

SISTEMAS BIODEGRADABLES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS
BASADOS EN GELES DE BIOPOLÍMEROS / CICLODEXTRINAS

ELIZABETH HENAO MEJÍA

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍA
DOCTORADO EN INGENIERÍA
MEDELLÍN

2018

SISTEMAS BIODEGRADABLES DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS
BASADOS EN GELES DE BIOPOLÍMEROS / CICLODEXTRINAS.

ELIZABETH HENAO MEJÍA

Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Ingeniería

Director

I.Q. Germán Camilo Quintana Marín, M.Sc., Ph.D.

Co-Director

I.Q. Ezequiel Delgado Fornué, M.Sc., Ph.D

UNIVERSIDAD PONTIFICIA BOLIVARIANA

ESCUELA DE INGENIERÍA

DOCTORADO EN INGENIERÍA

MEDELLÍN

2018

Agosto 1 de 2018

Elizabeth Henao Mejía

“Declaro que esta tesis (o trabajo de grado) no ha sido presentada para optar a un título, ya sea en igual forma o con variaciones, en esta o cualquier otra universidad” Art 82 Régimen Discente de Formación Avanzada.

Firma:

Elizabeth Henao Mejía.

AGRADECIMIENTOS

En primero lugar quisiera agradecer a Dios por cada uno de las circunstancias que puso en mi camino y me llevaron a ser la mujer que soy hoy y culminar este gran logro.

Agradezco muy especialmente a mis padres por todo el apoyo brindado, por ser el mejor ejemplo a seguir y ser unos padres inigualables.

A mi hija por ser mis energías y fuerzas para enfrentar cada barrera y conseguir cada propósito.

A mi hermano por ser mi bastón cuando la vida pierde un poco de color.

A Germán por su por ser un gran maestro en lo personal y académico, por no dejarme decaer nunca e inspirarme a ser una mejor persona.

A Ezequiel por confiar en mi y aceptar este reto.

A Chris, Andrés, Carlos y Ana Soto por todos estos años de complicidad y apoyo.

A la vida, por poner exactamente las situaciones necesarias para llegar a la meta.

A la Dra Carmen Remuñan por todo su acompañamiento durante la estancia.

A Fanny y Cris por quedarse en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN EJECUTIVO:	17
INTRODUCCIÓN	20
1. HIDROGELES	20
1.1. Hidrogeles químicos	20
1.2. Hidrogeles físicos	21
2. POLÍMEROS EN LA OBTENCIÓN DE GELES	23
3. GELES EN BIOMEDICINA	25
3.1. Liberación controlada de fármacos	25
3.2. Geles de polímeros – ciclodextrinas en el encapsulamiento y liberación de fármacos.	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
CAPÍTULO I.	30
ESTADO DEL ARTE	30
1.1.1 Quitosano.	30
1.1.2 Carboximetilcelulosa (CMC)	33
1.1.3 Ciclodextrinas.	35
CAPITULO II.	40
OBJETIVOS	40
2.2 OBJETIVO GENERAL	40
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40

CAPITULO III.	41
MATERIALES Y MÉTODOS	41
PROPUESTA METODOLÓGICA	41
MATERIALES	42
MÉTODOS	43
3.1 FORMACIÓN DEL GEL	43
3.1.1 Efecto del orden de adición del polímero sobre la formación de gel	43
3.1.2 Efecto del medio de preparación en la obtención del gel	44
3.1.3 Comparación entre métodos de interacción de cargas para la obtención de los hidrogeles	45
3.1.4 Influencia de la relación polimérica CMC/CS sobre el gel	46
3.1.5 Efecto del tiempo de gelación	46
3.2 ENCAPSULACIÓN DE ASA	47
3.2.1 Formación de hidrogel y posterior encapsulación de ASA	47
3.2.2 Formación simultánea de hidrogel con encapsulamiento de ASA	48
3.2.3 Efecto de la velocidad de dosificación y de agitación	48
3.2.4 Inclusión de CD	49
3.3 ENCAPSULACIÓN DE IB	49
3.3.1 Efecto de la velocidad de agitación y el flujo de CMC en la encapsulación del IB en gel	49
3.3.2 Solubilidad del Ibuprofeno con las ciclodextrinas	50
3.3.3 Encapsulación de IB en el gel CMC/CS con HP- β -CD y A- β -CD en la relación CMC/CS 200	51
3.3.4 Encapsulación de IB en el gel CMC/CS con HP- β -CD y A- β -CD en la relación CMC/CS 2,7	52
3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES	53

3.4.1	Morfología	54
3.4.2	Hinchamiento libre	54
3.4.3	Rendimiento	54
3.4.4	Potencial z	55
3.4.5	FTIR	55
3.4.6	RMN	55
3.4.7	Porosimetría	56
3.4.8	Eficacia de encapsulación	56
3.4.9	Hinchamiento	56
3.5	PRUEBAS DE LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LOS GELES	57
3.5.1	Liberación de fármaco a diferentes pH	57
3.5.2	Pruebas de degradación térmica y enzimática	58
	Termogravimetría TGA	58
	Degradación Enzimática	58
	CAPITULO IV.	60
	RESULTADOS Y DISCUSIONES	60
4.1.	PREPARACIÓN DEL GEL A PARTIR DE CARBOXIMETILCELULOSA Y QUITOSANO	60
4.1.1	Efecto del orden de adición del polímero sobre la formación de gel	60
4.1.2	Efecto del medio de preparación en la obtención del gel	63
		64
4.1.3	Formación de hidrogel por los diferentes métodos de interacción de carga	66
4.1.4	Influencia de la relación de polímeros sobre el gel	75
4.1.5	Efecto del tiempo de gelación en la morfología del hidrogel	84
4.2	ENCAPSULACIÓN DE ASA EN LOS HIDROGELES E INCLUSIÓN DE CD	85

4.2.1	Formación de gel y posterior encapsulación de ASA _____	85
4.2.2	Formación del hidrogel y encapsulación del ASA simultaneo _____	86
	<i>Observación morfológica por SEM</i> _____	90
4.2.3	Efectos de la velocidad de dosificación y de agitación _____	90
4.2.4	Inclusión de HP- β -CD en la elaboración del gel _____	95
	Hinchamiento libre del hidrogel con fármaco incluido _____	96
4.3	ENCAPSULACIÓN DE IB EN LOS HIDROGELES E INCLUSIÓN DE CD _____	97
4.3.1	Efecto de la velocidad de agitación y el flujo de CMC en la encapsulación del IB en gel _____	97
4.3.2	Diagrama de solubilidad de fases del Ibuprofeno con las ciclodextrinas _____	100
4.3.3	Encapsulación de IB en la relación CMC/CS 200 con CD _____	103
4.3.4	Encapsulación de IB en la relación CMC/CS 2,7 con CD _____	108
	Efecto del tiempo de gelación en el encapsulamiento _____	111
	Solubilidad del IB con los polímeros. _____	112
	Influencia de solubilizar la CD y el IB en el CMC o en el CS _____	114
	Hinchamiento _____	122
4.4	LIBERACIÓN DE ASA Y DE IB A DIFERENTES pH _____	125
4.4.1	Liberación de ASA a diferentes pH _____	125
4.4.2	Liberación de IB a diferentes pH _____	127
4.5	EFFECTO DE ESTIMULOS EXTERNOS EN EL HIDROGEL _____	130
4.5.1	Análisis termo gravimétrico (TGA) _____	130
4.5.2	Degradación enzimática _____	132
	CONCLUSIONES _____	134
	REFERENCIAS _____	137

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Polímeros empleados como matriz en la síntesis de geles [4]. _____ 24

Cuadro 2. Ciclodextrinas empleadas en el encapsulamiento de fármacos con polímeros.26

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Relación CMC/CS: CaCl ₂ en la formulación de los geles _____	47
Tabla 2. Relación CMC/CS: CaCl ₂ :ASA en la formulación de los geles _____	48
Tabla 3. Relaciones empleadas de CMC/HP-β-CD. _____	52
Tabla 4. Relaciones empleadas de CMC/HP-β-CD. _____	52
Tabla 5. Relaciones empleadas de CMC/HP-β-CD. _____	53
Tabla 6. Rendimiento de los hidrogeles a las diferentes relaciones polímero aniónico a catiónico. _____	75
Tabla 7. Encapsulación de ASA en el gel formado _____	86
Tabla 8. Encapsulación de ASA en la formación del gel _____	87
Tabla 9. Rendimiento del gel con ASA agregado en la formación del gel _____	89
Tabla 10. Análisis de Varianza para Rendimiento _____	91
Tabla 11. Análisis de Varianza para (Eficacia asociación) ³ _____	93
Tabla 12. Análisis de Varianza para Absorción de agua _____	94
Tabla 13. Tabla ANOVA para Eficacia asociación por Velocidad _____	98
Tabla 14. Tabla ANOVA para Rendimiento por Velocidad _____	100
Tabla 15. Solubilidad del IB en BCD, HP-β-CD y A-β -CD. _____	102
Tabla 16. Efecto de la relación CMC/HP-β-CD en el rendimiento del gel _____	109
Tabla 17. Efecto de la relación CMC/HP-β-CD en el rendimiento del gel _____	109
Tabla 18. Efecto de la relación CMC/HP-β-CD en la eficacia de encapsulación de IB_	110

Tabla 19. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la eficacia de encapsulación de IB.	110
Tabla 20. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el pH_____	110
Tabla 21. Efecto de la relación CMC: HP- β -CD en el pH_____	111
Tabla 22. Efecto del orden de solubilización en el gel. _____	115

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura de la CD [91]._____	36
Figura 2. Complejos D:CD _____	36
Figura 3. Complejo IB: β -CD _____	37
Figura 4. Propuesta metodol3gica _____	41
Figura 5. Montaje. Formaci3n del gel. _____	44
Figura 6. Hidrogeles obtenidos mediante la adici3n de a) CS en CMC (izquierda) y CMC en CS para una relaci3n de 75/1 (derecha) b) CMC a3adida a CS para una relaci3n de 75/1 (tama3o de poro alrededor de 3 μ m).. Aumento 100x _____	61
Figura 7. Micrograf3as de hidrogeles obtenidas mediante la adici3n de a) CS / CMC para una relaci3n de 75 y b) CMC / CS para una relaci3n de 75 _____	62
Figura 8. Esponjas obtenidas al agregar a) CMC / CS para una relaci3n de 1, b) CS / CMC para una proporci3n de 1 _____	62
Figura 9. Im3genes SEM de hidrogel a) CMC/CS pH 3, b) CMC/CS pH6, c) CMC/CS NaCl, d) CMC/CS OH, e) CMC/CS/CaCl ₂ pH 3, f) CMC/CS/ CaCl ₂ pH 6, g) CMC/CS/CaCl ₂ NaCl, h) CMC/CS/CaCl ₂ OH, i) CMC/CaCl ₂ pH 3, j) CMC/CaCl ₂ pH 6, k) CMC/CaCl ₂ NaCl _____	64
Figura 10. Imagen SEM de hidrogel sin condiciones controladas pH 3,8 _____	65
Figura 11. Micrograf3as 3pticas de hidrogeles fabricados a partir de CMC al 2% para determinar las diferencias morfol3gicas generadas por los diferentes m3todos de interacci3n de cargas: a) gelaci3n ionotr3pica con CaCl ₂ al 1% p/v; b) gelaci3n ionotr3pica con CaCl ₂ al 4,9% p/v, c); complejaci3n de polielectrolitos con CS 0,01% p/v; d) combinaci3n de gel *escala a, b) 200x, c, d) 100x. _____	67

Figura 12. Imágenes SEM para hidrogeles hechos de CMC 2%; a) gelación ionotrópica con CaCl ₂ al 1% p/v; b) gelación ionotrópica con CaCl ₂ al 4,9% p/v; c) complejación polielectrolita con CS 0,01% p/v; y d) combinación de gelación ionotrópica y complejación polielectrolita *escala 200x	68
Figura 13. Micrografías ópticas de un hidrogel hecho por gelación ionotrópica de CMC 1,6% y CaCl ₂ 4,9% p/v. *escala 50x	70
Figura 14 Micrografías ópticas de un hidrogel hecho por complejación polielectrolítica de CS 0,016% p/v sobre CMC 0,8% p/v. *escala 50x	70
Figura 15. Imagen SEM para hidrogeles hechos de CMC 2%, CaCl ₂ al 1% p/v y CS 0,001% p/v.	71
Figura 16. Espectros FTIR de hidrogeles hechos de CMC (a) 2% por: b) gelación ionotrópica con CaCl ₂ 1% p/v; c) complejación polielectrolita con CS 0,01% p/v; y d) combinación de gelación ionotrópica y complejos polielectrolitos.	73
Figura 17. Gel formado con la relación CMC/CS 21	76
Figura 18. Imágenes de microscopía de hidrogel CMC / CS en proporciones: a) 200, b) 32.	77
Figura 19. Imágenes SEM de hidrogel CMC / CS en diferentes proporciones: a) 200, b) 75 c) 32	77
Figura 20. Efecto de la relación polímero-polímero en el pH de la solución final	79
Figura 21. Efecto de la relación polímero-polímero sobre el potencial z de la solución final	80
Figura 22. Espectros FTIR de CS, CMC, relación CMC / CS 32 y relación CMC / CS 200	81
Figura 23. Estructuras químicas de la CMC y la CS	83
Figura 24. RMN de gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)/ CaCl ₂ (1,33%)	84
Figura 25. Hidrogeles para CMC / CS 32 a) después del tiempo de gelación b) antes del tiempo de gelación.	85
Figura 26. Encapsulación de ASA 1) en el gel formado y 2) durante la formación	88

Figura 27. Modelo “caja de huevo”	89
Figura 28. SEM del gel formado con a) CMC (2%p/v)/CS (0,01%p/v) b) CMC (2%p/v)/CS (0,01%p/v)/CaCl ₂ (1,33%v/v)	90
Figura 29. Rendimiento con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)	92
Figura 30. Eficacia de asociación con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)	93
Figura 31. Absorción de agua con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%).	95
Figura 32. Retención de los geles a diferentes pHs.	96
Figura 33. Efecto de la velocidad de agitación en la eficacia de encapsulación del IB	98
Figura 34. Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento de gel.	99
Figura 35. Diagrama de fase de solubilidad del IB con β -CD, HP- β -CD y A- β -CD a 25°C	100
Figura 36. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la formación del gel con y sin IB.	104
Figura 37. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la eficacia de encapsulación de IB	105
Figura 38. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la carga del gel	106
Figura 39. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el tamaño de las partículas.	107
Figura 40. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el pH del gel	108
Figura 41. Efecto del tiempo de gelación en el encapsulamiento	112
Figura 42. Efecto de los polímeros en la solubilidad del IB con HP- β -CD	113
Figura 43. Porosimetría de los geles a las relaciones: a) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 4 mg de IB, b) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 9 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB, c) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 24,3 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB	116
Figura 44. Espectros FTIR de hidrogeles hechos de a) CMC/CS/CD 2,7/1/1 (b) CMC/CS 2,7/1	117
Figura 45. Imagen SEM del gel CMC/CS-HP- β -CD (2,7:1:1) con 9 mg IB	118

Figura 46. a) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB, b) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 9 mg HP- β -CD, c) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 7 mg IB, 9 mg HP- β -CD. _____	119
Figura 47. A) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 0,6 mg IB B) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 70 mg HP- β -CD C) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 1 mg IB, 70 mg HP- β -CD _____	121
Figura 48. a) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB, b) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 10 mg IB, 9 mg HP- β -CD. c) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 10 mg IB, 24,3 mg HP- β -CD. _____	122
Figura 49. Hinchamiento del gel a pH 2. _____	123
Figura 50. Hinchamiento del gel a pH 5,8. _____	124
Figura 51. Hinchamiento del gel a pH 7,4. _____	124
Figura 52. Liberación de ASA a diferentes pHs en geles elaborados sin CD _____	126
Figura 53. Liberación de ASA a pH 7,4 en geles con CD. _____	127
Figura 54. Liberación del IB con el tiempo pH 2 _____	128
Figura 55. Modelo de liberación pH 7,4 _____	129
Figura 56. Análisis termo gravimétrico de los geles a las relaciones: a) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 9 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB, b) 140 mg de CMC, 0,7 mg de CS, c) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 4 mg de IB, d) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 24,3 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB e) 70 mg de CMC, 0,7 mg de CS, 70 mg de HP- β -CD, 1 mg de IB ____	131
Figura 57. Degradación enzimática _____	133

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

- A- β -CD. Amino- β -ciclodextrina
- ASA. Ácido acetil salicílico
- β -CD. β -ciclodextrina
- CD. Ciclodextrina
- CE. Eficiencia de complejación
- CMC. Carboximetilcelulosa
- CS. Quitosano
- EA. Eficacia de asociación
- HP- β -CD. Hidroxipropil- β -ciclodextrina
- IB. Ibuprofeno
- Q_s . Hinchamiento
- R. Rendimiento
- R_c . Liberación de fármaco en un tiempo fijado
- R_f . Liberación de fármaco en el tiempo
- RMN. Resonancia magnética nuclear
- S. Hinchamiento libre
- S_o . Solubilidad del principio activo
- SEM. Microscopia electrónica de barrido

RESUMEN EJECUTIVO:

El estudio de esta investigación concierne la encapsulación de fármacos modelos como ácido acetilsalicílico e Ibuprofeno (ASA e IB) en geles elaborados a partir de carboximetilcelulosa y quitosano con la incorporación de ciclodextrinas (CDs), por medio del método de interacción de carga.

