: Permeación transcorneal en celdas bicompartimentales del complejo iónico HiNa-TM (◆) y de la formulación comercial Zopirol (■).

Los resultados referentes a la permeación de TM a través de la córnea se presentan en la figura 6.9. Como se puede observar, este fenómeno es similar al obtenido a partir de la liberación *in-vitro* de fármaco usando las células bicompartimentales del tipo Franz. Desde que

TM es un fármaco altamente permeable y no es un inconveniente real a resolver, la permeación del mismo en la solución referencia es más alta que la observada para el complejo iónico HiNa-TM, en el que la liberación de TM es retardada por la interacción electrostática entre el Hi y el TM. Por lo tanto, el TM no está disponible en solución para permear libremente a través de la cornea hacia el compartimento receptor. El complejo HiNa-TM se comporta como un reservorio del F que libera al mismo de manera prolongada en el tiempo.

6.4. Conclusiones

Ambos complejos HiH-TM y HiNa-TM exhibieron una similar capacidad de modular la velocidad de liberación de TM en celdas de Franz. Sin embargo, HiNa-TM exhibió una mayor eficacia *in-vivo* para disminuir la PIO en conejos normotensos aumentando la intensidad y duración del efecto en relación tanto a HiH-TM como a la referencia Zopirol®.

Dado a que, (a) por una parte, en experimentos *ex-vivo* el TM exhibe una menor velocidad de permeación transcorneal desde HiNa-TM en relación con una solución referencia de TM, asociada a su capacidad moduladora y (b) por otra parte, la viscosidad de HiNa-TM es mayor que la de HiH-TM lo que se asocia a la longitud de cadena, se concluye entonces que la mayor eficacia de HiNa-TM puede asociarse a su capacidad bioadhesiva junto a su propiedad de modular la liberación de TM prolongando en el tiempo la penetración intraocular de la formulación aumentando la intensidad y duración del efecto farmacológico.

Estas formulaciones pueden ser consideradas una alternativa viable a la forma de dosificación oftálmica convencional por su biodegradabilidad y la tolerabilidad.

Capítulo 7

*Evaluación de los
complejos Hialuronano-
Bencidamina en el
tratamiento de la
osteoartritis*



7.1. Introducción

La osteoartritis (OA), es una enfermedad que afecta a las articulaciones sinoviales y se caracteriza por la degradación y pérdida articular del cartílago, con remodelación del hueso subcondral, e inflamación de la membrana sinovial (Dong J, 2013; Borrás-Verdera A, 2012; Ozlem Nisbet H, 2012). Los signos clínicos pueden incluir: dolor en las articulaciones, hinchazón, rigidez y pérdida de movilidad, aumentando en intensidad a medida que la enfermedad progresa (Frampton JE, 2010; Pelletier JP, 2003). La OA es una de las causas más comunes de discapacidad a largo plazo entre adultos (Chevalier X, 2010; Richette P, 2009). El líquido sinovial en las articulaciones afectadas, contiene una menor concentración de Hialuronano (Hi) que en aquellas articulaciones sanas, provocando una reducción sustancial de su capacidad viscoelástica, de lubricación y de absorción de choques (Frampton JE, 2010; Chevalier X, 2010; Strauss EJ, 2009; Altman RD, 2004). Hi es un polímero natural y se distribuye ampliamente en el organismo. En las articulaciones, el Hi, proporciona lubricación, favorece la absorción de choques, forma una estructura que le brinda estabilidad y tiene efectos directos sobre las funciones de las células sinoviales (Strauss EJ, 2009; McDonald C, 2000).

En la actualidad, no se dispone de un tratamiento para esta enfermedad, los principales objetivos en el tratamiento de la OA se centran en la reducción de los síntomas, la minimización de la discapacidad funcional y la limitación de la progresión de las alteraciones estructurales (Pavelka K, 2007; Altman RD, 2004). Las opciones de tratamiento actuales incluyen medidas no farmacológicas tales como la pérdida de peso, el uso de aparatos ortopédicos, ejercicio y terapia física. Entre los farmacológicos: medidas que se basan en el uso de analgésicos, compuestos utilizados en la visco-suplementación y lubricación de las articulaciones (por ejemplo: sulfato de glucosamina, sulfato de condroitina y la diacereína), opioides, corticoides, Hi intraarticular, combinaciones de estos tratamientos y, en etapas más avanzadas, tratamiento quirúrgico (Strauss EJ, 2009; Lundsgaard C, 2008; Sun SF, 2006; McDonald C, 2000).

En la actualidad, debido a que se conocen sus efectos endógenos en las articulaciones, y a la ausencia de efectos inmunogénicos y tóxicos, Hi es ampliamente utilizado como tratamiento para mejorar el dolor y las funciones de las articulaciones con OA (Strauss EJ, 2009; Tikiz C, 2005). Puesto que la elasticidad y la viscosidad de líquido sinovial son directamente proporcionales al contenido e integridad del Hi, una inyección intraarticular de

Hi representa un enfoque racional para el tratamiento de la OA (Strauss EJ, 2009; Tikiz C, 2005; Altman RD, 2004). Numerosos estudios clínicos han demostrado que inyecciones intraarticulares de Hi en diferentes dosis mejoran los síntomas, especialmente el dolor en OA (Trigkilidas D, 2013; Shamliyan TA, 2012; Altman RD, 2009, 2004). Sin embargo, los tratamientos intraarticulares con Hi requieren de un régimen posológico que en general es difícil de cumplir, más aún si se considera el dolor ocasionado en el momento de la administración.

Actualmente, un interesante número de artículos científicos publican la utilización de sistemas conteniendo Hi derivatizado covalentemente, o formando parte de complejas estructuras superiores. Por ejemplo, Dong J (2013), diseñó un sistema liposomal complejo constituido por una estructura de Hi cargado con colecoxib como F contra el dolor, demostrando que la administración del sistema generado era más eficiente que las terapias individuales. Akie Hommaa (2009) obtuvo complejos covalentes a partir de Hi y metotrexato demostrando que el mismo era más efectivo en el tratamiento de la OA utilizando ratas como modelo de experimentación. En consecuencia, los productos obtenidos surgen de procesos complejos de síntesis, que involucran numerosos pasos. Sin embargo, en la frondosa bibliografía sobre este tema no se encuentra descrita la utilización de Hi, conjuntamente con F para el tratamiento de la OA, mediante la formación de complejos iónicos PE-F.

En este capítulo se describe el inicio de un estudio detallado acerca de las capacidades del complejo Hi-Bencidamina (seleccionado como F para el tratamiento de la OA debido a sus propiedades analgésicas, anestésicas y antiinflamatorias) para formar pares iónicos, modular la liberación del F en ensayos *in-vitro*.

Bencidamina es un F que pertenece a la familia de los AINES, utilizado como antiinflamatorio, analgésico y anestésico. A diferencia del resto de los AINES, Bencidamina posee un grupo amino en su estructura. Su actividad es debida a su acción antagonista sobre las aminas vasoactivas, estabilizando las membranas celulares y lisosómicas e inhibiendo las prostaglandinas que intervienen en los procesos inflamatorios (Sweetman SC, 2009; Brunton LL, 2007).

En la actualidad se comercializa como solución para el enjuague bucal en el tratamiento de dolores en la cavidad bucal o de garganta (Alfa-beta SACIFyS, 2015). En la figura 7.1 se muestra la estructura química de la Bencidamina.

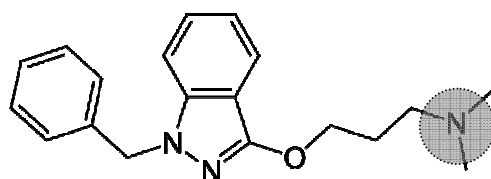


Figura 7.1: Estructura química de Be. Se destaca en círculo los grupos funcionales amino que intervienen en la reacción con el Hi.

Nos propusimos obtener una formulación inyectable en forma de polvo liofilizado que reúna los atributos recomendados para este tipo de forma farmacéutica, y que será enviado a la Universidad de Tandil para su evaluación en un modelo animal de OA. Paralelamente se analizará la estabilidad y facilidad con la que estas dispersiones son reconstituidas.

7.2. Materiales y Metodología

Se utilizaron el HiNa y HiH descriptos en el capítulo 2. Se utilizó Bencidamina HCl (Be-Parafarm, Bs. As., Arg.) de calidad farmacopea para la preparación de los complejos iónicos Hi-Be. Todos los reactivos fueron de calidad pro análisis. Sucrosa (Sigma-Aldrich, USA) fue utilizada para ajustar la Osmolaridad. Se utilizó agua deionizada para la realización de los ensayos.

7.2.1. Metodología de preparación de los complejos

La metodología llevada a cabo para la preparación de las dispersiones de los complejos Hi-Be₁₀₀ se describió en el capítulo 3. Para los ensayos *in-vitro*, se ajustó el pH de las mismas mediante el agregado gota a gota de NaOH hasta alcanzar un valor cercano a la neutralidad.

Paralelamente se elaboró un lote de frascos ampollas conteniendo una formulación a partir de los complejos Hi-Be₁₀₀. A los mismos se les ajustó el pH y la Osmolaridad con el agregado gota a gota de NaOH y Sucrosa respectivamente para obtener así un valor de pH y Osmolaridad cercano al fisiológico. Las formulaciones de los complejos iónicos en estado sólido se obtuvieron por liofilización de las dispersiones PE-F bajo vacío de 1×10^{-3} mBar

previo congelamiento con aire líquido. Antes de ser liofilizados, las formulaciones fueron esterilizadas en envase final con un filtro de membrana (Millipore®) con un poro de 0,2 μm . Este procedimiento se realizó en una cabina de seguridad biológica tipo II.

7.2.2. Mediciones de pH y Osmolaridad

Los valores de pH de las dispersiones al Hi-F se registraron de acuerdo al capítulo 2.

La metodología llevada a cabo para la medición de la Osmolaridad de las formulaciones se detalló en el capítulo 7.

7.2.3. Mediciones reológicas

Las propiedades reológicas de los complejos Hi-Be se determinaron utilizando la metodología descrita en el capítulo 2. La viscosidad se obtuvo del cociente entre el valor del segmento a velocidad constante y la velocidad de deslizamiento.

7.2.4. Liberación *in vitro* de Be desde los complejos Hi-Be

Para llevar a cabo los estudios de liberación *in-vitro* de la Be desde las dispersiones Hi-Be₁₀₀ se prepararon diferentes series al 0.5 % de Hi. La metodología y el equipamiento utilizados para realizar este ensayo fueron previamente descritos en capítulos anteriores.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Liberación *in vitro* de Be desde los complejos Hi-Be

La figura 7.2 muestra la liberación lenta de Be desde los complejos iónicos. Los resultados aquí observados están en línea con los obtenidos en los ensayos de liberación de F modelo desde los sistemas Hi-F detallados en el capítulo 4. Los sistemas Hi-Be se comportan como un reservorio del F, y lo liberan lentamente a partir de los complejos PE-F. El control en la liberación se mantiene a pesar de la presencia de una sal neutra, lo que revela la alta afinidad del F por los grupos carboxílicos de Hi.

7- Evaluación de los complejos Hi-Be en el tratamiento de la osteoartritis

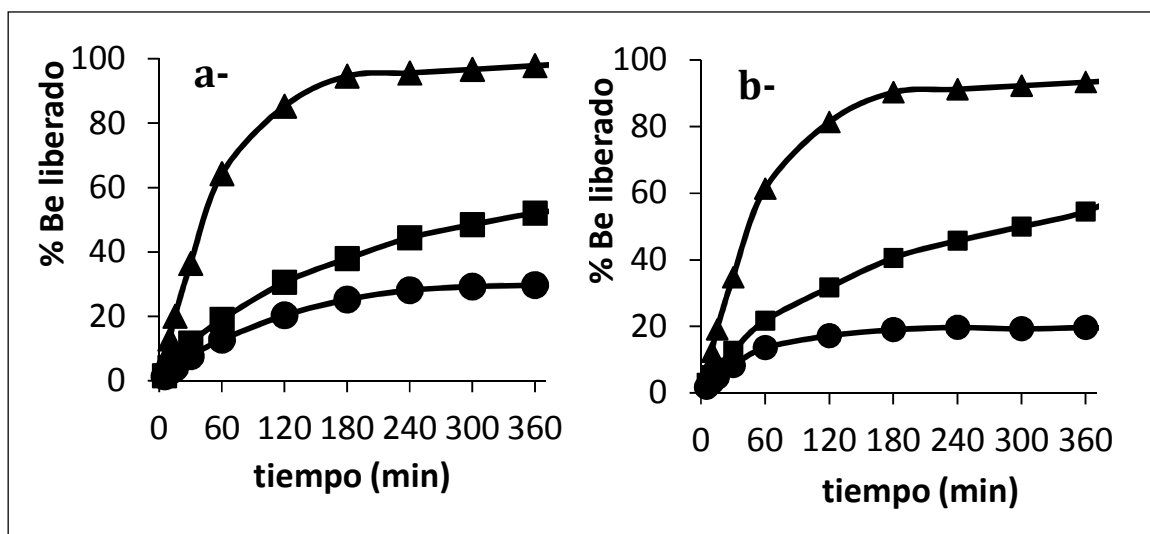


Figura 7.2: Perfiles de liberación de Be desde dispersiones a- HiNa-Be₁₀₀ y b- HiH- Be₁₀₀, donde (▲) Solución de Be referencia; (■) Complejo Hi-Be hacia NaCl 0.9% p/v y (●) Complejo Hi-Be hacia agua.

7.3.2. Obtención de la formulación final Hi-Be

Una vez realizada la caracterización de la cinética de liberación del complejo Hi-Be, nos propusimos llevar a cabo una formulación final que reuniera las propiedades sugeridas para ser utilizado en medicina veterinaria o humana en el tratamiento de la OA.

Para esta patología, como se dijo anteriormente, es necesario administrar compuestos que, debido a sus características viscoelásticas, promuevan la lubricación y el relleno necesario en la articulación (viscosuplementación articular). Por este mismo motivo, en esta sección del capítulo nos concentraremos en la elaboración de la formulación utilizando HiNa como PE portador de Be, debido a que el HiH carece de las propiedades viscoelásticas del PE de partida.

Se obtuvo la formulación de complejo HiNa-Be₁₀₀ en dispersión acuosa con una concentración del PE del 1% p/v. Cada frasco vial contiene 2 dosis de 2 mL cada una, este volumen es bien tolerado por cualquier articulación pequeña. La dosis contiene exactamente 15 mg de Be y 20 mg de HiNa. A una muestra representativa del lote formulado, se le determinaron los parámetros fisicoquímicos y aquellos requeridos por cualquier formulación que fuera a ser administrada por vía inyectable. La siguiente tabla (tabla 7.1) resume los valores obtenidos:

Tabla 7.1: Principales características fisicoquímicas y farmacéuticos de la formulación HiNa-Be.

Propiedad	Valor
Concentración del PE	1 % p/v
Concentración de Be	0,75 % p/v
pH	6,50 ± 0,05
Viscosidad (η)	(301 ± 10) mPa.s
Osmolaridad	(278 ± 4) mOsm/L
Aspecto	Dispersión translúcida.

7.3.2.1. Estabilidad de la formulación final Hi-Be

Una vez obtenido el polvo liofilizado y esterilizado en envase final, se evaluó la estabilidad de las formulaciones al ser almacenadas durante 30 días a temperatura ambiente. Posteriormente, las formulaciones fueron reconstituidas con agua para inyectables evaluando la eficacia de este proceso, además se le determinaron los parámetros fisicoquímicos y farmacéuticos correspondientes, a saber: aspecto, pH, Osmolaridad y variación de contenido. Los valores obtenidos de los ensayos fisicoquímicos y farmacéuticos tras la reconstitución de la formulación se resumen en la siguiente tabla (tabla 7.2):

Tabla 7.2: Principales características fisicoquímicas y organolépticas de la formulación HiNa-Be tras su reconstitución luego de un mes de estacionamiento.

Propiedad	Valor	
	Inicial	Final
Concentración del PE	1 % p/v	No determinado
Concentración de Be (% p/v)	0,75 ± 0,04	0,72 ± 0,08
pH	6,50 ± 0,05	6,55 ± 0,05
Viscosidad (η) mPa.s	301 ± 10	295 ± 13
Osmolaridad (mOsm/L)	278 ± 4	281 ± 7
Aspecto	Translúcido.	Translúcido.

7- Evaluación de los complejos Hi-Be en el tratamiento de la osteoartritis

Previo al análisis de los resultados observados en la tabla, es importante destacar que las formulaciones fueron fácilmente redispersadas con agua para inyectables. El mismo proceso se realizó suavemente intentando no incorporar burbujas a la dispersión. Se observó una hidratación completa del HiNa y una dispersión translúcida dentro de los 5 minutos de agitación. El otro aspecto importante a destacar es que tanto los valores de concentración de Be, así como también los valores de pH y Osmolaridad de las formulaciones, antes y después del ensayo de estabilidad, arrojan resultados similares, lo cual nos da una idea de la estabilidad de la formulación.