Se determinó el orden de adición adecuado CMC/CS basado en análisis de rendimiento, hinchamiento y observación bajo microscopio, el tipo de medio en el que se realizan los geles se determinó comparando las imágenes SEM. En el medio elegido se realizaron geles por los diferentes métodos de interacción de cargas y se compararon por imágenes, IR y potencial z, para entender las diferentes interacciones de los compuestos en el gel. Posteriormente se evaluaron las diferentes relaciones de CMC/CS haciendo pruebas de imágenes, pH, potencial z, IR rendimiento y RMN para analizar como varía el gel obtenidos con las relaciones poliméricas, también se observó cómo afecta el tiempo de gelación la morfología del gel.

La encapsulación de ASA se realizó en el gel formado y durante la formación de geles CMC/CS con y sin CaCl_2 evaluando el rendimiento del gel, la eficacia de encapsulación y la morfología de los geles. También se determinó el efecto de la velocidad de agitación y el flujo de CMC en el rendimiento, la eficacia de asociación y la absorción de agua, Para la encapsulación de IB se determinó el efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento y la eficacia de asociación. Se estudió el efecto de la inclusión de CD en la solubilidad de IB seguido de su inclusión en la formulación del gel, la cual se caracterizó por rendimiento, eficacia de encapsulación, pH, potencial z e imágenes SEM. Finalmente se determinó la degradación térmica y enzimática de los geles con el fármaco.

Los geles CMC/CS presentan mayor recuperación de gel a bajas relaciones y más hinchamiento libre con la relación CMC/CS. Todos los geles tienen forma de redes

tridimensionales amorfas y porosas, con poros más pequeños a proporciones CMC/CS más elevadas. La espectroscopia infrarroja mostró bandas que correspondían a las vibraciones de los enlaces carbonilo (C = O) de CS y grupos carboxilo de CMC. En el proceso de elaboración de los geles, el tiempo de gelación aumentó la aglomeración y en cuanto al potencial z los geles arrojan valores negativos alrededor de -372 mV a -51 mV.

Cada método de interacción de carga produce cambios en la morfología de los hidrogeles; exhibiendo poros más grandes en presencia de CaCl₂. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) muestra que existe interacción de todos los componentes que se emplearon en la elaboración del gel. En la incorporación de ASA la relación 200 sin CaCl₂ es la que mayor eficiencia de encapsulación presenta (21%), cuando el fármaco era incorporado durante a formación del gel. Todas las relaciones encapsularon ASA cuando se agregó en el gel ya formado, siendo la relación 21 sin CaCl₂ la que mayor eficacia de encapsulación reportó (10%). El diseño de experimentos arrojó que a menor velocidad de agitación y mayor flujo se obtiene una mayor absorción de agua mientras que el aumento de flujo y la mayor velocidad de agitación mejoran la eficacia de asociación, y el rendimiento mejora con el menor flujo. La β -CD y la HP- β -CD son del tipo lineal positiva, mientras que la A- β -CD presenta una isoterma de desviación positiva. La HP- β -CD es la que da lugar al mayor aumento de solubilidad de IB, un 360% más soluble que en β -CD a una concentración 0,013 molar. Adicionalmente, se consiguió un aumento de la solubilidad del IB del 226% con la mezcla CMC/HP- β -CD respecto a la relación CS/HP- β -CD. La inclusión de CD en la formulación del gel permite encapsulación de fármaco para relación 2,7 que no presentaba encapsulación y el gel de la relación 200 incrementó la capacidad de encapsulación con una relación 1/1 CMC/CD. El tiempo de gelación presenta una leve influencia negativa en la encapsulación de IB. La porosidad de los geles se determinó por medio de un porosímetro de mercurio y la degradación con la temperatura por medio de termogravimetría (TGA), degradación. La microscopía Electrónica de Barrido (SEM) se mostró geles porosos y el TGA la presencia de los diferentes polímeros y la CD.

Este trabajo de investigación se logró entender el principio y el fenómeno alrededor de la formación de geles por interacción física, hacer geles de CMC/CS/CD, encapsular fármaco en un gel que no proporcionaba encapsulación al incorporar CD, obtener buena encapsulación y buen rendimiento y estandarizar el método. Así se encuentra que la

relación entre polímeros afecta la morfología de los geles y la encapsulación de fármacos, además la incorporación de CD aumenta la capacidad de encapsulación permitiendo incluso que geles que no encapsulen proporcionen encapsulación.

PALABRAS CLAVES: INTERACCIÓN DE CARGAS, LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS, AMINO-BETA-CICLODEXTRINA, CARBOXIMETILCELULOSA, QUITOSANO.

INTRODUCCIÓN

1. HIDROGELES

Los hidrogeles son redes tridimensionales entrecruzadas de polímeros hidrófilos, constituidos mayormente por agua [1]. Algunos tienen la capacidad de responder a cambios en el ambiente circundante como son: pH, temperatura, modificaciones de fuerza iónica o de su estado (hinchamiento, encogimiento), a una velocidad específica [2].

Los primeros trabajos reportados de usos de hidrogeles fueron realizados por Wichterle y Lim en 1960, quienes emplearon hidrogeles de hidroxietil metacrilato entrecruzado (HEMA) para fines biológicos [3].

Los hidrogeles se forman por entrecruzamiento químico o físico de homo o co-polímeros y se clasifican según su síntesis. El entrecruzamiento químico se da por enlaces covalentes (entre monómeros funcionales o por polimerización por adición con iniciación por radiación) y el entrecruzamiento físico por interacciones hidrófobas, puentes de hidrógeno, estereo – acomplejamientos, interacciones electrostáticas o de carga [1, 2].

1.1. Hidrogeles químicos

Los hidrogeles químicos se sintetizan por entrecruzamiento covalente de redes, entrecruzamiento de polímeros en estado sólido o en solución por medio de radiación, agentes entrecruzantes o compuestos reactivos multifuncionales solubles en agua; co-polimerizando un monómero y posteriormente entrecruzando en solución; polimerizando un monómero en un polímero sólido diferente para formar un gel de red interpenetrada

(INP); por co-polimerización por injerto o por conversión de polímeros hidrófobos a hidrófilos y posterior entrecruzamiento para formar una red [4, 5].

También se pueden obtener por síntesis en dos etapas, funcionalizando el polisacárido con dobles enlaces reactivos y luego entrecruzando por polimerización por radicales libres [5].

Los enlaces covalentes también se pueden dar entre grupos funcionales con reactividad complementaria o por entrecruzamiento por reacciones de condensación por presencia de grupos como OH- y COOH- [5].

Estos hidrogeles no son homogéneos, pues contienen regiones de alta densidad de entrecruzamiento y bajo grado de hinchamiento llamados “clúster”, dispersos en las regiones de baja densidad de entrecruzamiento y alta capacidad de hinchamiento. Además, dependiendo de la composición, la temperatura, el disolvente y la concentración de sólidos empleados durante la gelación, puede ocurrir la separación de fases o que el agua llene los poros del hidrogel [4].

1.2. Hidrogeles físicos

Los hidrogeles físicos se forman por fuerzas secundarias, entre las que están incluidas las fuerzas hidrófobas, los puentes de hidrógeno y las fuerzas iónicas [4]. Estos hidrogeles tampoco son homogéneos ya que presentan extremos de cadenas libres o bucles de cadenas.

Los hidrogeles físicos se pueden sintetizar empleando diferentes metodologías: calentando una solución polimérica, entrecruzando un polímero en solución acuosa, usando ciclos de hielo-deshielo para formar microcristales del polímero, disminuyendo el pH para formar un gel enlazado por puentes de hidrógeno entre dos polímeros diferentes en la misma solución acuosa, mezclando soluciones de un polianión y un policatión para formar una coacervación compleja o gelando una solución polielectrolita con un ion multivalente de carga opuesta [3-5].

- Interacciones hidrófobas. Los polímeros con dominios hidrófobos se entrecruzan en ambientes acuosos mediante gelación térmica reversa, resultado del delicado balance entre los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrófobas que dependen de la temperatura [5].
- Interacciones por puentes de hidrógeno. Se forman por ciclos de congelamiento – descongelamiento [5].
- Interacciones por estereo – acomplejamiento. Son interacciones entre cadenas poliméricas, o moléculas pequeñas, de la misma composición química pero diferente estereoquímica, estos muestran alta biocompatibilidad y biodegradabilidad [5].
- Interacciones de carga. Es el entrecruzamiento por cambios de pH, ionización o protonación de grupos funcionales iónicos que causan la gelación. Pueden darse entre un polímero y una molécula pequeña o entre dos polímeros de carga opuesta [4]. Cuando dos polielectrolitos de cargas opuestas se mezclan, gelifican dependiendo de su concentración, fuerza iónica o el pH del medio, forman una coacervación compleja, que posee un gran atractivo en la ingeniería de matrices de tejidos [4]. Si se combina un polielectrolito con un ion multivalente de carga opuesta también se forma un gel [3-5].

En la gelación ionotrópica, los hidrogeles se producen debido a la capacidad de los polielectrolitos para entrecruzarse con contraiones, formando una estructura de malla de entrecruzamiento iónico. La técnica de complejación de polielectrolitos forma hidrogeles mediante la adición de un polielectrolito a otro polielectrolito que tiene carga opuesta estos gelifican o precipitan dependiendo de su concentración, fuerza iónica o el pH del medio [3-6].

La diferencia principal frente a los hidrogeles químicos es que estos son reversibles por cambios físicos como resistencia iónica, pH, temperatura, aplicación de estrés o adición de solutos específicos [3, 4], estos cambios podrían usarse como disparadores para administrar un medicamento en un sitio específico, y también pueden ayudar a mantener el efecto del medicamento durante un período de tiempo, días o incluso semanas [7-9].

La forma de producir estos geles es goteando una solución polimérica de carácter aniónico que contenga el fármaco deseado, en una solución de cationes polivalentes o polímeros catiónicos (o viceversa), los cationes se difunden en las gotas de la solución polimérica cargada del fármaco, formando un entramado tridimensional de unidades entrecruzadas iónicamente [5].

En estudios previos se encontró que las condiciones del proceso de obtención de los geles afectan la morfología, el rendimiento de los geles y la encapsulación de los fármacos. Sriamornsak y Puttipipatkachorn aseguran que existe diferencia entre las morfologías de los geles formados con Ca^{+2} y con una mezcla Ca^{+2} con CS [10]. Polk y colaboradores[11], observaron que en geles hechos con CS y Ca^{+2} , la cantidad de polianión en la formación está relacionada con la encapsulación de fármaco. Wakiyama indica que aumentar la velocidad de agitación durante la formación mejora la cantidad de fármaco encapsulado [12].

2. POLÍMEROS EN LA OBTENCIÓN DE GELES

Los polisacáridos se han estudiado durante los últimos años como materia prima en la encapsulación de fármacos que forman una estructura de malla por interacción de carga entre aniones y cationes y han ido ganando cada vez más atención como componentes de los sistemas de administración de fármacos que responden a estímulos, ya que estos son tienen propiedades peculiares como buena solubilidad en ambientes acuosos, alta estabilidad, toxicidad nula, biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de encapsular fármacos [7, 25, 26].

Un tipo de polisacáridos ampliamente usados son los iónicos, que pueden ser fácilmente reticulados para hacer redes de geles y son sensibles a una variedad de agentes externos e internos con lo que se logra la liberación controlada de fármacos [25, 26]. En aplicaciones de administración de fármacos, los polisacáridos que poseen grupos hidroxilo, carboxilo y amino son bioadhesivos y podrían aumentar el tiempo de residencia [25].

El Cuadro 1 muestra algunos polímeros hidrófilos (naturales y sintéticos) empleados como matrices en la síntesis de geles. Los polímeros son ampliamente usados para la liberación de fármacos por la facilidad de modificación de su estructura [13, 14]. Los polímeros sintéticos atraen interés por la repetitividad que presentan en su síntesis, y los polímeros naturales, especialmente los polisacáridos, por sus características de inocuidad, abundancia y biocompatibilidad [5].

Cuadro 1. Polímeros empleados como matriz en la síntesis de geles [4].

Polímeros aniónicos	Ácido hialurónico [15], ácido algínico. (alginate) [16], pectinas [17], carragenina, sulfato de condroitina, carboximetilcelulosa.
Polímeros catiónicos	Quitosano [18], polilisina [19].
Polímeros anfipáticos	Colágeno [20], gelatina [21], carboximetilquitina [22].
Polímeros neutros	Dextran [23], agarosa [24], pululano [25].

Si el fármaco está recubierto por un polímero, la liberación es controlada por la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica. El recubrimiento de la membrana actúa como una barrera de liberación, por lo tanto, la solubilidad y difusión en o a través de la membrana de polímero se convierte en un factor determinante en la liberación [14].

La velocidad de liberación también puede verse afectada por interacciones iónicas entre el fármaco e ingredientes auxiliares, o por la velocidad de degradación del polímero [14, 26]. Además permiten la liberación sostenida del fármaco en el sitio deseado durante un período de días o incluso semanas [13, 14]; son sensibles al pH, iones y/o temperatura, mejoran la utilidad de los fármacos y reducen los efectos secundarios tóxicos [27, 28].

En la formación de hidrogel, tanto la concentración de polímeros como la secuencia de adición, entre otros factores, desempeñan papeles importantes en la morfología y el tamaño del hidrogel [6, 29, 30].

3. GELES EN BIOMEDICINA

Los hidrogeles son redes tridimensionales capaces de absorber grandes cantidades de agua o fluidos biológicos, por lo tanto, atraen el interés en la medicina [1]. Entre las diversas aplicaciones de los geles en biomedicina, actualmente se destaca su empleo como sistemas de liberación controlada de fármacos, agentes bioactivos en una ubicación específica y en la regeneración de tejidos u organismos [2]. Para esta finalidad, los geles no pueden ser tóxicos, deben tener buena biocompatibilidad, baja tensión interfacial, mínima irritación mecánica, baja fricción y ser inocuos [1].

Los geles en su conformación adoptan diferentes formas físicas, que se emplean según el área en la que estén enfocados: formas sólidas moldeadas (lentes de contacto suaves), matrices de polvo prensado (píldoras y capsulas de ingestión oral), micropartículas (bioadhesivos o tratamiento de heridas), recubrimiento (implantes, catéteres, píldoras, cápsulas, etc.) membranas y parches (depósito de medicinas, parche de liberación de medicinas), sólido encapsulado (bombas osmóticas), líquido (geles por calentamiento o enfriamiento) [3, 4].

Los geles sensibles a cambios en el ambiente tienen un enorme potencial en la biomedicina, ya que en el organismo se encuentran variaciones de pH y temperatura favoreciendo la liberación localizada y controlada de fármacos [31].

3.1. Liberación controlada de fármacos

La liberación controlada de un fármaco contenido en un gel, depende del tamaño y la fracción de volumen de poro y sus interconexiones, el tamaño de la molécula del fármaco, y el tipo y fuerza de las interacciones del fármaco con las cadenas de polímeros que componen la red de gel, también depende de la solubilidad y desorción del fármaco, su difusión a través de la matriz y la degradación del gel [4].

Si el fármaco está recubierto por un polímero, la liberación es controlada por la difusión del fármaco a través de la membrana polimérica o por la velocidad de degradación del

polímero, también puede verse afectada por interacciones iónicas entre el fármaco e ingredientes auxiliares. El recubrimiento de la membrana actúa como una barrera de liberación, por lo tanto, la solubilidad y difusión en o a través de la membrana de polímero se convierte en un factor determinante en la liberación [14, 26].

3.2. Geles de polímeros – ciclodextrinas en el encapsulamiento y liberación de fármacos.

El Cuadro 2 muestra algunos de los geles, en diferentes presentaciones, obtenidos para encapsular diferentes fármacos en matrices de polímeros.-CD. Según estos trabajos, agregar CD a la red polimérica mejora la solubilidad del fármaco y al mismo tiempo influye en su encapsulamiento y liberación.

Cuadro 2. Ciclodextrinas empleadas en el encapsulamiento de fármacos con polímeros.