Finalmente, caracterizadas las formulaciones a nivel fisicoquímico, farmacotécnico y farmacéutico, se elaboró un nuevo lote el cual se encuentra en proceso de evaluación en un modelo animal de OA, en animales de gran tamaño (equinos y/o vacunos). El mismo ensayo se realizará en el laboratorio encabezado por el Dr. Sanchez Bruni, Sergio de la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Tandil, al cual se le proveyó el lote de las formulaciones liofilizadas y estériles en envase herméticamente cerrado. Además se le proveyó un protocolo para el manejo de la formulación que comprende las tareas del traslado, reconstitución, administración, posología y almacenamiento de las mismas.

7.4. Conclusiones

- La cinética de disociación de los pares iónicos es rápida, y provee proporciones de F desde el entorno del PE hacia el seno de la dispersión a medida que el mismo difunde hacia el compartimento receptor. La velocidad de liberación puede ser incrementada por la difusión de sales neutras, como NaCl, hacia el interior del hidrogel que perturben el equilibrio de formación del par iónico.
- Se obtuvo una formulación del complejo iónico Hi-Be que reúne las características fisicoquímicas, farmacéuticas y farmacotécnicas apropiadas para ser utilizado en medicina humana y veterinaria.
- El proceso de liofilización resultó ser una técnica eficiente en el proceso de obtención de la formulación sólida.

- La formulación resultante fue fácilmente redispersable y demostró ser estable en el tiempo evaluado.
- Se elaboró un lote de formulaciones que serán evaluados en modelos animales de OA.

Capítulo 8

*Conclusiones
generales y
proyecciones*



8.1. Conclusiones generales

Los estudios realizados en este trabajo de tesis contribuyen a ampliar y profundizar los conocimientos actuales acerca de la utilización de PE como portadores de F. En particular, se revelaron nuevas potencialidades del uso del Hi como material portador, no estudiados previamente. Es importante destacar que los sistemas Hi-F se pueden suministrar por las diferentes vías de administración, incluyendo las vías inyectables, lo que constituye una limitación para otros sistemas similares. Por otra parte, la ventaja que presentan los materiales desarrollados en esta tesis se vinculan a la simplicidad de su metodología de obtención y la posibilidad de desarrollar formulaciones. Las mismas pueden ser obtenidas mediante tecnologías de uso habitual en la industria farmacéutica, lo que resulta conveniente desde una perspectiva económica.

Los estudios realizados permitieron identificar y caracterizar la naturaleza y magnitud de las interacciones moleculares que ocurren entre los grupos carboxílicos del Hi y los grupos amino de los F modelo, lo que permitió visualizar potenciales aplicaciones de los sistemas Hi-F. La caracterización fisicoquímica de los sistemas Hi-F tanto en dispersión como en estado sólido revelaron que:

- Los complejos Hi-F, obtenidos a partir de HiNa o HiH, son sistemas fácilmente dispersables, generando dispersiones translúcidas, estables que exhiben potenciales electrocinéticos negativos.
- Una alta proporción de los F con capacidad de interactuar con Hi se encuentra reversiblemente unido al PE formando pares iónicos ($[RCOO^+FH]$), por lo que estos sistemas actúan como un reservorio de F.
- El equilibrio de formación de pares iónicos, no se ve modificado por la adición de no electrolitos, pero es parcialmente desplazado por la adición de sales neutras.
- Las dispersiones Hi-F tienen la capacidad de modular la liberación del F hacia entornos acuosos. La velocidad de liberación en agua es lenta lo que se vincula al alto grado de condensación iónica y puede ser incrementada por la adición de sales neutras.

- En el estado sólido, el estudio estructural muestra la existencia de una interacción iónica entre los grupos carboxílicos del Hi y los grupos amino de los F modelo. Los materiales obtenidos son sólidos amorfos que contienen al fármaco molecularmente disperso.

Los resultados obtenidos en las secciones precedentes permitieron desarrollar estudios focalizados en aplicaciones farmacoterapéuticas de F seleccionados.

- Los sistemas Hi-Dx exhiben una alta afinidad PE-F y la capacidad de modular la liberación de Dx. Los ensayos de este sistema frente a cultivos de líneas celulares tumorales y fisiológicas, monitoreados por tres metodologías diferentes indicaron una mayor selectividad y eficacia de los complejos Hi-Dx frente a las células tumorales respecto a las no tumorales. Se verificó que este fenómeno estaba gobernado por la sobreexpresión de receptores específicos del Hi en células tumorales. Además, los complejos ternarios Hi-Dx-Vr produjeron en las células tumorales una mayor concentración intracelular de Dx en relación al complejo Hi-Dx, lo que puede vincularse a la inhibición del proceso de eflujo por acción de Vr.
- Los sistemas HiH-TM y HiNa-TM exhiben una alta afinidad PE-F y la capacidad de modular la liberación de TM en celdas bicompartimentales. En experimentos *in-vivo* el complejo HiNa-TM exhibió una mayor eficacia en la disminución de la PIO en conejos normotensos aumentando la intensidad y duración del efecto en relación tanto a HiH-TM como a la formulación comercial lo que se asocia tanto a sus propiedades bioadhesivas como a su capacidad de modular la liberación del fármaco.
- Los complejos Hi-Be seleccionados para ensayarlos en el tratamiento de la OA tienen la capacidad de modular la liberación de Be lo que se vincula al alto grado de condensación iónica PE-F. Se obtuvo y caracterizó una formulación sólida estéril del complejo HiNa-Be que reúne las características fisicoquímicas, farmacéuticas y farmacotécnicas apropiadas para ser utilizada por vía inyectable intraarticular en

medicina humana o veterinaria. Esta formulación final con los atributos farmacéuticos necesarios será apropiadamente evaluada en ensayos clínicos.

8.2. Proyecciones

Es importante destacar que las metodologías utilizadas y los conocimientos generados en este trabajo de investigación podrían ser aplicados al estudio de nuevos sistemas que contengan a Hi como portador de otras moléculas que contengan grupos ionizables básicos.

En efecto, este trabajo de tesis abre nuevas perspectivas de investigación, no solo direccionadas a la aplicación de los sistemas en situaciones terapéuticas específicas sino también en relación a evaluar y documentar potenciales propiedades del polímero aún no descritas.

Todos los constituyentes de los sistemas estudiados, el portador Hi y los F seleccionados, son de uso terapéutico aprobado y no son sometidos a modificaciones estructurales mediante la interacción reversible de formación de los complejos. En consecuencia, los requerimientos necesarios para introducirlos en el desarrollo de ensayos clínicos pueden ser fácilmente satisfechos.

En lo que respecta a las proyecciones específicas de los sistemas portadores desarrollados con los F seleccionados con un criterio farmacoterapéutico, se destacan:

a) La evaluación de la eficacia de Hi-Dx en modelos de tumores en animales tanto para su administración intratumoral como sistémica, de manera tal de evaluar no solamente su eficacia en la remoción del tumor sino también su farmacocinética.

Así mismo, es interesante evaluar la proporción óptima entre Dx y Vr en el complejo ternario Hi-Dx-Vr de manera tal de optimizar el eventual aumento de eficacia tanto en cultivos celulares como en animales de experimentación.

Es de esperar que el análisis interdisciplinario de estos resultados con investigadores oncológicos permita definir aplicaciones específicas y evaluar la posibilidad de realizar ensayos clínicos.

b) En lo que respecta al sistema Hi-Be, los resultados que aporte el estudio *in-vivo* en animales de experimentación, que está en realización en la Universidad Nacional de Tandil, abrirían una interesante perspectiva de transferencia de *know how* a la industria farmacéutica.

c) Evaluar la capacidad farmacodinámica de los complejos Hi-TM en conejos que presenten hipertensión ocular. A su vez, sería importante incorporar estos sistemas en ensayos clínicos. Por último sería interesante evaluar el sistema Hi-F seleccionando F para abordar distintas patologías oculares para su tratamiento tópico.

Referencia Bibliográfica



A

Abate M., Schiavone C., Salini V. The Use of Hyaluronic Acid after Tendon Surgery and in Tendinopathies. *BioMed Research International*. 2014, Article ID 783632, 6 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/783632>.

Akie H., Sato H., Okamachi A. Novel hyaluronic acid-methotrexate conjugates for osteoarthritis treatment. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009, 17, 4647-4656.

Alfabeta SACIFyS. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Actualizada: 01/01/2015. Disponible online en: <http://www.alfabeta.net/home>.