CD	Sistema de liberación	Polímero
β -CD	Dendrimeros, hidrogeles, nanoesponjas, nanopartículas sólidas, microesferas bio-adhesivas, micropartículas/microesferas, supositorios, tabletas de disolución rápida, gel	PAMAM [32] PPG [33], EGDE, HPMC [34] ECH [35].
HP- β -CD	Liposomas, microesferas, dendrimeros, micropartículas, nanopartículas, hidrogeles, tabletas bucales, partículas porosas grandes, lipoesferas, crema vaginal, supositorios, aerosol nebulizador, implantes lipídicos, solución parenteral y oral.	PEG, PVA, HA, S [36], PAMAM [32], CS [37, 38], EGDE, HPMC [34], PLGA [39] PACA [40]
DM- β -CD	Microesferas	PEG, PVA, HA, S [36]
OM- β -CD	Microesferas	PEG, PVA, HA, S [36]
M- β -CD	Hidrogeles	EGDE, HPMC [34]
SB- β -CD	Hidrogeles	PEG, PVA, HA, S [36], EGDE, HPMC [34]
β -CDMCT	Tela de celulosa	Celulosa [41]
MCT- β -	Tela con actividad antibacterial	Algodón [42]

CD		
SBE7-β-CD	Perlas	HPMC, PVP [43]
Me-β-CD	tabletas de disolución rápida, gel	CS [44]

Abreviaciones:

βCD: β-ciclodextrina, HP-β-CD: Hidroxipropil-β-ciclodextrina, DM-β-CD: Dimetil-β-ciclodextrina, OM-β-CD: 6-O-maltosil-β-ciclodextrina, M-β-CD: metil-β-ciclodextrina, SB-β-CD: Sulfobutill-β-ciclodextrina, MCT-β-CD: Monoclorotriazinil-β-ciclodextrina, SBE7m-β-CD: Sulfobutill-β-ciclodextrina, PAMAM: Poliamidoamina, PPG: Propilenglicol, EGDE Etilenglicol-diglicidiléter HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa, ECH: Epiclorohidrina, PEG, Polietilenglicol, PVA: Alcohol polivinílico, HA: Ácido hialurónico, S: Almidón; CS: Quitosano, PLGA: Poli(ácido láctico-co-glicólico), PACA: Poli(alquilcianoacrilatos).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Muchos de los fármacos empleados actualmente presentan problemas de solubilidad y/o paso a través de las membranas del organismo, absorción y efectos secundarios no deseados [16, 30, 45, 46]. La aspirina [ácido acetilsalicílico (ASA)] es usado como analgésico, antiinflamatorio y antipirético y el Ibuprofeno (IB) es un fármaco analgésico (aliviar el dolor) y antipirético (fiebre) y antiinflamatorio no esteroideo que funciona de forma rápida y eficaz para aliviar el dolor casi en cualquier parte del cuerpo [47], estos genera problemas secundarios que se ven reflejados en el estómago (dispepsia, erosiones gástricas y duodenales, sangrado y hemorragia) [48].

En los últimos años, la tecnología farmacéutica se ha centrado en el diseño de sistemas de liberación, por ejemplo geles, capaces de controlar la liberación del fármaco, para que ésta se produzca en el lugar preciso para su absorción o efecto y a la velocidad deseada [26, 49].

La gran mayoría de hidrogeles de origen sintético estudiados hasta la fecha presentan problemas de liberación, confinamiento del fármaco y toxicidad por trazas de solventes tóxicos empleados en el proceso de fabricación [30]. Por esta razón se quiere determinar el posible uso de polisacáridos derivados naturales (celulosa y quitina) con inclusión de CD para el encapsulamiento de fármacos a través de la formación de geles por interacción de cargas, aprovechando las características que aporta la CD en cuanto a solubilización y atrapamiento de los fármacos en su geometría de tamaño y forma específica, además de que presenta liberaciones a pH básico. Para ello se requiere de estudios enfocados a desarrollar nuevos geles para el transporte de fármacos, buscando establecer las condiciones para la formación de geles portadores y estudiar su eficiencia de encapsulamiento y liberación.

En los casos en que el gel de CS se emplee en pHs bajos, requiere otro polímero que lo proteja contra la acidez (envolviéndolo), y así cuando el pH va aumentando la capa entérica se disuelve liberando el núcleo recubierto de CS[50]. Por eso se plantea trabajar con bajas dosis de CS y altas de CMC, para logra liberación a pHs neutros y básicos, además investigadores como Tosaki y *otros* indican que el CS y la CMC tienen un buen potencial para ser utilizadas como portadores en sistemas de liberación básica como el colon [51]. Por otro lado, algunas investigaciones reportan que la asociación del CS con poliiones negativos se presenta a pHs por debajo de 6.5 [52].

De esta forma, la pregunta que orienta y delimita el objeto del siguiente proyecto es:
¿Cómo influye la inclusión de CDs en el encapsulamiento y liberación de fármacos modelos a diferentes pHs en hidrogeles preparados a partir de CMC y CS?

CAPÍTULO I. ESTADO DEL ARTE

1.1 ESTADO DEL ARTE

El quitosano, carboximetilcelulosa y ciclodextrina han sido usados por separado y en combinaciones en la preparación de geles con aplicaciones en farmacia. Se han reportado diversos trabajos en la literatura acerca de su uso como agentes de encapsulamiento de fármacos entre los que se encuentran:

1.1.1 Quitosano.

El quitosano (CS) es el producto N-desacetilado de la quitina, un biopolímero natural que se obtiene del exoesqueleto de los crustáceos de los insectos y hongos, caracterizado por una buena biocompatibilidad, baja toxicidad, mucoadhesividad y biodegradabilidad[53]. El CS se disuelve en pH ácido, es por eso que para lograr una liberación a pH básicos requiere de un polímero secundario, un recubrimiento con otro polímero o la adición de agente gelificante que aumente su resistencia [22, 54, 55].

En particular, en cuanto a la liberación controlada de fármacos, diversos estudios han demostrado que el CS puede emplearse tanto para la administración específica en un sitio (mucosa) como para la administración transmucosa, ya que es capaz de promover una absorción rica del fármaco a través de mucosas nasales e intestinales y pobre en mucosas bucales y vaginales, también posee excelentes propiedades de formación de película [53, 54]. Las matrices porosas basadas en CS se ha usado para diferentes aplicaciones, como para la regeneración ósea periodontal, para cultivar islotes pancreáticos y como portadores de péptido/proteína [55].

Es bien conocido que dos de los factores que afectan la formación de hidrogeles a partir de CS y sus propiedades son: su grado de desacetilación y peso molecular [56]. Ko y otros [57] reportaron que incrementar el peso molecular del CS genera partículas más esféricas y disminuye la liberación.

Munjeri [17] logró modificación en la liberación de indometacina y sulfametoxazol encapsulados en gotas de pectina amidada reticulada con calcio, utilizando un complejo polielectrolito de CS alrededor de las perlas, trabajando a pH bajo para reducir la repulsión entre el CS y la pectina. La cantidad total de fármaco liberado durante 5 horas varió de 7.5% a 27.5% para indometacina y de 33% a 65% para sulfametoxazol.

En la literatura que se cita a continuación como se muestran varias investigaciones de geles a partir de alginato y CS. Chen [16] empleó N-O-carboximetilquitosano (NOCC) y alginato con genipina como agente reticulante para encapsular albumina de suero bovino (BSA) y encontró que un pH 1,2 limita el hinchamiento (2,5) por la formación de enlaces de hidrógeno entre NOCC y alginato, mientras que a pH de 7,4 los grupos de ácido carboxílico se ionizan y el gel aumenta su hinchamiento (6,5) por la repulsión electrostática entre los grupos ácidos ionizados. Por otro lado la cantidad de BSA liberado a pH 1,2 fue 20% incrementando a 80% a un pH de 7,4. Gong [46] formó perlas de alginato/ácido N- α -glutámico-quitosano por doble reticulación con Ca^{2+} y suspensión de las perlas en sulfato de sodio para el encapsulamiento de BSA y encontró una baja liberación por debajo del 18% a pH 1,2 y una liberación cerca al 100% a pH 7,4.

Wang y otros [58] fabricaron perlas de hidrogel de quitosano-g-ácido poliacrílico/atapulgita/alginato de sodio (CTS-g-PAA/APT/SA) reticuladas con Ca^{2+} debido a la gelación iónica del SA, para encapsular diclofenaco sódico (DS) y lograron perlas de 4-5 mm que proporcionaban una liberación de 3,76% a pH 2,1 y 100% a pH 6,8 a las 24 h, respectivamente. La liberación del fármaco a pH 6,8 fue controlada por el hinchamiento.

Luo junto con su grupo de investigación [22] prepararon perlas de hidrogel de carboximetilquitosano (CMCS) de 1-2 mm en disolventes binarios alcohol-acuosos y encontraron que la morfología y forma de las perlas dependen de la concentración de

alcohol logrando la mayor esfericidad con 3% de calcio y una concentración de alcohol de 30%. También lograron una eficiencia de encapsulamiento del 96.9% de vitamina D3 empleando glutaraldehído como agente de reticulación química para mantener la integridad del hidrogel y la morfología tras el secado.

Islam [59] usó ortosilicato de tetraetilo (TEOS) para entrecruzar CS y alcohol polivinílico (PVA), encontrando que el encapsulamiento y la liberación disminuyen a medida que la temperatura y la densidad de reticulación aumenta.

Belluzo y su grupo de investigación [60] estudiaron la distribución de tamaños de poros y homogeneidad de superficies con la aplicación de ultrasonido durante la obtención de los hidrogeles de CMC y CS. En ambos casos observaron una estructura tridimensional altamente porosa con buena interconexión entre poros y porosidades superiores al 70%, el diámetro medio de los poros era de $82 \pm 7 \mu\text{m}$ para los geles hechos con ultra sonido frente a $115 \pm 9 \mu\text{m}$ en los que no se usó.

En cuanto a términos de encapsulamiento, se logra buena retención tanto por mezcla directa de los polímeros con el fármaco como por goteo de uno en otro, como en el empleo de CS /ácido poliacrílico, donde se obtuvo una eficiencia de impregnación de aspirina de un 94% mediante su disolución en agua: etanol con una relación de 2:1 y su posterior adsorción durante 24 horas a 25 °C en la mezcla polimérica [61], o el uso de polisacáridos iónicos como el CS o el alginato de sodio con IB seguido por un goteo en las soluciones de contraiones como tripolifosfato o CaCl_2 , que arrojó un encapsulamiento de 98% [62].

Lai y Shum [63] reportaron que usando un derivado de CS injertada con hipromelosa, altamente soluble en agua para formar un complejo polielectrolito con CMC garantiza una eficiencia de encapsulamiento 1-2 veces mayor que la producida al usar CS convencional y una liberación 2-3 veces más sostenida.

Se ha encontrado que el IB tiene interacciones electrostáticas e hidrófobas con el CS y se forman puentes de hidrógeno entre sus cadenas lo que mejora la velocidad de liberación del fármaco y garantiza un mejor encapsulamiento [64].

También se han preparado varios tipos de hidrogeles de carboximetilcelulosa con CS (complejación de polielectrolitos) [29, 65, 66] en mezcla con la sal [67, 68].

1.1.2 Carboximetilcelulosa (CMC)

La carboximetilcelulosa (CMC) es el éster de celulosa más empleado en aplicaciones biomédicas, es un derivado de la celulosa altamente soluble en agua. La interacción de sus grupos con iones metálicos multivalentes permite la formación de geles que son estabilizados por interacciones electrostáticas. Las interacciones entre sus grupos –OH con otros grupos contribuye a la estabilidad e insolubilidad en agua de este agregado polimérico [6, 69].

Los grupos aniónicos de la CMC sódica ($pK_a \sim 4.6$) hacen que ésta sea adecuada para formar hidrogeles y redes interpenetrantes que se encogen a pH ácido reduciendo el grado de hinchamiento debido a la formación de puentes de hidrógeno entre los COOH y los grupos OH; este hinchamiento aumenta a pH neutro y alcalino ya que se ionizan parcialmente los grupos carboxilo y se presenta repulsión electrostática [28, 31, 70]. Es un polímero bioadhesivo que puede adherirse a mucosas, soportando por ejemplo en la boca la salivación, los movimientos y la deglución durante un período de tiempo significativo [53].

Lin y Lin [71] estudiaron el efecto de la concentración de carboximetilcelulosa sódica (NaCMC) en la liberación de la teofilina, observando que a mayor cantidad de NaCMC es más lenta la liberación y más grande el tamaño de las partículas obtenidas.

El sistema coacervado de microesferas de CMC y PVA reticuladas con glutaraldehído para encapsular diclofenaco y 5-fluorouracilo, liberaron más rápido a pH 7,2 que a pH 1,2. Según los autores este comportamiento es debido a la formación de puentes de hidrógenos entre los precursores del hidrogel a pH ácido [72]. Empleando los mismos polímeros y adicionando Fe^{3+} como agente reticulante, Xiao [73] logró liberar hemoglobina a pH 7,4.

Una manera de mejorar el patrón de liberación controlada de la CMC es entrecruzándola con CS [74]. Cui [75] usó CMC para estabilizar las partículas catiónicas de CS formando una coacervación compleja y estudió su aplicación con ADN plásmido como una aproximación a la inmunización genética.

También se han fabricado esferas de goma de semilla de algarrobo y CMC sódica con Al^{+3} como entrecruzante, para encapsular diclofenaco de sodio, logrando una liberación completa del fármaco en medio alcalino y una liberación controlada en medio ácido [76].

Una mezcla de dos polímeros ampliamente usados en la liberación controlada de fármacos, el alginato y la CMC, se emplearon para obtener perlas haciendo gotear una disolución de los polímeros en una solución de cloruro férrico para portar proteínas terapéuticas, revelando que la rugosidad y el tamaño de poro de las perlas aumentan con la proporción en volumen de CMC empleada, y que el volumen de CMC aumenta el encapsulamiento [70].

Por otro lado, la CMC reticulada con moléculas catiónicas de epíclorhidrina, libera más rápido a pH 4, cuando los grupos ácidos carboxílicos no tienen carga y sólo ocurren interacciones débiles entre el fármaco catiónico y el hidrogel; a pH por encima de 4,6; las fuerzas de atracción se hacen más fuertes y la liberación es más sostenida hasta llegar a 9. El aumento adicional en el pH conduce a un aumento en la concentración de iones que debilitan la atracción y aceleran la liberación [28, 77].

Un caso particular ocurre cuando la CMC sódica se esterifica con acrilóilo o cloruro de metacrilóilo donde su hinchamiento se vuelve dependiente del pH y se vuelve insoluble en agua [78].

Zhang e investigadores [79] fabricaron micro-cápsulas de CS y CMC, lograron encapsular BSA en un 75% y encontraron una disminución en la liberación con el aumento de CS en la relación. También reportaron que el medio ácido favorece la interacción electrostática.

Abruzzo y colaboradores [80, 81] reportaron que en la elaboración de hidrogeles a partir de CS y CMC es mejor trabajar con exceso de CMC ya que garantiza mayor encapsulamiento, absorción de agua y velocidad de liberación controlada.

Otra manera de obtener partículas con CMC y CS para el encapsulamiento de fármacos es recubrir microesferas con capas de complejo CMC-CS, para finalmente extraer las microesferas dejando una esfera hueca de complejo polielectrolito [82].

Siritientong y Aramwit [83] encontraron que el peso molecular de la CMC no afecta la morfología de los geles pero que su degradación disminuye con el aumento de éste.

Por otro lado, Wach [84] y otros reportaron que un alto grado de grupos carboxilos promueve reacciones de reticulación.

1.1.3 Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos derivados de almidón que contienen seis (α -CD), siete (β -CD), ocho (γ -CD), nueve (δ -CD), diez (ϵ -CD) o más, unidades de α -D-glucopiranosas unidas mediante enlaces (α 1-4) [85].

Son en forma de cono truncado y poseen una estructura supramolecular tipo celda o jaula (Figura 1). Su superficie exterior es hidrófila y por lo tanto, son generalmente solubles en agua, pero la cavidad interna tiene un carácter menos hidrófilo [86-90].