Altman R.D., Akermark C., Beaulieu A.D., Schnitzer T., Durolane International Study Group. Efficacy and safety of a single intraarticular injection of non-animal stabilized hyaluronic acid (NASHA) in patients with osteoarthritis of the knee. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004; 12:642-9.

Altman R.D., Rosen J.E., Bloch D.A., Hatoum H.T., Korner P. A doubleblind, randomized, saline-controlled study of the efficacy and safety of EUFLEXXA for treatment of painful osteoarthritis of the knee, with an open-label safety extension (the Flexx trial). *Semin Arthritis Rheum*. 2009; 39:1-9.

Andrey V., Dobrynin M.R.. Theory of polyelectrolytes in solutions and at surfaces. *Prog. Polym. Sci*. 2005, 30: 1049-118.

Ansel H.C., Allen L.V., Popovich N.G.. Disperse Systems. En: Troy D. Ansel's *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 9° ed. 2011. Baltimore: Williams & Williams. Pág. 376-430.

Ardusso M.S., Manzo R.H., Jimenez-Kairuz A.F.. Comparative study of three structurally related acid polyelectrolytes as carriers of basic drugs: carbomer, eudragit L- 100 and S-100. *Supramol Chem*. 2010, 5:289-296

Arjun S., Ritika S., Faraz J.. Sustained release systems: A review. *Int. Res Jour. Pharm*. 2012, 3 (9).

Arpicco S., Milla P., Stella B, Dosio F.. Hyaluronic Acid conjugates as vectors for the active targeting of drugs, genes and nanocomposites in cancer treatment. *Molecules* 2014, 19, 3193-3230.

B

Batool H., Setih A., Ijaz H., Rashid A., Ahmad M., Chowdhary F., Hanif M.. Design And In-Vitro Evaluation Of Sustained Release Matrix Tablets Of Eperisone Hydrochloride Using Carbopol 934 P. *Int Jour Pharm Int Lif Sci*. 2014, 2, 1, 28-41.

Battistini F.D.; Olivera M.E.; Manzo R.H.. Equilibrium and Release Properties of Hyaluronic acid-Drug complexes.. *European Journal of Pharmaceutical Science*. 2013, 49, 588–594.

Bhise K., Shaikh S., Bora D. Taste mask, design and evaluation of an oral formulation using ion exchange resin as drug carrier. *AAPS PharmSciTech*. 2008; 9(2):557-62.

Bilerova H.. Reology of hyaluronan solutions. Tesis doctoral. 2012. Universidad de Brno, Republica Checa.

Billany M.. *Pharmaceutics: The science of dosage form design. Suspensions and emulsions*. Churchill Livingstone. London. Ed: Aulton ME, 2002, 340-42.

Bockris J.O., Reddy K.N.. Ion transport solutions. En: *Modern electrochemistry 1: Ionics*. 2° ed. 1998. Cap 4. Plenum Press. Nueva York. 361-599.

Boddu H.S, Gupta H., Patel S.. Drug Delivery to the Back of the Eye Following Topical Administration: An Update on Research and Patenting Activity. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 2014, 8, 27-36.

Borrás-Verdera A., Calcedo-Bernal V., Ojeda-Levenfeld J., Clavel-Sainz C.. Efficacy and safety of a single intra-articular injection of 2% more hyaluronic acid mannitol injection in knee arthrosis over a 6-month period. *Rev Esp Cir Ortop Traumatol*. 2012;56(4):274-280.

Bourguignon L.Y., Shiina M., Li J.J.. Hyaluronan-CD44 interaction promotes oncogenic signaling, microRNA functions, chemoresistance, and radiation resistance in cancer stem cells leading to tumor progression. *Adv Cancer Res*. 2014; 123:255-75. doi: 10.1016/B978-0-12-800092-2.00010-1.

Brown C.K., Friedel H.D., Barker A.R. FIP. AAPS Joint Workshop Report: Dissolution/In Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms. *Indian J Pharm Sci*. 2011; 73(3): 338–353.

Brown M.B., Jones S.A.. Hyaluronic acid: A unique topical vehicle for localized delivery of drugs to the skin. *JEDAV*. 2005, 19, 308-318.

Brunton L.L., Lazo J.S.; Parcker K.. Bases farmacológicas de la terapeutica- Goodman & Gilman. 2007. Undecima edicion.

Bucolo C., Spadaro A., Mangiafico S.. Pharmacological Evaluation of a New Timolol/Pilocarpine Formulation. *Ophthalmic Res*. 1998; 30:101-106.

Budhiana A., Siegelb S., Wineya K.. Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *Int J Pharm*. 2008, 346:151-159.

C

Cametti C.. Does Electrical Conductivity of Linear Polyelectrolytes in Aqueous Solutions Follow the Dynamic Scaling Laws? A Critical Review and a Summary of the Key Relations. *Polymers* 2014, 6(4), 1207-1231; doi:10.3390/polym6041207.

Caramella C.M., Rossi S., Ferrari F., Bonferoni C.M., Sandri G.. Mucoadhesive and thermogelling systems for vaginal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2015.02.001>.

Chen S., Li L., Zhao C., Zheng J.. Surface hydration: Principles and applications toward low-fouling/nonfouling Biomaterials. *Polymer* 2010, 51, 5283-5293.

Chevalier X., Jerosch J., Goupille P., Van Dijk N., Luyten F.P., Scott D.L.. Single, intra-articular treatment with 6 ml hylan G-F 20 in patients with symptomatic primary steoarthritis of the knee: a randomised, multicentre, double-blind, placebo controlled trial. *Ann Rheum Dis*. 2010; 69: 113-9.

Choi K.Y., Saravanakumar G., Park J.H., Park K.. Hyaluronic acid-based nanocarriers for intracellular targeting: interfacial interactions with proteins in cáncer. *Colloid Surface B*. 2012, 99, 82-94.

Cholkar K., Trinh H.M., Pal D., Mitra A.K.. Discovery of novel inhibitors for the treatment of glaucoma. *Expert Opin Drug Discov*. 2015; 10(3): 293-313.

Cholkar K., Patel S.P., Vadlapudi A.D., Mitra A.K.. Novel strategies for anterior segment ocular drug delivery. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2013; 29(2): 106-23.

Chytil M., Pekar M.. Rheological Studies of Hyaluronan/Modified Hyaluronan Mixtures and the Structure of Hyaluronic Solutions. Annual transactions of the nordic reology society. 2007.15.

Council of Europe. European Pharmacopoeia 6th edition. 2007. European Directorate for the Quality of Medicine and Healthcare.

D

Dan H., Yang Z., Chou K.C.. Interactions of Polyelectrolytes with Water and Ions at Air/Water Interfaces Studied by Phase-Sensitive Sum Frequency Generation Vibrational Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* 2013, 117, 15698–15703.

Dave V., Paliwal S., Yadav S., Sharma S.. Effect of In Vitro Transcorneal Approach of Aceclofenac Eye Drops through Excised Goat, Sheep, and Buffalo Corneas. *Sci World J.* 2015; 432376.

De Robertis S., Bonferoni M.C., Elviri L., Sandri G., Caramella C., Bettini R.. Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2014, 12(3).

Della Valle F., Romeo A., Lorenzi S.; inventors. Fidia S.p.a titular. Salts and mixtures of hyaluronic acid with pharmaceutical active substances, pharmaceutical composition containing the same and methods for administration of such composition. 1995. US patent 5442053.

Dicker K.T., Gurski L.A., Pradhan-Bhatt S., Witt R.L., Farach-Carson M.C., Xinqiao J.. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biom.* 2014. 10, 1558–1570.

Doherty M.M., Hughes P.J., Kim S.R., Mainwaring D.E., Charman W.N.. Effect of lyophilization on the physical characteristics of medium molecular mass hyaluronates. *International Journal of Pharmaceutics.* 1994, 111, 205-211.

Doherty M.M., Hughes P.J., Fanzca F.A., Chrman S.A., Brock K.V., Korszniak N.V., Charman W.N. Biphasic drug absorption from epidural space of the dog may limit the utility of slow release medium molecular weight hyaluronic acid– lidocaine ionic complex formulation. *Anesth. Analg.* 1996, 83, 1244–1250.

Doherty MM., Hughes P.J., Korszniak N.V. Prolongation of lidocaine-induced epidural anesthesia by medium molecular weight hyaluronic acid formulations: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies in the rabbit. *Anesth. Analg.* 1995, 80, 740–746.

Dong J., Jiang D., Wang Z., Wu G., Miao L., Huang L.. Intra-articular delivery of liposomal celecoxib–hyaluronate combination for the treatment of osteoarthritis in rabbit model. *Int J Pharm.* 2013, 441, 285– 290.

E

Eliaz R.E., Szoka F.C. Liposome-encapsulated doxorubicin targeted to CD44: a strategy to kill CD44-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 2001, 61, 2592– 2601.

Esteban S., Manzo R.H., Alovero F.. Azitromicin loaded in hydrogen of Carbomer. Chemical stability and delivery properties. *Int J Pharm.* 2009, 366: 53-57.

F

Fakhari A., Berkland C.. Applications and Emerging Trends of Hyaluronic Acid in Tissue Engineering, as a Dermal Filler, and in Osteoarthritis Treatment. *Acta Biomater.* 2013, 9(7): 7081–7092.

FDA. FDA Guidance for Industry: SUPAC-SS Nonsterile semisolid dosage forms. Scale-Up and Post Approval Changes: Chemistry, manufacturing, and controls; in vitro release testing and in vivo bioequivalence documentation. 1997.

Flórez J.. Quimioterapia antineoplásica II. Agentes alquilantes. Antibióticos. Agentes varios. *En Farmacología Humana.* 2008, 62, 1039- 1058.

Food and Drug Administration (FDA) U. S., Department of Health and Human Services. Disponible on-line: <http://www.fda.gov/Drugs/default.htm>. Revised: 05/05/2014.

Food and Drug Administration (FDA), U. S., Department of Health and Human Services, “Pharmaceutical cgmgs for the 21st century. A risk based approach”, FDA, Rockville, 2004.

Frampton J.E. Hylan G-F 20 single-injection formulation. *Drugs Aging.* 2010; 27:77-85.

Fu Y., Kao W.J.. Drug release kinetics and transport mechanisms of non-degradable and degradable polymeric delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2010, 7(4): 429-444.

Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments (PILAS). Russell & Burch House 96-98 North Sherwood Street Nottingham, NG1 4EE, UK. Laboratory animal science and the use of scientific knowledge. Disponible en: <http://pilas.org.uk/>

G

Gajra B., Pandya S.S., Singh S., Rabari H.A.. Mucoadhesive Hydrogel Films of Econazole Nitrate: Formulation and Optimization Using Factorial Design. *J Drug Deliv.* 2014, Article ID 305863, 14 pages.

García-Posadas L., Contreras-Ruiz L., Arranz-Valsero I., López-García A., Calonge M., Diebold Y.. CD44 and RHAMM hyaluronan receptors in human ocular surface inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014, 252(8): 1289-95.

Garg H.G. and Hales C.A. (editors). *Chemistry and Biology of Hyaluronan.* 2004 Elsevier Ltd. Solution Properties of Hyaluronan.

Garg R., Girotra P., Singh S.K., Kumar D., Chakarvarti S. K.. Evaluation of Track Etch Membrane as a Surrogate for Ex-vivo Drug Permeation Studies. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research.* 2014; 6(3): 189-192.

Ghalaei P.M., Varshosaz J., Aliabadi H.S.. Evaluating Cytotoxicity of Hyaluronate Targeted Solid Lipid Nanoparticles of Etoposide on SK-OV-3 Cells. *Journal of Drug Delivery.* 2014, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/746325>

Gomis A., Miralles A., Schmidt R.F., Belmonte C.. Nociceptive nerve activity in an experimental model of knee joint osteoarthritis of the guinea pig: Effect of intra-articular hyaluronan application. *Pain.* 2007, 130 126-136.

Graham C.H.. Department of Anatomy & Cell Biology, Queen's University at Kingston, Kingston, Ontario, Canada. Actualizado en: 12/2013. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM683867>.

Grelet E.. Hard-Rod Behavior in Dense Mesophases of Semiflexible and Rigid Charged Viruses. *Physical Rev.* 2014, 4, 21-53.

Gupta S., Vyas S.P.. Carbopol/Chitosan Based pH Triggered In Situ Gelling System for Ocular Delivery of Timolol Maleate. *Sci Pharm.* 2010 Dec; 78(4): 959-976.

Guzman M.L.. Desarrollo y Evaluación biofarmacéutica de nuevos sistemas de liberación modificada basados en polielectrolitos catiónicos como portadores de fármacos. Tesis doctoral. 2013. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

Guzmán M.L., Manzo R.H., Olivera M.E. Eudragit E 100 as a carrier of drugs. The remarkable affinity of phosphate ester group for the dimethylamine groups. *Mol. Pharm.* 2012, 49 (9), 2424–33.

H

Hahn S.K., Kim S.J., Kim M.J., Kim D.H., Lee Y.P.. Development of a novel sustained release formulation of recombinant human growth hormone using sodium hyaluronate microparticles. *J. Control Release.* 2005, 104, 323–35.

Hamman J.H.. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Mar. Drugs.* 2010, 8, 1305-22; doi:10.3390/md8041305.

Hascall V.C., Lauren T.C. Hyaluronan: Structure and physical properties. *Glycoforum, Science of Hyaluronan.* 1997. Disponible on line en: <http://glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>.

Haward S.J., Jaishankar A., Oliveira M.S., Alves M.A., Mc Kinley G.H.. Extensional flow of hyaluronic acid solutions in an optimized microfluidic cross-slot device. *Biomicrofluidics.* 2013, 30; 7 (4):044108. doi: 10.1063/1.4816708.

Haxaire K., Marechal Y., Milas M., Rinaudo M.. Hydration of Polysaccharide Hyaluronan Observed by IR Spectrometry. I. Preliminary Experiments and Band Assignments. *Biopolymers (Biospectroscopy).* 2003, 72, 10–20.

Haygood C.L., Rebecca C., Arend J., Straughn M., Buchsbaum D.J.. Ovarian cancer stem cells: Can targeted therapy lead to improved progression-free survival?. *World J Stem Cells.* 2014; 6(4): 441–447.

Higuchi T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *J Pharm Sci.* 1963, 52: 1145–9.

Hirakura T., Yasugi K., Nemoto T., Sato M., Shimoboji T., Aso Y., Morimoto N., Akiyoshi K. Hybrid hyaluronan hydrogel encapsulating nanogel as a protein nanocarrier: new system

for sustained delivery of protein with a chaperone-like function. *J. Control. Release.* 2010, 142, 483–9.

Holubova L., Korecka L., Podzimek S., Moravcova V., Rotkova J., Ehlova T., Velebny V., Bilkova Z.. Enhanced multiparametric hyaluronan degradation for production of molar-mass-defined fragments. *Carbohydr Polym.* 2014 Nov 4; 112: 271-6.

Huang Z., Zhao C., Radi A.. Characterization of hyaluronan, hyaluronidase PH20, and HA synthase HAS2 in inflammation and cancer. *Inflammation & Cell Signaling* 2014; 1: e306. doi: 10.14800/ics.306.

Hussaini S.S., Qhattal T.E., Liu X.. Characterization of CD44-Mediated Cancer Cell Uptake and Intracellular Distribution of Hyaluronan-Grafted Liposomes. *Mol Pharm.* 2011, 8(4): 1233–1246. doi:10.1021/mp2000428.

Huttunen K.M., Raunio H., Rautio J.. Prodrugs—from Serendipity to Rational Design. *Pharmacological Reviews.* 2011, vol. 63 no. 3750-71.

I

Ibrahim M.M., Abd-Elgawad H., Abd-Elazeem Soliman O., Jablonski M.M.. Natural bioadhesive biodegradable nanoparticles-based topical ophthalmic formulations for sustained celecoxib release: In vitro Study. *Jour. Pharm. Tech & Drug Res.* 2013, 2:7. DOI : <http://dx.doi.org/10.7243/2050-120X-2-7>.

Ikegami-Kawai M. y Takahashi T. Microanalysis of hyaluronan oligosaccharides by polyacrylamide gel electrophoresis and its application to assay of hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry* 311 (2002) 157–165.

International Society for Pharmaceutical Engineering, “Product quality lifecycle implementation (pqli), Part 1: Product realization using Quality by Design (QbD): Concepts and principles”, ispe, Tampa, Florida, 2011.

Isaac T. S., Walker G.C.. Signature of hydrophobic hydration in a single polymer. *PNAS* 2011, vol 108, no. 40. 16527–16532. Doi: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1105450108.

Islam S.M., Choi H.N., Choi S.W., Lee H.J.. Polyelectrolyte-mediated hierarchical mesoporous calcium silicates: a platform for drug delivery carrier with ultrahigh loading capacity and controlled release behaviour. *J. Mater. Chem.* 2015, 3, 1001-9.