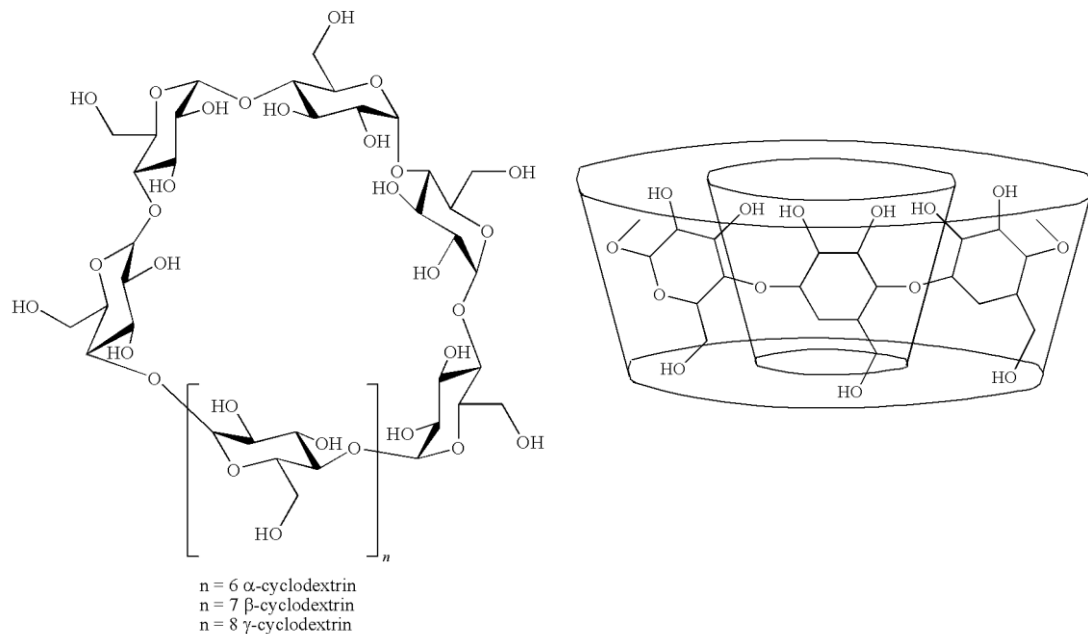


Figura 1. Estructura de la CD [91].

Las moléculas hidrófobas contenidas en muchos fármacos interactúan más favorablemente con β -CD que con α -CD, debido a que las cavidades de la β -CD pueden alojar grupos aromáticos, mientras que el diámetro de la α -CD es más pequeño (Figura 2). La interacción también se puede dar con la γ -CD, pero su costo es muy elevado [92].

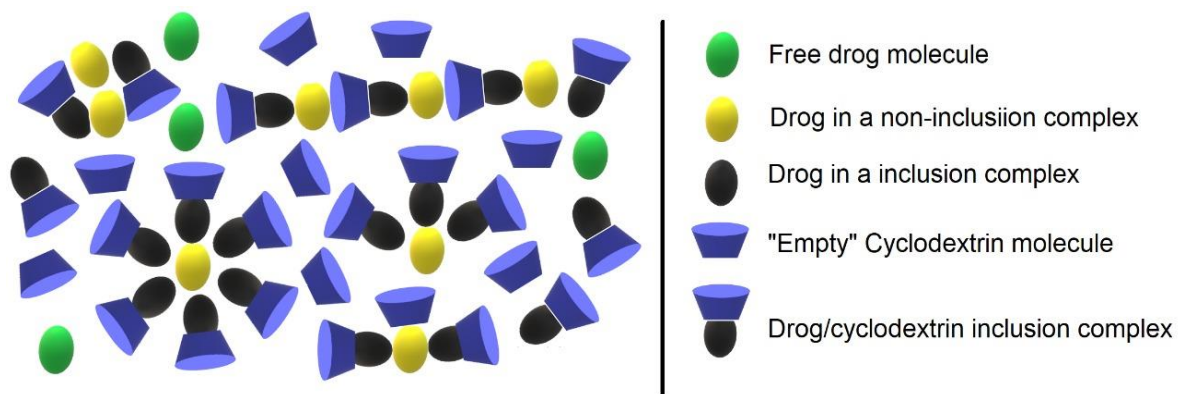


Figura 2. Complejos D:CD

Dos desventajas de la β -CD son su limitada solubilidad en agua (18.6 mg/mL) y la citotoxicidad que presentan si no están modificadas, lo que limita sus aplicaciones farmacéuticas, conduciendo así a un aumento del empleo de β -CD modificadas [88]. La

presencia de carga puede desempeñar un papel significativo en la complejación de fármaco / CD y, por lo tanto, un cambio en el pH de la solución puede variar la constante de formación de complejos. En general, las formas iónicas de fármacos forman complejos más débiles que sus formas no iónicas [93].

Las β -CD catiónicas y la hidroxipropil- β -CD tienen una excelente solubilidad en agua, mejor hemocompatibilidad y no presentan citotoxicidad, además presentan una mejor disponibilidad y rendimiento de suministro de fármacos que la de β -CD [90, 94, 95]. Un ejemplo específico son las poli β -CD catiónica con grupos amonio cuaternarios, las cuales mejoran la solubilidad del fármaco en agua y reducen la actividad hemolítica, en comparación con β -CD sin modificar [94], también generan superior capacidad de carga y liberación controlada de fármacos [90].

La modificación con unidades de hidroxipropilo aumenta la solubilidad de la CD un 60% en peso y producen complejos solubles [93, 96]. La Figura 3 muestra el complejo de asociación IB/ β -CD. Se sabe que en la formación de complejos el IB/ β -CD es considerado como el más estable [97].

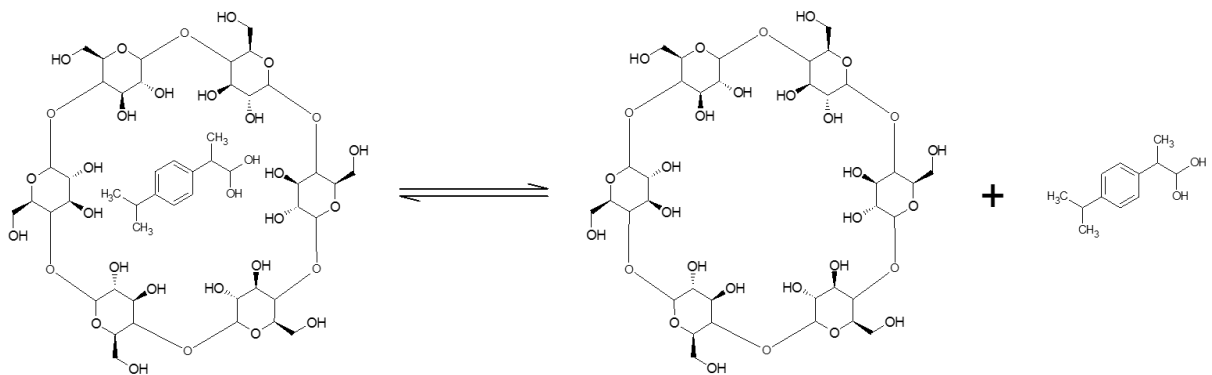


Figura 3. Complejo IB: β -CD

Algunos polímeros realzan el efecto de solubilización de CD, debido a su participación directa en la complejación de fármacos, mejorando las propiedades biológicas de los complejos fármaco:CD [93]. Los polisacáridos son ampliamente usados para la liberación de fármacos por la facilidad de modificación de su estructura [13, 14]. Un tipo de

polisacáridos ampliamente usado son los iónicos, que pueden ser fácilmente reticulados para hacer redes de geles y son sensibles a una variedad de agentes externos e internos con lo que se logra la liberación controlada de fármacos [27, 28]. La adición de polímeros solubles en agua al medio que contiene al complejo CD: Fármaco, incrementa la complejación del fármaco, así se necesita menos CD aumentando las propiedades biológicas y farmacéuticas del fármaco [98].

Las cavidades hidrófobas internas de las CDs facilitan la inclusión de moléculas huéspedes estabilizadas por interacciones no covalentes, capaces de formar complejos de inclusión con los fármacos, además son capaces de alterar el patrón de liberación, cambiando la solubilidad e incrementando la estabilidad de los fármacos y de aumenta su permeabilidad [88, 92-94, 99]. En el caso de disposición oral, las CDs no son hidrolizadas ni absorbidas por el estómago ni el intestino delgado, sin embargo, la micloflora presente en el colon la rompe en pequeños sacáridos permitiendo su absorción [50].

También se han aplicado otros derivados de CDs, logrando buenas separaciones usando amino 6-monoamino-6-monodesoxi- β -CD permetilado y heptakis (2,3-dimetil-6-amino-6-desoxi) - β -CD, porque las cargas opuestas pueden mostrar altas CE [29]. El heptakis (2,3-di-O-metil-6-amino) - β -CD fue el mejor [100].

Se han realizado microgeles de poli- β -CD y CMC, usando cloruro de benzoato (2-hidroxietyl) trimetilamonio como entrecruzante, para encapsular calceína. La liberación total ocurrió a pH 3, por la protonación de los ácidos carboxílicos que causa desintegración, mientras que a un pH de 8 se logró una liberación del 23% en un tiempo de 24 horas, la cual incrementó a 47% a pH 11 debido a la disminución de la densidad de entrecruzamiento [90].

También se conformaron nanopartículas por la gelación de CS y carboximetil- β -CD, con un tamaño de entre 231 a 383 nm y un potencial z positivo variante entre 20,6 y 39,7 mV. Este complejo se preparó para la incorporación de insulina y heparina, con una eficiencia de asociación de respectivamente 85,5 a 93,3 y 69,3 a 70,6% y un aumento del tamaño de las partículas (366-613 nm), pero sin modificar significativa los potenciales z (23,3 a

37,1 mV). En cuanto a la liberación de fármaco, lograron una estabilidad en fluido intestinal simulado a pH 6,8 y 37°C durante al menos 4h [101].

Una coacervación alginato/CS con β -CD para encapsular insulina mostró una cinética de liberación que difiere con el tiempo de acomplejamiento, siendo 1 h el menor tiempo requerido para una rápida liberación. Por otro lado la cantidad de insulina disponible aumenta con la cantidad de β -CD empleada y su aumento también disminuye la agregación de fármaco, e incrementa su liberación en fluido intestinal simulado [88, 99].

Existen varios trabajos que reportan la inmovilización de CD sobre el CS para obtener un material para transportar fármacos. Chen y otros [102] inmovilizaron la CD en la posición 6-OH en vez de la 2-NH₂ para no suprimir las propiedades del CS y permitir su uso en la formación de membranas. Kono y colaboradores injertaron [103] CD en carboximetilquitosano encontrando un incremento en la cantidad de ASA absorbido y una disminución en la velocidad de liberación, relacionado con el aumento de CD incorporado en los geles.

La CMC y la β -CD forman hidrogeles apropiados para encapsular fármacos, los cuales disminuyen su capacidad de hinchamiento con el incremento de CD usado en la preparación. Estos hidrogeles mostraron ser útiles para el encapsulamiento de bisfenol A [104].

También se ha investigado la formación de membranas por capas de polielectrolitos de β -CD aniónicos (entrecruzamiento entre ácido cítrico y β -CD) y catiónicos (entrecruzamiento entre epíclorhidrina y β -CD en presencia de cloruro de glicidiltrimetilamonio) empleando termo fijación (enlazamiento térmico), encontrando que el aumento de los grupos amonio del polímero catiónico incrementa el encapsulamiento de ácido benzoico de ter-butilo [105].

Yalcin y otros [106] prepararon hidrogeles a partir de HP- β -CD con alginato o CS para tratar la formación de amiloides (Ab) responsables del Alzheimer y encontraron que su administración nasal disminuye significativamente la fragmentación del ADN y aumenta la función mitocondrial proporcionando protección contra la neurotoxicidad inducida por Ab.

CAPITULO II. OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GENERAL

Sintetizar hidrogeles a partir de carboximetilcelulosa, quitosano y ciclodextrinas modificadas mediante interacción de cargas para el encapsulamiento y liberación de fármacos.

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de las condiciones de preparación sobre las propiedades fisicoquímicas de geles preparados a partir de carboximetilcelulosa (CMC) con Quitosano (CS) por interacción de cargas.
2. Evaluar la eficiencia de encapsulación de ASA en los hidrogeles.
3. Establecer el efecto del uso de β -ciclodextrinas (HP- β -CD y A- β -CD) en la formación de hidrogeles y la eficiencia de encapsulamiento de IB.
4. Identificar el efecto de estímulos externos en la liberación controlada de fármacos y degradación enzimática del hidrogel.

CAPITULO III. MATERIALES Y MÉTODOS

PROPUESTA METODOLÓGICA

La Figura 4 muestra la metodología seguida en el desarrollo de la investigación.

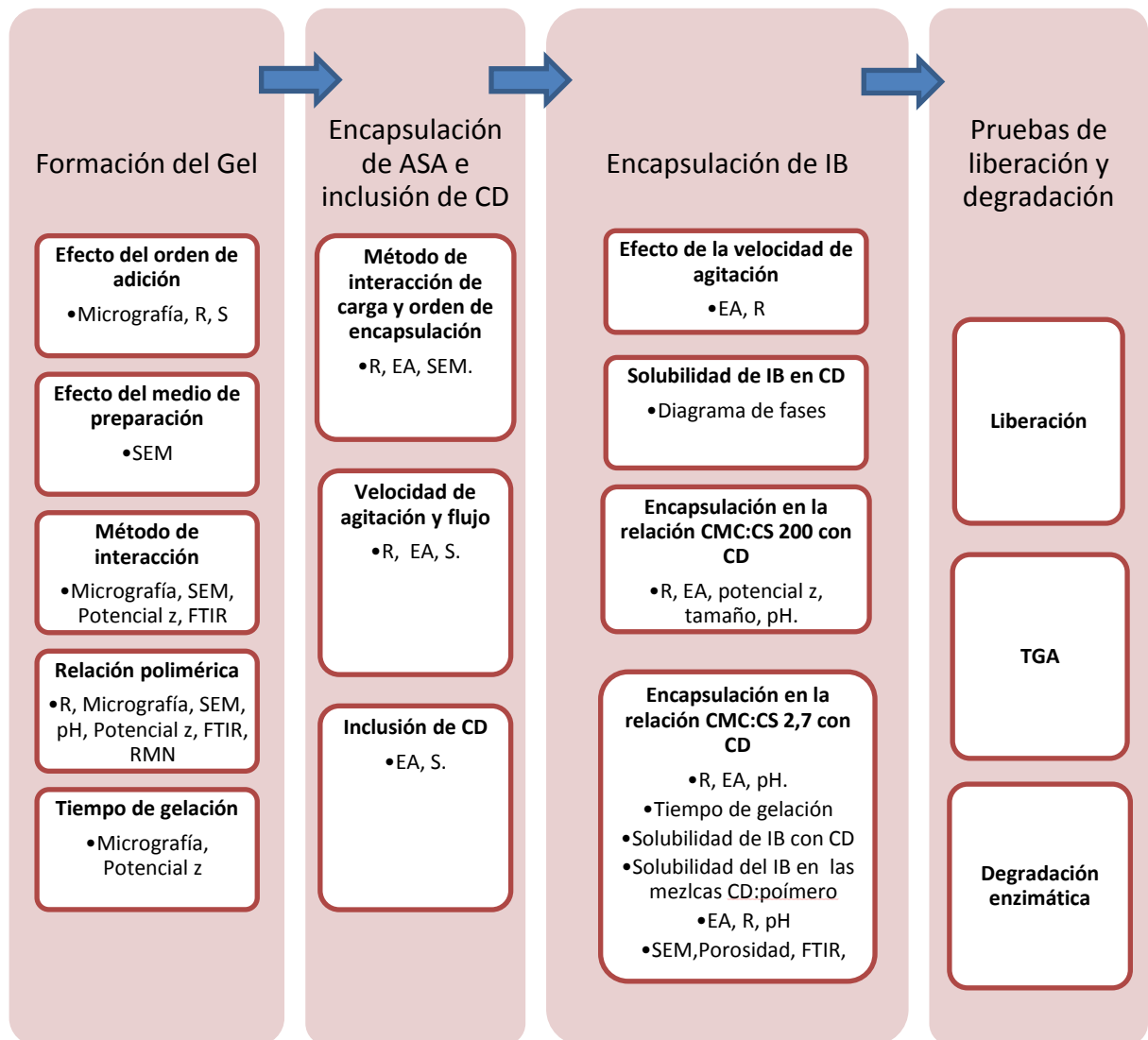


Figura 4. Propuesta metodológica

MATERIALES

A continuación se mencionan los reactivos empleados en el desarrollo experimental.

Polímeros:

Carboximetilcelulosa (CMC): Sal de carboximetilcelulosa de sodio, Mw ~250.000, grado de sustitución 0,7. Sigma Aldrich, CAS 9004-32-4.

Quitosano (CS): Quitosano, Mw ~250.000, deacetilación 75-85%, Sigma Aldrich, CAS: 9012-76-4.

Ciclodextrinas:

Amino- β -ciclodextrina (A- β -CD): Heptakis-(6-Amino-6-Deoxy)- β -ciclodextrin heptahydrochloride, Cyclolab, code: CY-2065. Fórmula Molecular: $C_{42}H_{84}O_{28}N_7Cl_7$, Mw ~ 1383.3, posibles impurezas: Beta-ciclodextrina, hidracina.

Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD): KLEPTOSE® HPB Hidroxipropil- β -ciclodextrina, Roquette, Batch E0208, EP-USD/NF, DPO DV993X1/1, FAES FARMA, S.A. Fórmula Molecular: $-CH_2CHOHCH_3$. Sustitución: 0,65; Mw ~1400, solubilidad en agua > 600 mg/L.

β -ciclodextrina (β -CD). Sustitución: 0, Mw ~1135, solubilidad en agua 18,5 mg/L.

Fármacos:

Ácido acetilsalicílico (ASA): Sigma Aldrich, CAS: 50-78-2.

Ibuprofeno (IB) $\geq 98\%$ (GC), Sigma Aldrich, CAS: 15687-27-1.

Otros:

Cloruro de Calcio (CaCl_2): Cloruro de Calcio dihidratado, Carlos Erba, Fórmula química $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CAS: 10035-04-8.

MÉTODOS

Los métodos experimentales se presentan a continuación:

3.1 FORMACIÓN DEL GEL

3.1.1 Efecto del orden de adición del polímero sobre la formación de gel

El orden en que se adicionan los polímeros en la formación de gel por interacción de cargas tiene efectos en la morfología y posterior encapsulación y liberación de fármacos. Con el fin de evaluar el efecto de cambiar la secuencia de adición y concentración de los polímeros en la formación de los hidrogeles, se tomaron como base una densidad de carga para el CS de 0,3 meq/g [107]. Se prepararon soluciones de polímero a concentraciones tales que pudieran pasar a través de la aguja y formar una gota separada sin problemas de fluidez ($\text{CMC} \leq 2\%$) [108].

El CS elegido tiene un peso molecular medio y un grado de acetilación de 75 a 85% que según Zhou y *otros* [56] son condiciones óptimas para la obtención de hidrogeles. En cuanto a la CMC también se eligió un peso molecular medio y un bajo grado de sustitución (0,7) por recomendaciones de la literatura, como indican Angelova y Hunkeler[109] y Kaihara y *otros* [110].

Para solubilizar los polímeros fue necesario dejar cada solución bajo agitación magnética durante 24 horas. La concentración de CMC se fijó en 0,75% p/v, mientras que se

emplearon dos preparaciones CS (0,01 y 0,75% en ácido acético 1% v/v), llamando las relaciones CMC/CS 75 y 1.

Aproximadamente 10 mL de solución de CMC se dejó caer a través de una aguja (21 G) desde una jeringa de plástico a un vaso de precipitado que contenía 10 mL de una de las soluciones de CS (0,01 y 0,75%), bajo agitación suave (600 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se agitó durante otros 20 minutos y el hidrogel se mantuvo 24 horas a temperatura ambiente, para alcanzar el equilibrio[111]. Posteriormente se realizó otro gel agregando el CS sobre el CMC. (Figura 5).

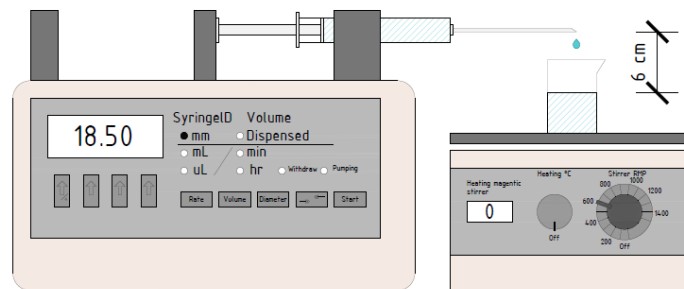


Figura 5. Montaje. Formación del gel.

Finalmente la decisión de cuál polímero se goteaba se tomó basado en la comparación entre las micrografía, rendimientos e hinchamiento libre de los geles obtenidos por la metodología descrita anteriormente.

3.1.2 Efecto del medio de preparación en la obtención del gel

Para decidir las condiciones del medio de los geles, se tomó la relación más alta (CMC/CS 200) debido a que la alta concentración de CMC generaba mayor carga y modificación del medio y se realizaron geles en medios a pH 3 y 6 (controlando la variación del pH con NaOH y HCl 0,1N a medida que se gotea el CMC sobre la solución catiónica). Otro medio fue preparar la solución catiónica ácido acético con una solución de

etanol al 30% antes de la gelación. Finalmente, otra opción fue disolver la CMC en una solución NaCl 200mM la cual fue goteada sobre la solución catiónica. La morfología de estos geles se comparó con la de un gel realizado sin control del medio, para determinar la manera en que se realizarían.

3.1.3 Comparación entre métodos de interacción de cargas para la obtención de los hidrogeles

Se realizaron geles por interacción de cargas entre los polímeros, entre la CMC y el CaCl_2 y una mezcla de los 3 compuestos y se compararon por medio de micrografía, SEM, potencial z, FTIR. Se prepararon tres muestras de gel para cada sistema con el fin de comparar los resultados. La manera en la que se obtuvieron los geles fue la siguiente:

Gelación ionotrópica: El CMC se disolvió en agua desionizada (a la concentración deseada) y se gotearon aproximadamente 10 mL de esta solución por medio de una bomba New Era Pump System Inc., través de una aguja (21 G) usando una jeringa de plástico, sobre un vaso de precipitado que contenía 10 mL de la solución de CaCl_2 , solubilizado bajo agitación magnética, durante 2 horas aproximadamente. El tiempo de agregación fue de 10 minutos y el tiempo total de mezcla, sumando los minutos de goteo, fue de 30 minutos, debido a que el tiempo de agregación no tiene efecto después de 30 minutos [112]

Con el fin de completar la reacción, el hidrogel se dejó en equilibrio aproximadamente 24 horas [111]. Después, la muestra se centrifugó a 3300 rpm durante 30 minutos y el precipitado se eliminó del sobrenadante. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada y se separaron de nuevo por centrifugación, para eliminar la mayor cantidad posible de residuos.

Complejo de Polielectrolito: El procedimiento siguió la metodología similar a la descrita anteriormente. Se usó una solución CS en ácido acético al 1% p/v como agente catiónico, en lugar de CaCl_2 . La mezcla (después del goteo) se agitó en las mismas condiciones durante 20 minutos y luego, el hidrogel se mantuvo durante 24 horas a temperatura ambiente hasta que se alcanzó el equilibrio. La muestra se centrifugó y el precipitado se

eliminó del sobrenadante. Finalmente, los geles se lavaron con agua destilada y se separaron de nuevo por centrifugación.

Preparación de geles mediante complejación polielectrolítica y gelación ionotrópica simultánea: Se llevó a cabo una mezcla de ambos procedimientos solubilizando el CaCl_2 en la solución CS (2 horas de agitación), y luego se dejó caer la CMC en esta mezcla. Después se siguió la metodología de separación descrita antes.

Para evaluar el efecto del orden de agregación en el método de complejación de polielectrolitos se usó una concentración de CS 0,016% p/v y se goteó sobre una solución de CMC al 0,8% p/v.

3.1.4 Influencia de la relación polimérica CMC/CS sobre el gel

Para evaluar el efecto de la relación CMC/CS, la concentración de CS se fijó en 0,01% p/v (disuelto en ácido acético al 1% v/v) para evitar problemas de viscosidad cuando se mezcla con polímeros aniónicos a altas concentraciones [120]. Los geles se prepararon empleando como polímero aniónico la CMC a 2%; 0,75%; 0,32%; 0,21% y 0,027% p/v. Las fracciones poliméricas CMC/CS quedaron fijas en 200, 75, 32, 21 y 2,7 y se caracterizaron por Rendimiento, Micrografía, SEM, pH, Potencial z, FTIR y RMN (Estas caracterizaciones se describen en el numeral 3.4).

3.1.5 Efecto del tiempo de gelación

Con el fin de evaluar el efecto producido por el tiempo de gelación sobre la morfología de los hidrogeles, se tomó la relación 21 evaluadas anteriormente y se detuvo la complejación después de los 20 minutos de agitación, en ese momento, el complejo polimérico se separó para medir su potencial z y ser observado por microscopía óptica.

3.2 ENCAPSULACIÓN DE ASA

3.2.1 Formación de hidrogel y posterior encapsulación de ASA

Para la formación del gel se tuvo en cuenta el rendimiento encontrado para cada relación CMC/CS y se elaboraron geles según las relaciones poliméricas mencionadas anteriormente, goteando un volumen del polímero aniónico (7, 40, 70 y 90 mL) sobre un vaso de precipitado que contiene el mismo volumen de la solución del polímero catiónico y/o CaCl_2 (dependiendo del método empleado) que se encontraba sobre una placa con agitación (dando entre los dosel volumen final indicado en la tabla). Las concentraciones de CaCl_2 se evaluaron a 0 y 0,09 M en la solución del polímero catiónico.

El tiempo total de mezcla fue de 30 minutos y se siguió con procedimiento tal y como se describió anteriormente en el numeral 3.1.3. Ver Tabla 1.

Tabla 1. Relación CMC/CS: CaCl_2 en la formulación de los geles

Relación CMC/CS	CMC (mg)	CS (mg)	CaCl_2 (mg)	Volumen final (mL)
200	140	0,7	0	14
75	300	4	0	80
21	147	7	0	140
2,7	24,3	9	0	180
200	140	0,7	0,093	14
75	300	4	0,531	80
21	147	7	0,93	140
2,7	24,3	9	1,196	180

El gel formado se lavó para retirar el CaCl_2 que no fue incorporado al hidrogel y se secó a 60°C. Posteriormente se depositó en un recipiente que contenía una solución de ASA 250 ppm y se agitó a 250 rpm, finalmente la suspensión se dejó en reposo a temperatura

ambiente por 24 horas (tiempo para garantizar formación del gel y la penetración del ASA) y el gel obtenido se lavó y secó a 60°C. A los geles se les determinó la EA y se observaron por SEM.

3.2.2 Formación simultánea de hidrogel con encapsulamiento de ASA

Para evaluar la encapsulación de ASA durante la formación del gel, se goteó el polímero aniónico sobre un vaso de precipitado que contenía la solución del polímero catiónico y CaCl₂ mezclada con el ASA, a condiciones similares a las del numeral anterior y se dejó gelar por 24 horas. Las concentraciones de CaCl₂ se evaluaron a 0 y 0,09 M en la solución del polímero catiónico. La concentración del fármaco en la solución final se fijó a 250 ppm. Las cantidades empleadas en la elaboración se listan (Tabla 2).

Tabla 2. Relación CMC/CS: CaCl₂:ASA en la formulación de los geles

Relación CMC/CS	CMC (mg)	CS (mg)	CaCl ₂ (mg)	Volumen final (mL)	ASA (mg)
200	140	0,7	0	14	3,5
75	300	4	0	80	20
21	147	7	0	140	35
2,7	24,3	9	0	180	45
200	140	0,7	0,093	14	3,5
75	300	4	0,531	80	20
21	147	7	0,93	140	35
2,7	24,3	9	1,196	180	45

Estos geles se caracterizaron por Rendimiento, EA y se observaron por SEM.

3.2.3 Efecto de la velocidad de dosificación y de agitación

Con el fin de evaluar el efecto de los parámetros de elaboración del fármaco sobre sus propiedades, se realizó un diseño de experimentos con 8 ensayos para el estudio del efecto de la velocidad de dosificación y de agitación sobre la eficacia de asociación de

ASA, el rendimiento y el porcentaje de hinchamiento libre (%adsorción de agua), para el gel que registró mayor encapsulación (relación 200), usando como parámetros: velocidades de agitación de 400 y 800 rpm y flujo de agregación de 40 y 80 mL/h. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza, los datos fueron procesados utilizando el software *Statgraphics Centurion XVII*.

3.2.4 Inclusión de CD

Continuando con la búsqueda del aumento de EA de ASA, se incluyó HP- β -CD en los geles, empleando una relación CMC/HP- β -CD de 1 y reduciendo la relación CMC/CS a 100. Para ello se adicionó ASA a la solución acuosa de CS y CD, seguido por el goteo de CMC sobre éstas. Todo el proceso se realizó bajo agitación magnética continua durante el goteo y hasta completar media hora. El sistema se dejó en equilibrio durante 24 horas, tal como se obtuvo el gel sin CD.

3.3 ENCAPSULACIÓN DE IB

3.3.1 Efecto de la velocidad de agitación y el flujo de CMC en la encapsulación del IB en gel

Tomando como referencia las mejores condiciones para encapsular ASA (2% de CMC, 0,01% de CS, relación CMC/CS 200 y un flujo de 80 mL/h), determinada en el numeral 3.2.2, la cual arrojó un 70% de eficacia de encapsulación, determinada por UV (Shimadzu espectrometro UV-vis UV-1603,Japan), se decidió tomar estas mismas condiciones encapsular el, dado que este es parcialmente soluble en agua se usó una cantidad 0,6 mg de IB de manera que se solubilizara completamente en los 7 mL de solución de CS usada en la formación del hidrogel.

En estas pruebas se fijó la masa de gel seco en 0,3 g; por lo tanto para la relación 200 se elaboró el gel goteando un volumen del polímero aniónico (7 mL) sobre un vaso de precipitado que contenía el mismo volumen de la solución del polímero catiónico (CS) con

el IB solubilizado. La formación se realizó según lo descrito anteriormente en el numeral 3.2.2.

La cantidad de IB encapsulado se determinó empleando espectrometría UV a una longitud de onda de 264 nm[113], midiendo la concentración en el sobrenadante después de separar el gel. A las muestras también se les determinó el rendimiento.

3.3.2 Solubilidad del Ibuprofeno con las ciclodextrinas

El IB presenta muy poca solubilidad en agua (0,05 mg/mL de agua)[114], valor que se pretende aumentar con la inclusión de CDs. En este ensayo se utilizó la técnica de diagramas de solubilidad de fases para analizar la capacidad de solubilización del IB con diferentes CD y se determinó la eficiencia de complejación (CE) de las CDs para evaluar la eficiencia de solubilización del IB, es decir, determinar la relación entre la concentración de complejo, CD y fármaco libre [115]. La CE se calculó a partir de la pendiente de los diagramas de solubilidad de fases, siendo este parámetro independiente de la solubilidad del principio activo (S_0).

Los diagramas de solubilidad de fases se obtuvieron mediante la representación de la solubilidad frente a la concentración de CD[116]. La constante aparente de estabilidad, suponiendo la formación de complejos de inclusión de una CD con estequiometría 1:1 ($K_{1:1}$), se calculó a partir de la pendiente y la intersección de la recta con la ecuación 1.

$$K_{1:1} = \frac{\text{Pendiente}}{S_0(1-\text{Pendiente})} \quad \text{Ecuación 1}$$

Se determinó la eficiencia de complejación (CE) por medio de la Ecuación 2.

$$CE = S_0 * K_{1:1} = \frac{[D:CD]}{[CD]} = \frac{\text{Pendiente}}{1-\text{Pendiente}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Por otra parte, la relación fármaco: CD [D:CD] se calculó a partir del valor de CE con la Ecuación 3.

$$[D:CD] = 1 + \frac{1}{CE}$$

Ecuación 3

Para elaborar los diagramas de solubilidad se añadieron cantidades en exceso de IB a una serie de soluciones acuosas de concentraciones crecientes de CD, entre 0 y 1,5 % p/v para la β -CD, y entre 0 y 10 % p/v para la HP- β -CD y A- β -CD (por su solubilidad en agua), contenidas en eppendorf (tubos de polipropileno con tapón plano hermético de 0.5 mL) y se agitaron a 25°C y 100 rpm durante 4 días con el fin de alcanzar el equilibrio. Después, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 12500 rpm, posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante para preparar las diluciones y determinar la concentración de IB que se logró solubilizar con ayuda de un espectrofotómetro UV empleando una longitud de onda de 264 nm. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3.3 Encapsulación de IB en el gel CMC/CS con HP- β -CD y A- β -CD en la relación CMC/CS 200

Con el fin de estudiar la influencia de la presencia de los dos polisacáridos que forman el hidrogel en el complejo D:CD, se determinó la formación de gel y la encapsulación de IB, en el gel que más ASA encapsuló, a la velocidad de flujo y de agitación elegidas anteriormente, usando HP- β -CD y A- β -CD.

Para ello se adicionó IB a la solución acuosa de CS y CD seguido por el goteo de CMC sobre éstas. Conociendo que para la relación mayor (CMC/CS 200) hay exceso de carga aniónica, se buscó mantener la relación másica aniónico/catiónica empleada anteriormente, reemplazando con CD (HP- β -CD) la parte retirada de CMC.

Todo el proceso se realizó bajo agitación magnética continua durante el goteo y hasta completar media hora. Se siguió el mismo procedimiento del gel sin CD. Los geles obtenidos se caracterizan por medio de su rendimiento, eficacia de asociación, potencial z, tamaño y pH ((Estás caracterizaciones se describen en el numeral 3.4).