J

Jimenez Kairuz A.F., Ramirez Rigo M.V., Quinteros D., Vilches A.P., Olivera M.E., Alovero F., Manzo R.H. Recientes contribuciones sobre la utilizacion de Polielectrolitos en sistemas portadores de F. Parte I: Dispersiones acuosas. Revista farmaceutica de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquimica. 2008. 150, pg. 11-25.

Jimenez Kairuz A.F., Ramirez Rigo V., Bermudez J., Allemandi D., Manzo, R.H. Recientes contribuciones sobre la utilizacion de Polielectrolitos en sistemas portadores de F. Parte II: Materiales solidos. Revista farmaceutica de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquimica. 2008. 150, pg. 6-21.

Jimenez-Kairuz A.F., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Mechanism of Lidocaine Release From Carbomer-Lidocaine Hydrogels. Jour. Phar. Sci. 2001. 91:1

Jimenez-Kairuz A.F., Llabot J.M., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Swellable polyelectrolytes matrices (SDPM): Characterization and delivery properties. Int J Pharm. 2005, 288: 87-99.

Jimenez-Kairuz A.F., Allemandi D.A., Manzo R.H.. A strategy to improve the chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. Int. J. Pharm. 2004, 269: 149-56.

Jimenez-Kairuz A.F., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Equilibrium properties and mechanism of kinetic release of metoclopramide from carbomer hydrogels. Int J Pharm. 2003, 250:129-136.

Jimenez-Kairuz A.F., Allemandi D.A., Manzo R.H.. The improvement of aqueous chemical stability of a model basic drug by ion pairing with acid groups of polyelectrolytes. Int J Pharm. 2004, 269:149-156.

Jimenez-Kairuz A.F.. Investigación y desarrollo de nuevos materiales con utilidad en tecnología farmacéutica para el diseño de sistemas terapéuticos. Tesis doctoral. 2004. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Jimenez-Kairuz A.F., Alovero F., Ramirez Rigo M.V., Olivera M.E., Manzo R.H.. Thermodynamic and Rheological Properties of Polyelectrolyte Systems. 2014. In Polyelectrolyte. Springer International Publishing Switzerland.

K

Kaur G., Verma N.. Nature curing cancer – review on structural modification studies with natural active compounds having anti-tumor efficiency. *Biotechnology Reports*. 2015, 6, 64–78.

Khaled B., Abdelbaki B.. Rheological and electrokinetic properties of CMC -water dispersions in the presence of salts. *International Journal of Physical Sciences*. 2012, 7(11), pp. 1790 - 1798.

Knudson W., Peterson R.. The hyaluronan receptor: CD44. In: Garg, H.G., Hales, C.A. (Eds.), *Chemistry and Biology of Hyaluronan*, Boston, USA. 2004, pp. 83–123.

Kobayashi Y., Banno K., Shimizu T., Ueki A., Tsuji K., Masuda K., Kisu I., Nomura H., Tominaga E., Nagano O., Saya H., Aoki D.. Gene expression profile of a newly established choriocarcinoma cell line, iC3-1, compared to existing choriocarcinoma cell lines and normal placenta. *Placenta*. 2013, 34 110e118.

Krause W.E., Bellomo E.G.. Rheology of Sodium Hyaluronate under Physiological Conditions. *Biomacromolecules*. 2001, 2, 65-69.

L

Lago-Mendoza G. Cordones umbilicales residuales, la nueva fuente de obtención de ácido hialurónico y sus fracciones . Tesis doctoral en ciencias farmacéuticas. La Habana, 2007. Disponible en: http://tesis.repo.sld.cu/186/1/Tesis_de_Lago_Guillermo.pdf.

Laude A., Tan L.E., Wilson C.G., Lascaratos G., Elashry M., Aslam T., Patton N., Dhillon B.. Intravitreal therapy for neovascular age-related macular degeneration and inter-individual variations in vitreous pharmacokinetics. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010, 29; 466 - 475.

Lawrence XY., Amidon G., Khan M.A., Hoag S.W., Polli J, Raju G. K., Woodcock J.. Understanding Pharmaceutical Quality by Design. *The AAPS Journal*. 2014, 16, 4 pp 771-783.

Lee F., Chung J.E., Kurisawa M.. An injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogel system for protein delivery. *J. Control. Release*. 2009, 134, 186–193.

Lemmnitzer K., Schiller J., Becher J., Möller S., Schnabelrauch M.. Improvement of the Digestibility of Sulfated Hyaluronans by Bovine Testicular Hyaluronidase: A UV Spectroscopic and Mass Spectrometric Study. *BioMed Research International*. 2014, Article ID 986594.

Lin T., Gong L.. Sodium hyaluronate eye drops treatment for superficial corneal abrasion caused by mechanical damage: a randomized clinical trial in the People's Republic of China. *Drug Des Devel Ther*. 2015; 9: 687–694.

Lopes L.B.. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics*. 2014 Feb 28; 6(1):52-77.

Luana T., Wua L., Zhanga H., Wang Y. A study on the nature of intermolecular links in the cryotropic weak gels of Hyaluronan. *Carbohydrate Polymers*. 2012. 87, 2076–85.

Ludwig A.. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2005. 57, 1595– 1639.

Lukyanov A.N., Elbayoumi T.A., Chakilam A.R., Torchilin V.P.. Tumortargeted liposomes: doxorubicin-loaded long-circulating liposomes Modified with anti-cancer antibody. *J. Control. Release*. 2004. 100, 135–144.

Luna E., Allemandi D.A., Manzo R.H.. The use of differential scanning potentiometry in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Sci*. 1991, 80, 80–84.

Lundsgaard C., Dufour N., Fallentin E., Winkel P., Gluud C.. Intra-articular sodium hyaluronate 2 mL versus physiological saline 20 mL versus physiological saline 2 mL for painful knee osteoarthritis: a randomized clinical trial. *Scand J Rheumatol*. 2008; 37:142-50.

Luo Y., Bernshaw N.J., Lu Z.R., Kopecek J., Prestwich G.D.. Targeted delivery of doxorubicin by HEMA copolymerhyaluronan bioconjugates. *Pharm. Res*. 2002, 19, 396–402.

Lyklema J.. Electrokinetics after Smoluchowski. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 2003, 222:5-14.

M

Marhaba R., Klingbeil P., Nuebel T., Nazarenko I., Buechler M.W., Zoeller M.. CD44 and EpCAM: cancer-initiating cell markers. *Curr. Mol. Med*. 2008, 8, 784–804.

Marjorie JR.. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry* (2011) 82, 38-43.

Marzioni D., Crescimanno C., Zaccheo D., Coppari R., Underhill C.B., Castellucci M.. Hyaluronate and CD44 expression patterns in the human placenta throughout pregnancy. *Eur. J. Histochem.* 2001, 45: 131-40.

Maytin E.V., Chung H.H., Seetharaman V.M.. Hyaluronan participates in the epidermal response to disruption of the permeability barrier in vivo. *Am.J.Pathol.* 2004. 165 (4) 1331-1341.

McDonald C., Hantel S., Strohmeier M.. A randomised, controlled study to compare the performance and safety of two sources of sodium hyaluronate given as a viscosupplement by intraarticular injection to patients with osteoarthritis of the knee. *J Clin Res.* 2000; 3: 41-50.

Mero A., Campisi M.. Hyaluronic Acid Bioconjugates for the Delivery of Bioactive Molecules. *Polymers* 2014, 6, 346-369.

Migliore A., Arana M.. Intraarticular use of hyaluronic acid in the treatment of osteoarthritis. *Clinical Interventions Aging.* 2008. 3(2) 365-69.

Mosmann T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983, 65(1-2):55-63.

N

Naor D., Nedvetzki S., Golan I., Melnik L., Faitelson Y.. CD44 in cancer. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2002, 39, 527-579.

Nerella A., Basava R.D., Aruna D.M.. Formulation, Optimization and In vitro Characterization of Letrozole Loaded Solid Lipid Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research* 2014; 6(3): 183-188.

Nikitovic D., Kouvidi K., Karamanos N.K., Tzanakakis G.N.. The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression. *BioMed Research International.* 2013, 929531.

Nordstrom B.L., Friedman D.S., Mozaffari E., Quigley H.A., Walker A.M.. Persistence and adherence with topical glaucoma therapy. *Am. J. Ophthalmol.* 2005, 140, 598.e1-598.e11.

Novakovic B., Gordo L., Wong N.C., Moffett A., Manuelpillai U., Craig J.M., Sharkey A., Saffery R.. Wide ranging DNA methylation differences of primary trophoblast cell populations and derived-cell lines: implications and opportunities for understanding trophoblast function. *Mol Hum Reprod.* 2011, 17(6): 344-353. doi:10.1093/molehr/gar005.

O

Oosawa-Manning F.. Polyelectrolytes. Editorial Marcel Dekker. New York, 1971.

Ozlem N., Ozak A., Yardimci Z., Nisbet C., Yarim M., Bayrak K.Y., Sirin S.. Evaluation of bee venom and hyaluronic acid in the intra-articular treatment of osteoarthritis in an experimental rabbit model. *Research in Veterinary Science*. 2012, 93, 488–493.

P

Palena M.C.. Sistemas micro- y nano- particulados de liberación modificada de fármacos basados en complejos Polielectrolito-Fármaco. Tesis doctoral. 2013. Facultad de Ciencias Químicas. UNC.

Palma S.D., Tartara L.I.. An efficient ternary complex of acetazolamide with Hp- β -cd and TEA for topical ocular administration *Journal of Controlled Release*. 2009, 138 pp 24-31.

Pandey S., Mishra A., Raval P., Patel H., Shah D.. Chitosan-pectin polyelectrolyte complex as a carrier for colon targeted drug delivery. *Jour You Pharm*. 2013. 5, 160–166.

Pavelka K., Trc T., Karpas K., Vitek P., Sedláčková M., Vlasáková V.. The efficacy and safety of diacerein in the treatment of painful osteoarthritis of the knee: a randomized, multicenter, double-blind, placebo-controlled study with primary end points at two months after the end of a three-month treatment period. *Arthritis Rheum*. 2007; 56: 4055-64.

Pelletier J.P., Martel-Pelletier J.. Therapeutic targets in osteoarthritis: from today to tomorrow with new imaging technology. *Ann Rheum Dis*. 2003; 62 Suppl. 2:ii79-82.

Pissis P., Apostolos K.. Hydration Studies in Polymer Hydrogels. *Jour Pol Sci. Polymer Physics*. 2013, 51, 159–175.

Q

Qhattal H.S., Liu X.. Characterization of CD44-mediated cancer cell uptake and intracellular distribution of hyaluronan-grafted liposomes. *Mol. Pharm*. 2011. 8, 1233–1246.

Qian Z.M., Li H., Sun H., Ho K.. Targeted drug delivery via the transferring receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev*. 2002, 54, 561–587.

Qing-Xi W., Dong-Qiang L., Shan-Jing Y.. Design of Chitosan and Its Water Soluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes. *Mar Drugs*. 2014, 12(12): 6236–6253.

Quinteros D.A., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Equilibrium and Release Properties of Aqueous Dispersions of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs Complexed with Polyelectrolyte Eudragit E 100. *Sci Pharm*. 2012, 80: 487–496.

Quinteros D.A., Manzo R.H., Allemandi D.A.. Design of a colonic delivery system based on cationic polymethacrylate Eudragit E100-mesalamine complexes. *Drug Deliv*. 2010, 17: 208-13.

Quinteros D.A., Manzo R.H., Allemandi D.A.. Interaction between eudragit® E100 and anionic drugs: addition of anionic polyelectrolytes and their influence on drug release performance. *J Pharm Sci*. 2011, DOI 10.1002/jps.

Quinteros D.A., Ramírez Rigo M.V., Jimenez Kairuz A.F., Manzo R.H., Allemandi D.A.. Interaction between a cationic polymethacrylate (Eudragit E100) and anionic drugs. Influence of the physical-chemical properties of drugs on selectivity and affinity coefficients. *J. Pharm. Sci*. 2008, 33, 72-79.

R

Radhika M., Kopal M., Abhishek B., Vivek D., Animesh J., Nidhi R., Albin T., Avinash P., Flynn W.H.. Pharmacokinetics of intravitreal antibiotics in endophthalmitis. *J Ophthalmic Inflamm Infect*. 2014; 4: 22.

Rah M.J.. A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry*. 2011, 82 (1): 38-43. doi: 10.1016/j.optm.2010.08.003.

Rajeev J.. Electrochemistry I. En: *Physical Chemistry*. 2011. Nueva Deli. Disponible en: http://www.academia.edu/4039530/PDF_Electrochemistry_I_sem3.

Ramírez Rigo M.V., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Swellable drug-polyelectrolyte matrices of drug-carboxymethylcellulose complexes. Characterization and delivery properties. *Drug Deliv*. 2009, 16(2):108–115.

Ramírez Rigo M.V., Allemandi D.A., Manzo R.H.. A linear free energy relationship treatment of the affinity between carboxymethylcellulose and basic drugs. *Molecular Pharm*. 2005, 5:383–386.

Ramírez Rigo M.V., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Swellable drug–polyelectrolyte matrices (SDPM) of alginic acid: characterization and delivery properties. *Int J Pharm.* 2006, 322: 36-43.

Ramirez Rigo M.V., Olivera M.E., Rubio M., Manzo R.H.. Enhanced intestinal permeability and oral bioavailability of enalapril maleate upon complexation with the cationic polymethacrylate Eudragit E100. *Eur. Jour. Pharm. Sci.* 2014, 55. 1-11.

Raymond C.R., Sheskey P.J., Quinn M.E. (editors). *Handbook of pharmaceutical Excipients* 6th edition. 2009. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.

Richette P., Ravaud P., Conrozier T., Euller-Ziegler L., Mazières B., Maugars Y.. Effect of hyaluronic acid in symptomatic hip osteoarthritis: a multicenter, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2009; 60:824-30.

Rinaudo M.. Rheological investigation on hyaluronan–fibrinogen interaction. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2008, 43, 444–450.

Rogalska A., Szwed M., Rychlik B.B.. The Connection between the Toxicity of Anthracyclines and Their Ability to Modulate the P-Glycoprotein-Mediated Transport in A549, HepG2, and MCF-7 Cells. *Scientific World Journal.* 2014. ID 819548, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/819548>.

Romero V., Pons P., Bocco J.L., Manzo R.H., Alovero F.. Eudragit E100® potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Fems Micro. Lett.* 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02626.x.

Rowe R.C., Sheskey P., Quinn M.. *Handbook of pharmaceutical Excipients* 6th edition. Pharmaceutical press and American pharmacist asociation. 2009. Estados Unidos

Russel W.M., Burch R.L. 1959. *The principles of humane experimental technique.* Methuen, London, UK.

S

Saettone M.F., Chetoni P., Torracca M.T., Burgalassi S., Giannaccini B.. Evaluation of muco-adhesive properties and in vivo activity of ophthalmic vehicles based on hyaluronic acid. *Int J Pharm.* 1989, 51, 203-212.

Saettone M.F., Giannaccini B., Chetoni P., Torracca M.T., Monti D.. Evaluation of high- and low-molecular-weight fractions of sodium hyaluronate and an ionic complex as adjuvants for topical ophthalmic vehicles containing Pilocarpine. *Int J Pharm.* 1991. 72, 131-139.

Schanté C.E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.F.. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carb. Pol.* 2011, 85, 469–489.

Schanté C.E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.F.. Improvement of hyaluronic acid enzymatic stability by the grafting of amino-acids. *Carb. Pol.* 2012, 87, 2211– 2216.

Schoenwald R.D.. Ocular pharmacokinetics. In *Textbook of Ocular Pharmacology*; Zimmerman, T.J., Ed.; Lippincott-Raven: Philadelphia, PA, USA, 1997; pp. 119-138.

Schuartz H.E., Blackmore J.M., Cortese S.M., Oplet W.G.. Composition of polyacids and methods for their use in resusing adhesions. 2005. United States Patent Application Publication. Pub. No: US 2005/0074495A1.

Sekhar E.C., Madhusudana K., Rao S., Eswaramma K.S., Krishna R., Raju R.R.. Development of Sodium Alginate/(Lignosulfonicacid-g-Acrylamide) IPN Micro Beads for Controlled Release of an Anti-Malarial Drug. *Ind. Jour. Adv. Chem. Sci.* 2014, 2(3), 228-237.

Serafino A.. CD44-targeting for antitumor drug delivery: a new SN-38-hyaluronan bioconjugate for locoregional treatment of peritoneal carcinomatosis. *Curr. Cancer Drug Targets.* 2011;11(5):572-85.

Shamliyan T.A., Wang S.Y., Olson-Kellogg B., Kane R.L.. Physical Therapy Interventions for knee Pain Secondary to Osteoarthritis. Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2012. Report No.: 12(13)-EHC115-EF.