La Tabla 3 muestra las relaciones empleadas de CMC/HP- β -CD para encapsular IB. Cuando no se empleó CD sólo se pudo trabajar con 1 mg de IB para garantizar su solubilidad, al agregar la CD esta cantidad se pudo aumentar al doble.

Tabla 3. Relaciones empleadas de CMC/HP- β -CD.

Muestra	CMC (mg)	CS (mg)	CD (mg)	IB (mg)
1	140	0,7	0	1
2	100	0,7	40	2
3	80	0,7	60	2
4	70	0,7	70	2
5	60	0,7	80	2
6	40	0,7	100	2

Posteriormente, se realizó un gel con A- β -CD a la mejor relación encontrada de HP- β -CD

3.3.4 Encapsulación de IB en el gel CMC/CS con HP- β -CD y A- β -CD en la relación CMC/CS 2,7

La relación CMC/CS 2,7 sin CD no presentó encapsulación, por eso se propuso trabajar esta relación 2,7 y determinar el efecto de la inclusión de CD. Para esto inicialmente se trabajaron dos cantidades másicas de CD, igualando la másica de CMC (24,3 mg CD) en una prueba y en otra la de CS (9mg CD), manteniendo la proporción CMC/CS (Tabla 4).

Tabla 4. Relaciones empleadas de CMC/HP- β -CD.

Muestra	CMC (mg)	HP- β -CD(mg)	CS (mg)	IB (mg)
1	24,3	0	9	4
2	24,3	24,3	9	10
3	24,3	9	9	10

En la Tabla 5. Relaciones empleadas de CMC/HP- β -CD.se listan las otras concentraciones de CD empleadas, En la muestra 3 la relación CMC/CS es 1,35 y por la poca cantidad de HP- β -CD se redujo también la cantidad de IB.

Tabla 5. Relaciones empleadas de CMC/HP- β -CD.

Muestra	CMC (mg)	HP- β -CD(mg)	CS (mg)	IB (mg)
1	24,3	0	9	4
2	24,3	125	9	4
3	12,15	4,5	9	2

Posteriormente, a se realizó un gel con A- β -CD a la mejor relación encontrada de HP- β -CD

Para fijar el tiempo de encapsulación de IB óptimo, se realizaron geles a una relación CMC/CS de 2,7 con 9 mg HP- β -CD y se determinó por UV la encapsulación a las 0, 6, 9 y 12 y 24 horas, a una longitud de onda de 264 nm.

La caracterización de los geles se realizó determinando su rendimiento, eficacia de asociación y pH.

Para determinar la influencia que tuvo la mezcla polímero/CD en la encapsulación y formación de los geles, se evaluó la solubilidad del IB agregándolo en exceso a cada una de las siguientes relaciones: CMC/HP- β -CD 2,7/1, CS/HP- β -CD 1/1, y HP- β -CD 1mg HP- β -CD/mL de solución, las cuales se agitaron a 25°C y 100 rpm durante 4 días con el fin de alcanzar el equilibrio. Posteriormente, las muestras se centrifugaron durante 30 minutos a 12.500 rpm y se determinó la concentración de IB que se logró solubilizar con ayuda de un espectrofotómetro UV, empleando una longitud de onda de 264 nm. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS HIDROGELES

A continuación, se listan las técnicas empleadas para la caracterización de los geles obtenidos, las cuales se emplearon según los requerimientos de cada método.

3.4.1 Morfología

Para caracterizar la morfología de los geles húmedos, se colocó una gota de la muestra en un portaobjetos con una gota de agua para dispersar el gel antes de la observación. Luego se colocó un cubreobjetos y la muestra se observó bajo un microscopio óptico (Leica DMREB, software LAS, versión 7.1 Cámara Leica DFC320).

La morfología del gel seco se observó a partir de muestras de gel congeladas con nitrógeno líquido, y luego liofilizadas (24 horas en vacío a -50°C). Las muestras se analizaron mediante microscopio electrónico de barrido HITACHI TM-1000 (Hitachi High-Technologies Inc., Japón. –SEM- Phenom ProX scanning electron microscope, sin preparación previa.

3.4.2 Hinchamiento libre

La capacidad de hinchamiento libre de los hidrogeles (adsorción de agua) (Ecuación 4) se determinó de la siguiente manera: las muestras se secaron hasta peso constante en un horno a 60 °C; luego se pesaron y rehidrataron en agua destilada durante 24 horas. La diferencia de peso se registró y las muestras de gel se secaron nuevamente [117].

$$S = \left(\frac{W_a - W_g}{W_g} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde W_g es el peso seco y W_a es el peso del gel hinchado.

3.4.3 Rendimiento

Las muestras de hidrogel obtenidas se secaron en un horno a 60°C hasta un peso constante para calcular el rendimiento, se realizaron 3 repeticiones de cada muestra (Ecuación 5) [117].

$$R = \left(\frac{W_g}{W_p} \right) \times 100$$

Ecuación 5

Donde W_g es el peso seco del hidrogel y W_p es el peso de los productos utilizados para la preparación del gel.

3.4.4 Potencial z

La distribución de carga (potencial z) y el tamaño de las partículas en el gel se midieron entre 20 y 24 horas después de la preparación para los geles dejados en equilibrio, e inmediatamente después de la formación para las veces en las que se comparó el tiempo de gelación, se determinó el potencial de 3 muestras por relación polimérica.

Se utilizó un Zetasizer Nano ZS90 con cubetas DS170 con ácido acético como medio de dispersión para el CS y agua como medio de dispersión para los hidrogeles y la CMC.

3.4.5 FTIR

Los espectros FTIR de muestras de gel seco se registraron en un espectrómetro FTIR de Perkin-Elmer, modelo Spectrum GX con una unión para reflectancia total atenuada (ATR) y un cristal de diamante. Los espectros se tomaron entre 4000 y 600 cm^{-1} con una resolución de 4,00 cm^{-1} y 16 escaneos.

3.4.6 RMN

La relación 200 con CaCl_2 (un polication) se analizó con un espectrómetro de Resonancia Magnética Nuclear de sólidos (RMN) ^{13}C para determinar la interacción de los polímeros y el CaCl_2 en el gel obtenido. El equipo en el que se midieron las muestras es un equipo de RMN Jeol Modelo ECA600 de 600MHz. Usando la sonda DOTY de 4mm de diámetro del

porta muestras (rotor) para medición de sólidos de dos canales (1H y X) y el experimento fue de CPMAS.

3.4.7 Porosimetría

La distribución del tamaño de poro se evaluó mediante porosimetría de intrusión de mercurio utilizando un Micromeritics Autopore IV 9500 (Norcross, GA, EE. UU.) Equipado con un penetrómetro de 3 mL para sólidos (Se realizó una muestra por prueba).

3.4.8 Eficacia de encapsulación

La cantidad de fármaco encapsulado se determinó por diferencia frente a la cantidad de fármaco en el sobrenadante por UV a una longitud de onda de 225 nm para el ASA y 264 nm para el IB, la evaluación se realizó por triplicado. La eficacia de asociación (EA) se determinó por medio de la Ecuación 6:

$$\%EA = \left(\frac{W_a}{W_s}\right) \times 100 \qquad \text{Ecuación 6}$$

Donde W_s es la concentración inicial de fármaco en la solución, y W_a la concentración de fármaco asociado al gel.

3.4.9 Hinchamiento

Las condiciones de hinchamiento se evaluaron incubando los geles CMC/CS y CMC/CD/CS liofilizadas (de peso conocido) en 50 mL de solución buffer y agitando a 200 rpm y 37°C, se midieron 3 repeticiones por muestra. Se usaron pHs fijos para que los resultados fueran extrapolables a otras vías de administración y no únicamente a la administración por vía oral (absorción gastrointestinal):

pH 1,2 que simula el pH del estómago (donde normalmente el gel comienza a liberar el fármaco)

pH 5,8 representa la primera porción del intestino delgado, que es donde el fármaco, dependiendo de sus características fisicoquímicas, comienza a absorberse

pH 7,4 es la última porción (intestino grueso), donde se da la absorción.

El hinchamiento (Q_s) se cuantificó por diferencia de pesos, mediante la Ecuación 7, secando los geles antes de cada pesada con papel filtro para eliminar el exceso de solución buffer.

$$Q_s = \left(\frac{W_s - W_d}{W_d} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde W_s es el peso de la muestra húmeda luego del proceso de hinchamiento y W_d es el peso de la muestra seca.

3.5 PRUEBAS DE LIBERACIÓN Y DEGRADACIÓN DE LOS GELES

3.5.1 Liberación de fármaco a diferentes pH

Las condiciones de liberación se evaluaron por triplicado incubando muestras liofilizadas (de peso conocido) en 50 mL de solución buffer y agitando a 200 rpm y 37 °C. Se usaron pHs fijos para que los resultados sean extrapolables a otras vías de administración y no únicamente a la administración por vía oral (absorción gastrointestinal) (pH 1,2, 5,8 y 7,4)

Se realizó un estudio de la liberación en el tiempo (Ecuación 8). La cantidad de fármaco liberado se siguió por espectrofotometría UV (225nm para el ASA y 264nm para el IB)

$$\%Rf = \left(\frac{W_t}{W_0} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde W_0 es la concentración inicial de fármaco en el gel, y W_t la concentración de fármaco liberado en tiempo t

La liberación controlada se realizó midiendo la concentración en tiempos específicos (Ecuación 9) (R_c = liberación de fármaco en un tiempo fijado).

$$\%R_c = \sum \left(\frac{W_t}{W_0} * 100 \right)_t \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde t es un intervalo de tiempo fijado de liberación de fármaco [118].

3.5.2 Pruebas de degradación térmica y enzimática

Termogravimetría TGA

Para evaluar el efecto de la temperatura, los geles deben soportar la temperatura del cuerpo humano (entre 35 y 38 °C), por medio de un estudio de termo-gravimetría (TGA) se determinó la despolimerización y los cambios de los polímeros con la pérdida de agua.

Para esta prueba se utilizó un analizador termogravimétrico AutoTGA 2950HR V5.4A de 25 a 350 °C bajo una atmósfera de nitrógeno a una velocidad de calentamiento de 5°C min⁻¹, con el software Universal V3.5B TA Instruments.

Degradación Enzimática

La degradación enzimática se evaluó por tripicado colocando las esponjas en 50 mL de tampón pH 5,8 de α -amilasa (12000 UI/L). La agitación y la temperatura del medio se fijaron en 200 rpm y 37°C, respectivamente. A intervalos de tiempo predeterminados, se retiraron las esponjas de la solución de α -amilasa y se sumergieron durante 10 min en HCl 0,1 N para desactivar la enzima. Finalmente, las muestras se secaron en un horno a 105 °C durante 12 h y se pesaron (metodología 1).

En otra serie de experimentos, las esponjas también se preincubaron en HCl 0,1 N durante diferentes períodos de tiempo (15, 30, 60 y 120 min), a continuación, se retiraron y se remojaron durante 2 y 4 h, en 250 ml de tampón pH 5,8 que contenía 12000 UI/L de α -amilasa (metodología 2). La degradación enzimática se evaluó usando la Ecuación 10.

$$\text{Degradación (\%)} = 100 * \frac{W_2}{W_1} \qquad \text{Ecuación 10}$$

Donde W_1 es el peso de la esponja seca antes de la incubación de la enzima, W_2 el peso perdido por la esponja seca después de la incubación de la enzima.[119]

CAPITULO IV.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. PREPARACIÓN DEL GEL A PARTIR DE CARBOXIMETILCELULOSA Y QUITOSANO

4.1.1 Efecto del orden de adición del polímero sobre la formación de gel

En esta parte de la experimentación se obtuvieron hidrogeles para todas las secuencias de adición estudiadas, CMC en CS (CMC/CS) y CS en CMC (CS/CMC) tal como lo reportaron varios autores[6, 29, 120], los resultados se listan a continuación. Como efecto del orden de adición se observó que el orden de mezcla de polielectrolitos varió las condiciones del medio en los que se obtuvieron los hidrogeles como en el caso de CS/CMC donde los geles se formaron a un pH más alto que el de CMC/CS, ya que el primero fue formando en la CMC (pH 6,31) y el segundo en la CS (pH 2.28) [29, 121, 122]. La obtención de geles a diferentes relaciones poliméricas demostró que ambos son polímeros adecuados para la formación de geles y concuerda con la literatura, donde se reporta que el CS y la CMC forman complejos inter-macromoleculares por la fuerte interacción entre sus grupos funcionales, como la interacción electrostática y los enlaces de hidrógeno [29].

Morfología

La Figura 6 muestra la diferencia entre el gel formado por el orden CMC/CS y CS/CMC para la relación CMC/CS 75. Con baja cantidad de CS no se observó precipitación o turbidez cuando se agregó CS sobre CMC; este comportamiento puede deberse a un exceso de carga aniónica (COO⁻) de CMC y un pH bajo que reduce el número de interacciones con grupos CS-NH₃⁺. Al cambiar la secuencia de adición, ahora dejando

caer la solución de CMC en una solución CS diluida, se mejoró el contacto entre los polímeros y se produjo una suspensión turbia (Figura 6a), produciendo más partículas de gel [123]. Estas condiciones producían partículas de gel en forma de esponjas [55] (Figura 6b) que tenían un tamaño de poro de alrededor de 3 μm .

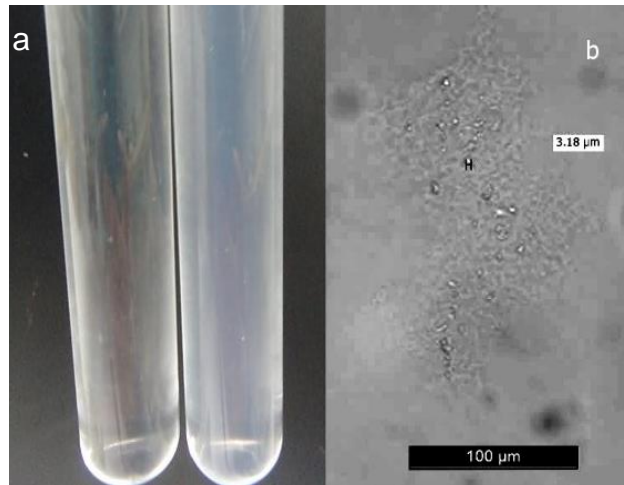


Figura 6. Hidrogeles obtenidos mediante la adición de a) CS en CMC (izquierda) y CMC en CS para una relación de 75/1 (derecha) b) CMC añadida a CS para una relación de 75/1 (tamaño de poro alrededor de 3 μm). Aumento 100x

En el caso de CMC agregado en CS para una relación de 75, la aglomeración se pudo observar bajo el microscopio, mientras que la adición de CS sobre CMS mostró solo unas pocas partículas visibles (Figura 7).

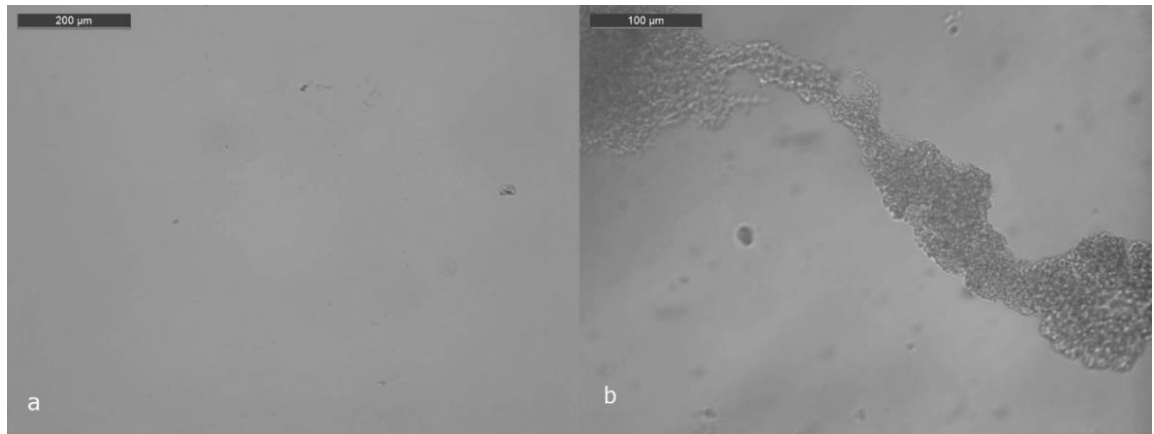


Figura 7. Micrografías de hidrogeles obtenidas mediante la adición de a) CS / CMC para una relación de 75 y b) CMC / CS para una relación de 75

En este trabajo, CMC y CS tenían un peso molecular promedio de 250 kDa. El peso molecular es un factor en el proceso de aglomeración, entre otros factores (por ejemplo, pH), cuanto mayor sea el peso molecular, más sitios iónicos estarán disponibles para interactuar [124].