Shen F., Shaoyou C., Bence A.K., Bailey B., Xue X., Erickson P.A., Montrose M.H., Beck W.T., Erickson L.C.. Quantitation of Doxorubicin Uptake, Efflux, and Modulation of Multidrug Resistance (MDR) in MDR Human Cancer Cells. *JPET.* 2008, 324:95–102.

Shete G., Vibha P., Lokesh K., Arvind K.. Solid State Characterization of Commercial Crystalline and Amorphous Atorvastatin Calcium Samples. *AAPS PharmSciTech.* 2010, Vol. 11, No. 2.

Shuang C., Thati S., Bagby, T.R.. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *J. Control. Release.* 2010, 146, 212–218.

Shuang C., Sharadvi T., Taryn R.B., Hassam-Mustafa D., Neal M.D., Cohen M.S., Forrest M.L.. Localized doxorubicin chemotherapy with a biopolymeric nanocarrier improves survival and reduces toxicity in xenografts of human breast cancer. *Jour. of Cont. Rel.* 2010. 146, 212–218.

Shuangshuang S., Huan Q., Jingwen X., Pan G., Fen C., Xinggang Y., Naicheng S., Yingliang W., Weisan P.. Hyaluronan-Based Nanocarriers with CD44-Overexpressed Cancer Cell Targeting. *Pharm Res.* 2014. DOI 10.1007/s11095-014-1393-4.

Siepmann J., Siepmann F.. Mathematical modeling of drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics.* 2008, 364:328–343

Skandalis S.S., Gialeli C., Theocharis A.D., Karamanos N.K.. Advances and advantages of nanomedicine in the pharmacological targeting of hyaluronan-CD44 interactions and signaling in cancer. *Adv Cancer Res.* 2014;123:277-317.

Slomiany M.G., Dai L., Bomar P.A.. Abrogating drug resistance in malignant peripheral nerve sheath tumors by disrupting hyaluronan-CD44 interactions with small Hyaluronan Oligosaccharides. *Cancer Res.* 2009, 69 (12).

Son M.G., Hyun Y., Kim J.H., Chong W.C., Dae H.K., Su B.P., Young-IL J.. Self-Assembled Polymeric Micelles Based on Hyaluronic Acid-g-Poly(d,l-lactide-co-glycolide) Copolymer for Tumor Targeting. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(9): 16057–16068.

Song S., Qi H., Xu J.. Hyaluronan-based nanocarriers with CD44- overexpressed cancer cell targeting. *Pharm. Res.* 2014. Disponible on line en: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-014-1393-4>.

Strauss E.J., Hart J.A., Miller M.D., Altman R.D., Rosen J.E.. Hyaluronic acid viscosupplementation and osteoarthritis: current uses and future directions. *Am J Sports Med.* 2009; 37:1636-44.

Sun S.F., Hsu C.W., Hwang C.W., Hsu P.T., Wang J.L., Tsai S.L.. Hyaluronate improves pain, physical function and balance in the geriatric osteoarthritic knee: a 6-month follow-up study using clinical tests. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006; 14:696-701.

T

Tamer M. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 2013; Vol. 6(3): 111–125.

Tártara I, Quinteros D.A., Saino V., Allemandi D.A., Palma S.D.. Improvement of Acetazolamide Ocular Permeation Using Ascorbyl Laurate Nanostructures as Drug Delivery System. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics.* 2012, 28 (2).p 102-109.

Tessler J. y Varela M.S., Raso D.. Quimioterapicos, Antineoplasicos e inmunosupresores. *En: Farmacologia II.* 2004, 1-31.

Tikiz C., Unlü Z., Sener A., Efe M., Tüzün C.. Comparison of the efficacy of lower and higher molecular weight viscosupplementation in the treatment of hip osteoarthritis. *Clin Rheumatol.* 2005;24: 244-50.

Trigkilidas D., Anand A.. The effectiveness of hyaluronic acid intra-articular injections in managing osteoarthritic knee pain. *Ann R Coll Surg Engl.* 2013; 95(8):545-51.

Tuszyński J.A., Portet S., Dixon J.M., Luxford C., Cantiello H.F.. Ionic Wave Propagation along Actin Filaments. *Biophys J.* 2004 Apr; 86(4): 1890–1903. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74255-1.

U

U.S. National Library of Medicine. U.S. Department of Health and Human Services National Institutes of Health. Medline Plus. Bethesda. Documento revisado: 01/10/2010. Pagina actualizada 01/01/2015. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/druginfo/meds/a682043-es.html>.

United States Pharmacopeial Convention, United States Pharmacopeia (USP) 37. National Formulary (NF) 32. Rockville, Md. Gobierno de los estados Unidos de Norte América.

Upadhyay K.K., Bhatt A.N., Mishra A.K.. The intracellular drug delivery and anti tumor activity of doxorubicin loaded poly(g-benzyl L-glutamate)-b-hyaluronan polymersomes. *Biomaterials.* 2010, 31, 2882–2892.

V

Vasi A.M., Popa M.I., Butnaru M., Dodi G., Verestiuc L.. Chemical functionalization of hyaluronic acid for drug delivery applications. *Mat. Sci. Eng.* 2014. 38, 177–185.

Vijay P., Taori Y.L., Theresa M.R.. DNA delivery in vitro via surface release from multilayer assemblies with poly(glycoamidoamine)s. *Self-Ass. Biom.* 2009, 5: 925-33.

Vilches A.P., Jimenez Kairuz A.F., Alovero F., Olivera M.E., Allemandi D.A., Manzo R.H.. Release kinetics and up-take studies of model fluoroquinolones from carbomer hydrogels. *Int. J. Pharm.* 2002, 246, 17-24.

W

Wang E.J., Casciano C., Clement R., Johnson W.. In vitro flow cytometry method to quantitatively assess inhibitors of p-glycoprotein. *Drug metabolism and disposition.* 2000, 28: 522–528.

Wu Y., Yao J., Zhou J., Dahmani F.Z.. Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine A in thermosensitive hyaluronic acid-based in situ forming microgels. *Int J Nanomedicine.* 2013, 8:3587-601.

Y

Yan H., Tianming Y., Xianming H.. Novel polysaccharides-based nanoparticle carriers prepared by polyelectrolyte complexation for protein drug delivery. *Polymer Bulletin.* 2012, 68, 4, 1183-99.

Yu-Jin J., Ubonvan T., Dae-Duk K.. Hyaluronic Acid in Drug Delivery Systems. *Jour. Pharm. Inv.* 2010, 40, 33-43.

Z

Zoppi A., Garro Linck Y., Monti G.A., Genovese D., Jimenez Kairuz A.F., Manzo R.H., Longhi M.R.. Studies of pilocarpine:carbomer intermolecular interactions. *Int. J. Pharm.* 2012, 427: 252.

Publicaciones generadas a partir de esta tesis

En revistas científicas:

- Battistini F.D., Olivera M.E., Manzo R.H.. Equilibrium and release properties of hyaluronic acid–drug complexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2013, 49, 588–594.
- Battistini F.D., Flores-Martin J., Olivera M.E., Genti-Raimondi S., Manzo R.H.. Hyaluronan as drug carrier. The in vitro efficacy and selectivity of Hyaluronan–Doxorubicin complexes to affect the viability of overexpressing CD44 receptor cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014, 65, 122–129.

En reuniones científicas:

- Evaluación de la eficacia in vitro del complejo iónico Hialuronano-Doxorrubicina frente a cultivos de células tumorales. SAIC-SAFIS-SAFE). 20-23 de noviembre. Mar del Plata, Argentina. Modalidad: Exposición Oral en el Simposio Jóvenes Investigadores. PREMIO SAFE 2013 (TERNADO). *Medicina, Buenos Aires*. VOL. 73 (Supl. III) – 2013, pag 82-83. ISSN 0025.7680.
- Evaluación in vitro/in vivo de la eficacia del complejo hialuronano-timolol (Hi-Ti) en el tratamiento de la hipertensión ocular. SAIC-SAFIS-SAFE. 20-23 de noviembre. Mar del Plata, Argentina. Modalidad: Poster. *Medicina, Buenos Aires*. VOL. 73 (Supl. III) – 2013, pag 156. ISSN 0025.7680
- Potencialidad farmacoterapéutica de complejos iónicos Hialuronano-Fármaco (Hi-F). 3er Simposio Argentino de Nanomedicina. 26 y 27 de setiembre de 2013. Buenos Aires, Argentina. Modalidad: Oral
- Complejo Iónico Polielectrolito-Fármaco (PE-F): Determinación de la distribución de especies en el equilibrio utilizando técnicas de diálisis. Battistini FD; Olivera ME; Manzo RH. 3° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa). 2014. Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina.