A una relación CMC/CS 1 (75/75) se observaron partículas del orden de milímetros (Figura 8). El hidrogel seco CMC/CS preparado con una proporción de 1 era una esponja delgada (como una lámina de acetato) y translúcida que presentaba una red de partículas de diferente tamaño

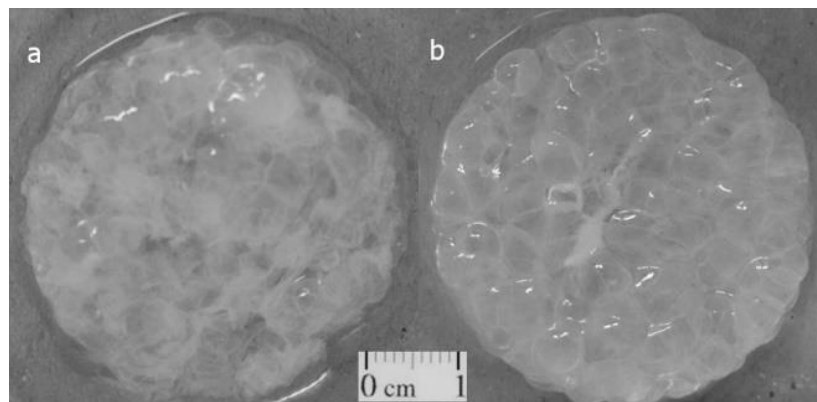


Figura 8. Esponjas obtenidas al agregar a) CMC / CS para una relación de 1, b) CS / CMC para una proporción de 1

Rendimiento

El rendimiento también cambió con la secuencia de adición. El hidrogel hecho añadiendo CMC/CS tuvo un rendimiento de 70,85% con una desviación de 1,67% y el orden inverso de la adición produjo un rendimiento cercano al 100% con una desviación de 1,86%. Los resultados anteriores muestran que el orden de adición tiene influencia en la morfología y rendimiento del gel, este comportamiento también fue observado por Fukuda y otros[29].

Hinchamiento libre

Los hidrogeles preparados en una proporción de 1/1 arrojaron un porcentaje de hinchamiento libre de $4325 \pm 46\%$ cuando se añadió CMC a CS, mientras que el que se formó con el orden inverso tenía solo $856 \pm 20\%$. La relación CMC/CS mostró más hinchamiento libre que el hidrogel obtenido mediante la adición de CS sobre CMC; indicando así la importancia del orden de adición de los polímeros en la morfología del gel. Esto se debe probablemente a que el CMC es muy hidrófilo y al tener un contacto directo con el agua, puede interactuar más con ella.

El orden de adición elegido para la elaboración de geles fue la CMC sobre la CS, basado en lo reportado en literatura acerca del efecto del hinchamiento libre en la posterior encapsulación y liberación de los fármacos[125].

4.1.2 Efecto del medio de preparación en la obtención del gel

Para comparar los diferentes geles obtenidos en cada medio, primero se compararon las 4 imágenes SEM de la relación CMC/CS a pH 3, pH 6, en NaCl y el OH, seguido por las 4 imágenes CMC/CS/ CaCl₂ y finalmente las muestras CMC/ CaCl₂ (Figura 9).

La primera fila (CMC/CS) muestra una membrana más densa y de poros grandes para las muestras a los diferentes pHs. El tamaño de los poros disminuye con la presencia de NaCl y OH, el alcohol también genera una superficie rugosa debida a la compresión generada durante el proceso de liofilización.

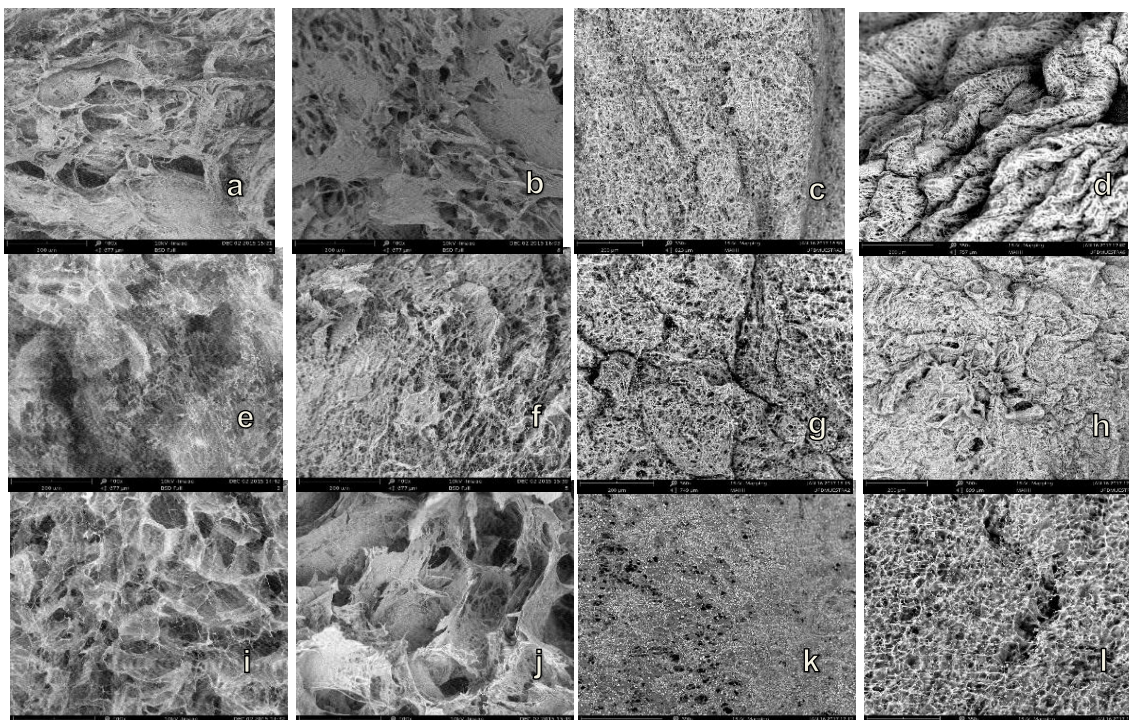


Figura 9. Imágenes SEM de hidrogel a) CMC/CS pH 3, b) CMC/CS pH6, c) CMC/CS NaCl, d) CMC/CS OH, e) CMC/CS/CaCl₂ pH 3, f) CMC/CS/ CaCl₂ pH 6, g) CMC/CS/CaCl₂ NaCl, h) CMC/CS/CaCl₂ OH, i) CMC/CaCl₂ pH 3, j) CMC/CaCl₂ pH 6, k) CMC/CaCl₂ NaCl, l) CMC/CaCl₂ OH

* a), b), e), f), i), j) a 400 x, c) a 330x, d) y l) a 350x, g) a 360x, h) a 300x y k) a 390x

Al agregar CaCl₂ (mezcla de los dos métodos), mejora la definición de los poros en los geles realizados a pH 3, pH 6 y NaCl, pero el gel obtenido en alcohol muestra una membrana muy densa y poco porosa.

Para la gelación ionotrópica (CMC/CaCl₂) todos los geles muestran membranas porosas tanto las realizadas a pH3, pH6 y OH, pero el gel obtenido en el medio con NaCl es una membrana muy densa y poco porosa.

Los medios pHs 3 y 6 son los que presentan en común para los diferentes métodos de interacción de carga, un gel poroso y son las únicas muestras que después de liofilizar mantenían la forma del recipiente en el que se secaban y no se comprimían.

La Figura 10. Imagen SEM de hidrogel sin condiciones controladas pH 3,8 muestra un gel realizado sin condiciones controladas (pH resultante de la mezcla de polímeros sin un medio buffer), el cual tiene una estructura porosa y al liofilizar no se comprime.

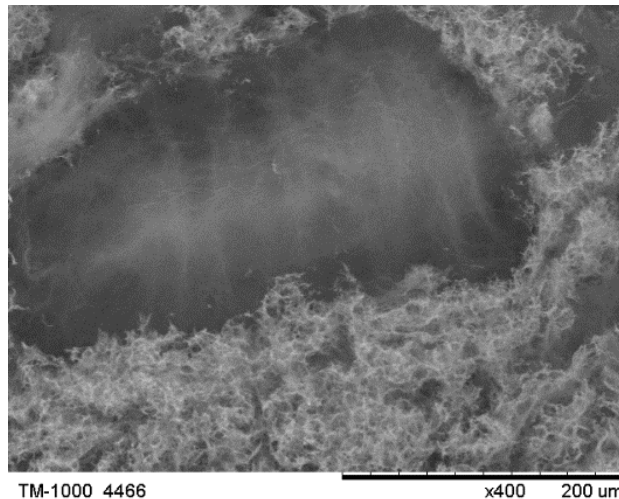


Figura 10. Imagen SEM de hidrogel sin condiciones controladas pH 3,8

Los poros son muy importantes en el hidrogel, debido a que los poros superficiales al contacto con agua se llenan y facilitan la difusión inicial del fármaco, controlada por la disolución del soluto en los poros llenos de agua y por su difusión. Sin embargo, cuando el gel es hidrófilo, ocurre un hinchamiento progresivo del polímero que lleva a cambios de la forma y tamaño de los poros, esto conlleva a la difusión del medicamento tanto a través de los poros llenos de agua y a través del polímero hinchado[126]. De esta manera se puede deducir que estos geles liberarían fármaco de ambas maneras. La liberación disminuye con el tamaño de poro [126, 127].

Es por esta razón que se decide trabajar sin una solución buffer, al pH obtenido por la mezcla de los geles, que se encuentra entre 3 y 4, esto reduce los costos de elaboración y permitirá ver el efecto del pH en la formación del gel, debido a que este cambiará con la relación polimérica empleada.

4.1.3 Formación de hidrogel por los diferentes métodos de interacción de carga

El orden de adición CMC/CS se eligió debido a la mayor producción de hidrogel en comparación con la secuencia CS/CMC a bajas concentraciones de CS y porque genera mayor hidratación, lo que es un factor crucial en la encapsulación y liberación (apartado hinchamiento libre de numeral 4.1.1 y Figura 7)

Los diferentes métodos de interacción de carga arrojan geles con CMC, siendo translucidos los obtenidos por gelación ionotrópica y blanquecinos los obtenidos por coacervación o la mezcla de los dos métodos.

Morfología

La Figura 11 muestra las microfotografías obtenidas con un microscopio óptico a una concentración de CMC del 2% (concentración máxima que pasa por la aguja sin presentar problemas por la viscosidad), para comparar hidrogeles hechos de CMC por diferentes métodos. Las micrografías mostraron que la apariencia de los hidrogeles CMC cambia con el método utilizado para su producción. Se observaron formas cónicas y espirales sin ninguna aglomeración visible mediante gelación ionotrópica (Figura 11a y b), mientras que la complejación con polielectrolitos produjo una membrana similar a una esponja. Por otro lado, la mezcla de procedimientos produjo una suspensión turbia y viscosa (a medida que aumentaba la concentración de CaCl_2) con partículas alargadas.

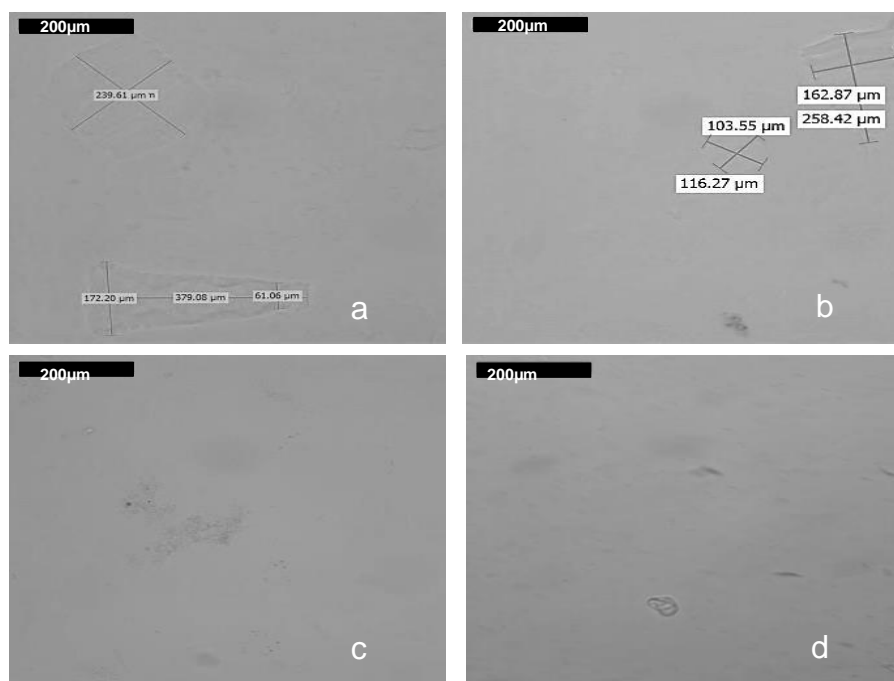


Figura 11. Micrografías ópticas de hidrogeles fabricados a partir de CMC al 2% para determinar las diferencias morfológicas generadas por los diferentes métodos de interacción de cargas: a) gelación ionotrópica con CaCl_2 al 1% p/v; b) gelación ionotrópica con CaCl_2 al 4,9% p/v, c); complejación de polielectrolitos con CS 0,01% p/v; d) combinación de gel *escala a, b) 200x, c, d) 100x.

Existen muchos estudios sobre la gelación ionotrópica entre CMC y CaCl_2 [6, 128], pero se muestran y analizan pocas imágenes microscópicas. Dhanaraju y otros [128] estudiaron la gelación ionotrópica de Na-CMC y Na-Alginato a una concentración fija de CaCl_2 al 5%, encontrando que el tamaño medio de las perlas de hidrogel aumentó a una mayor concentración de ambos polímeros. Huei y otros [129] mostraron con imágenes ópticas, que el CMC forma gel por complejación polielectrolítica con gelatina usando férrico acuoso.

Hosny y otros [130] encontraron que el tamaño de las perlas de gel de CMC se vio afectado por la concentración de polímero (3% p/v); sin embargo, se obtuvieron formas más homogéneas a concentraciones de 2%, atribuyendo el aumento del tamaño al incremento en la viscosidad de las soluciones del polímero.

La Figura 12 muestra imágenes SEM para hidrogeles fabricados a partir de CMC al 2% por los métodos de interacción de carga mencionados. Todos los métodos produjeron partículas esponjosas con una estructura macroporosa observable. En el caso de la gelación ionotrópica, las imágenes muestran que el espesor de las paredes de la membrana aumenta a concentraciones más bajas de cloruro de calcio (concentraciones basadas en datos reportados en la literatura) (Figura 12 a y b). El complejo polielectrolito (Figura 12 c) muestra una membrana con poros más pequeños (aproximadamente 10 μm), mientras que la combinación de los métodos de gelación ionotrópica y complejación (Figura 12d) produjo una membrana más gruesa con poros más grandes (aproximadamente 100 μm). Las imágenes SEM de gelación ionotrópica y complejación de polielectrolito mostraron trazas aparentemente de sal de calcio no solubilizada (Figura 12 d).

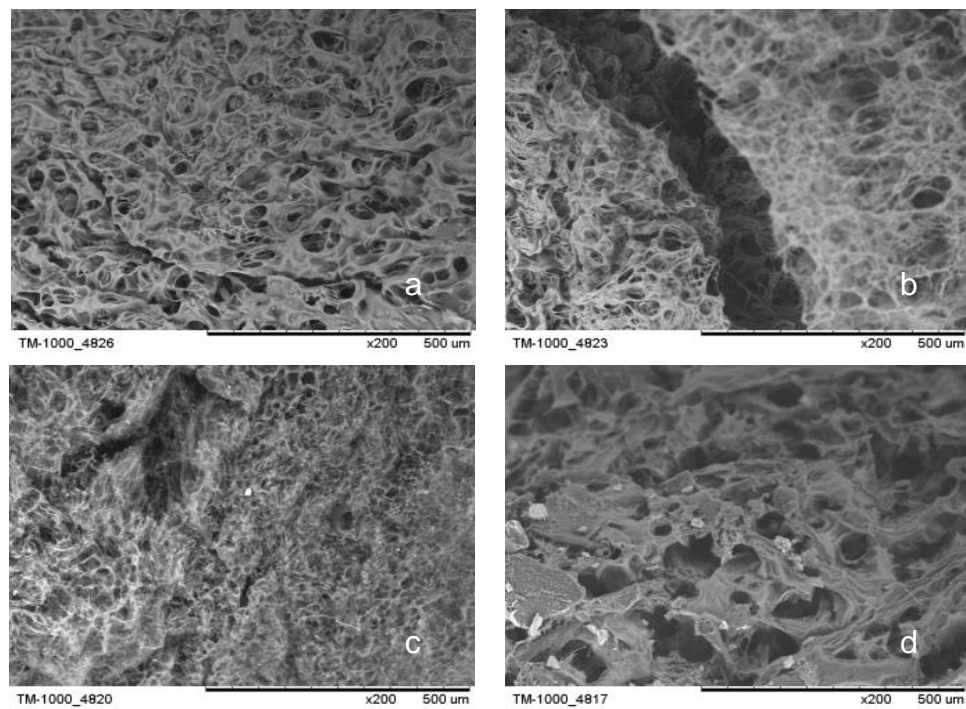


Figura 12. Imágenes SEM para hidrogeles hechos de CMC 2%; a) gelación ionotrópica con CaCl_2 al 1% p/v; b) gelación ionotrópica con CaCl_2 al 4,9% p/v; c) complejación polielectrolita con CS 0,01% p/v; y d) combinación de gelación ionotrópica y complejación polielectrolita *escala 200x

Es evidente que la combinación de métodos proporcionó poros más grandes (aproximadamente 100 μm) y una red más densa (red más gruesa, sin tantos poros pequeños), mientras que la gelación ionotrópica generó poros más pequeños (aproximadamente 25 μm para la concentración del 1% y 50 μm para la concentración del 4.9%) y una red menos densa. La complejación de polielectrolitos produjo poros aún más pequeños y una membrana de apariencia esponjosa. Dhanaraju y otros [128] reportaron imágenes SEM donde las membranas porosas observadas son similares a las esponjas obtenidas en este estudio.

Para examinar el efecto de la variación de la concentración de CaCl_2 sobre los hidrogeles fabricados mediante gelación ionotrópica, la concentración de CMC disminuyó hasta alcanzar el 1,6% y se usaron diferentes concentraciones de CaCl_2 (4,9, 7,35 y 14,7% p / v) para garantizar la formación del gel (Figura 13).

Todos los niveles de concentración de CaCl_2 dieron como resultado partículas con forma cónica truncada y espiral en el intervalo de micrómetros (Figura 11a y b y Figura 13), y el gel adoptaba forma de esponja cuando se liofilizó. La cantidad y el tamaño de estas partículas aumentaron con el incremento de las cantidades de CaCl_2 presentes en la solución, lo que sugiere que a mayor concentración de CaCl_2 , se produjo más gel (no reportado).

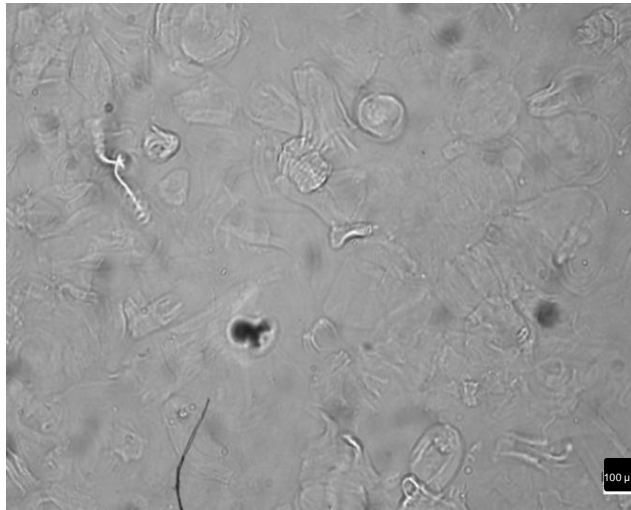


Figura 13. Micrografías ópticas de un hidrogel hecho por gelación ionotrópica de CMC 1,6% y CaCl_2 4,9% p/v. *escala 50x

Se obtuvieron partículas similares en el caso de complejación de polielectrolito, solo cuando se añadió CS 0,016% p/v gota a gota en CMC 0,8% p/v (cambiando la secuencia de adición de polímeros). Sin embargo, la recuperación del precipitado después de la centrifugación fue difícil debido a su poco rendimiento (Figura 14).

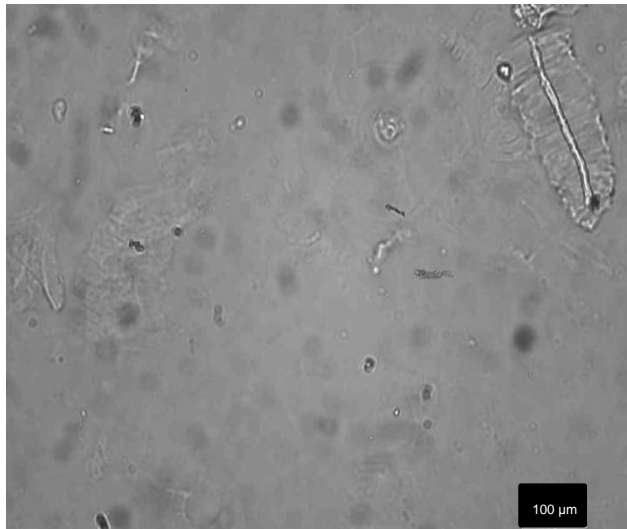


Figura 14 Micrografías ópticas de un hidrogel hecho por complejación polielectrolítica de CS 0,016% p/v sobre CMC 0,8% p/v. *escala 50x

La Figura 15 muestra como al mezclar los métodos de interacción de cargas y complejo polielectrolito se presentan también las formas en espiral y cono truncado observadas en el microscopio para gelación ionotrópica.

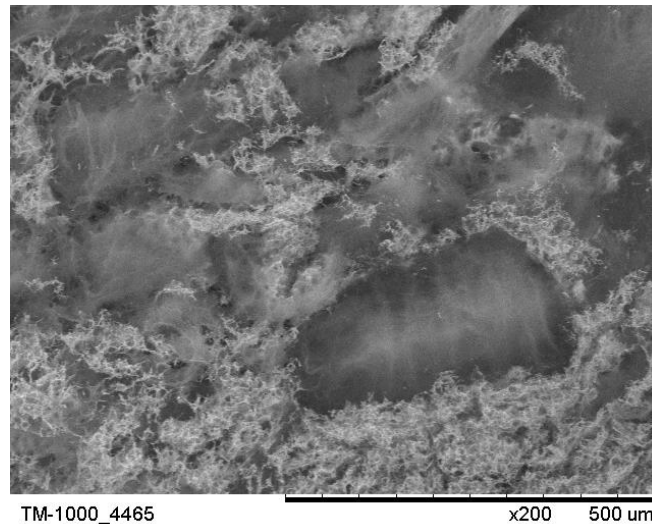


Figura 15. Imagen SEM para hidrogeles hechos de CMC 2%, CaCl_2 al 1% p/v y CS 0,001% p/v.

La forma notada en estos hidrogeles (Figura 15) se observó anteriormente en la gelación ionotrópica de CMC con CaCl_2 , en algunos geles obtenidos por complejación de polielectrolitos de al agregar CS sobre CMC y en este caso de mezclas de métodos.

Potencial z

Sadeghi y otros [131] sugieren que el potencial z es un indicador de carga, que está disponible en la superficie del gel, y los valores reflejan la carga que no se neutraliza. Se obtuvieron valores de potencial z negativos más altos para las partículas fabricadas mediante el método complejo polielectrolito que con la gelación ionotrópica, porque la sal (electrolito catiónico presente en este sistema) proporciona más carga positiva, que neutraliza las cargas negativas.

La adición de sal en la formulación del gel genera un efecto sobre la interacción de cargas de los hidrogeles. El cloruro de calcio tiene un tamaño más pequeño que CS y puede

alcanzar más sitios generando más interacción con el polímero aniónico y reduciendo así la carga negativa de los polímeros como lo demuestra el potencial z, que arrojó un valor de -394 mV para la gelación ionotrópica junto con complejo polielectrolito (mezcla de métodos) y de -962 mV para el complejo polielectrolito en la relación CMC/CS 200.

El valor de potencial z arrojado para los geles elaborados por complejación polielectrolítica revela que no todas las cargas de polímero aniónico se equilibraron, probablemente debido a la baja concentración de CS. La adición de electrolito catiónico disminuye la magnitud de las cargas negativas, y sugiere que existe una mayor interacción molecular para los valores de potencial z resultantes que son más cercanos a cero [131].

La estabilidad de la emulsión y los coloides, según la teoría electrostática del DLVO, es un equilibrio entre las fuerzas atractivas de van der Waals y las fuerzas eléctricas de repulsión. Si el potencial zeta cae por debajo de cierto nivel existirá agregación como resultado de las fuerzas atractivas, por el contrario, un alto potencial zeta (positivo o negativo) mantiene un sistema estable[132].

FTIR

La Figura 16 muestra los espectros IR de los hidrogeles preparados a partir de CMC mediante gelación ionotrópica, complejación de polielectrolitos y una combinación de ambos.

Los espectros FTIR mostraron presencia de los polímeros catiónicos y aniónicos en los geles obtenidos por complejación de polielectrolitos. Lo mismo se observó en los geles obtenidos entre CMC y el cloruro de calcio para la gelación ionotrópica, y entre los tres componentes para la combinación de gelación ionotrópica y los métodos de complejación de polielectrolitos.

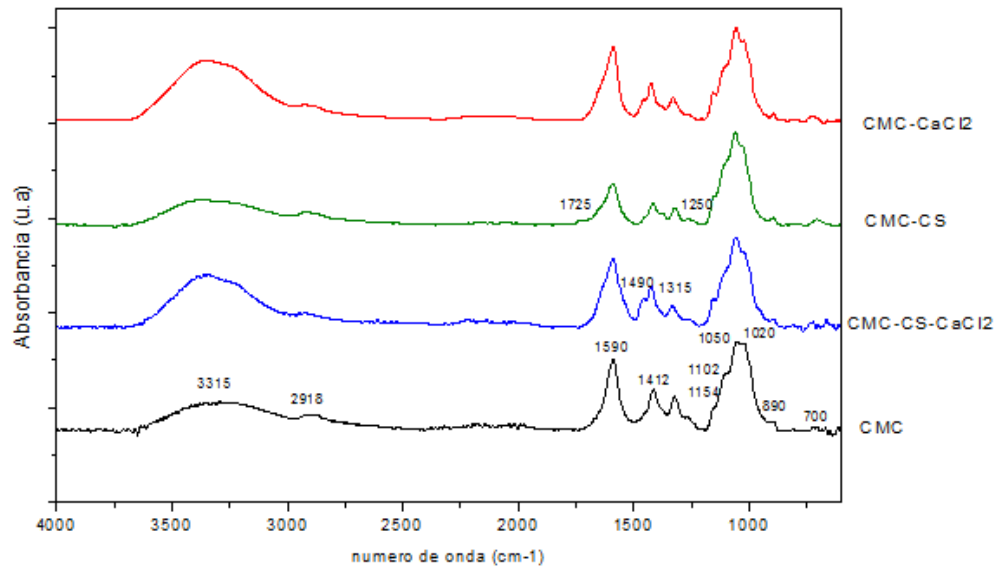


Figura 16. Espectros FTIR de hidrogeles hechos de CMC (a) 2% por: b) gelación ionotrópica con CaCl_2 1% p/v; c) complejación polielectrolita con CS 0,01% p/v; y d) combinación de gelación ionotrópica y complejos polielectrolitos.

El CS tiene bandas características del enlace OH a 3352 cm^{-1} . A 2918 cm^{-1} existe la señal de los grupos $-\text{CH}_2$. También se pueden ver las bandas características en 1640 , 1570 y 1460 cm^{-1} , que pertenecen a la vibración de los enlaces carbonilo ($\text{C}=\text{O}$) del grupo amida y el grupo amina protonada (NH_3^+). Las señales de los enlaces C-H se identifican en 1420 y 1380 cm^{-1} . Las bandas a 1300 y 1250 cm^{-1} corresponden al estiramiento C-N, mientras que las bandas a 1150 , 1040 y 1030 cm^{-1} pertenecen al grupo C-O (COH, COC y CH_2OH). La banda a 1150 cm^{-1} se atribuye a las vibraciones asimétricas de CO resultantes de la desacetilación de CS. La banda a 890 cm^{-1} está relacionada con los enlaces glicosídicos [133].

La CMC tiene bandas a 1590 cm^{-1} , 1412 cm^{-1} y 1315 cm^{-1} que se asignan a estiramiento COO asimétrico, estiramiento simétrico y flexión C-H, respectivamente, lo que indica la presencia del grupo éter carboximetílico. La banda a 3315 cm^{-1} corresponde al grupo $-\text{OH}$ y la banda a 2918 cm^{-1} se puede asignar a estiramiento de los grupos CH y CH_2 . Las bandas a 1102 , 1050 y 1020 cm^{-1} pertenecen a C-O-C y C-O características de los

polisacáridos, la banda a 890 cm^{-1} se atribuye al enlace glicosídico y a la estructura del sacárido [134].

El complejo CMC/CS tiene las bandas características de CS y CMC, enlaces glicosídicos, OH, C=O, CH₂ y amida, lo que es evidencia de la formación del complejo por interacción física, y también una nueva banda en 1725 cm^{-1} debido al estiramiento C = O, los grupos carbonilo son muy sensibles a los átomos y grupos cercanos, por lo que el cambio de esta señal se debe a los diferentes entornos químicos del grupo carbonilo en el complejo. El gel CMC/ CaCl₂ tiene las bandas características tanto de CMC como de CaCl₂, y finalmente el espectro CMC /CS/ CaCl₂ muestra características de todos los compuestos, lo que indica que todos los grupos de interés están presentes.

El gel CMC/CS/CaCl₂ tiene todas las bandas características de CMC. El espectro muestra bandas características de CS $1380, 1150\text{ cm}^{-1}$. La señal a 1040 cm^{-1} está más atenuada que la banda a 1030 cm^{-1} , probablemente debido a los mismos cambios en el entorno. La interacción de los polímeros con CaCl₂ produce grandes diferencias en 3300 cm^{-1} , lo que sugiere una reorganización de los enlaces de hidrógeno cuando se forma el complejo; y también entre 1700 y 1250 cm^{-1} que probablemente resulta del nuevo entorno de C = O.

En comparación con el espectro de CMC, el CS en la complejación de polielectrolitos reduce la banda de 1620 cm^{-1} , también causa que la banda a 1050 cm^{-1} se atenúe.

Con respecto a las interacciones entre los polímeros y el cloruro de calcio en las diferentes preparaciones de gel, las principales diferencias se observaron a 3300 cm^{-1} y entre 1700 y 1250 cm^{-1} . Los enlaces OH, C=O y C-N son los grupos funcionales más afectados por las interacciones de las cadenas de polímeros en el sistema. Para los geles de CMC en relación con los espectros de CMC, la formación de una sal aumentó la banda de 3300 cm^{-1} , hizo aparecer la banda de 1490 cm^{-1} , disminuyó la banda de 1300 cm^{-1} , y redujo la señal a 1100 cm^{-1} . En el presente trabajo, los cambios entre bandas de 1590 y 1250 cm^{-1} en espectros obtenidos de geles hechos por gelación ionotrópica y una combinación de gelación ionotrópica y complejación de polielectrolitos pueden asignarse al reemplazo de Na⁺ por Ca⁺², lo que puede indicar puntos de cruzamiento vinculación debido a la interacción de los componentes [135].

4.1.4 Influencia de la relación de polímeros sobre el gel

Como se muestra a continuación, todas las relaciones tratadas produjeron hidrogeles y se pueden observar grandes diferencias en las estructuras, apreciables a la vista.

Rendimiento

La Tabla 6 muestra los rendimientos de hidrogel para cada combinación de CMC y CS. Durante la formación de los geles sin fármaco se observó que en cada una de las relaciones estudiadas producían rendimientos diferentes: 20% para las relaciones CMC/CS entre 200 y 21, 12% para la relación CMC/CS 75 y 94% para la relación de CMC/CS 2,7. De acuerdo con Gåserød y otros [136], el núcleo del hidrogel está formado por el polímero que se deja caer sobre una solución del polielectrolito de carga opuesta; en el presente trabajo el CMC. En términos generales, a un pH básico, las cadenas de CMC adoptan una configuración de cadena lineal y se contraen a medida que disminuye el pH; por lo tanto, en el caso de CMC/CS, el rendimiento del gel mejoró a medida que disminuyó el pH, probablemente debido a una estructura más ajustada de la CMC, que a su vez podría ser recubierta más fácilmente por la CS. Estos resultados están de acuerdo con los informados por otros autores [137].

Tabla 6. Rendimiento de los hidrogeles a las diferentes relaciones polímero aniónico a catiónico.

	Relación	R (%)	Desviación (%)
CMC/CS	200	21,70	0,26
	75	11,56	0,6
	32	20,10	0,97
	21	21,06	0,69
	2,7	94,08	2,69

El resultado de esta investigación coinciden con en el estudio realizado por Fukuda y *otros* [29] sólo en la relación 2,7, donde se observa el cambio en la cantidad porcentual de CS, ya que ellos indican que el rendimiento de hidrogeles de CMC/CS aumenta con la concentración de CS y en este trabajo el rendimiento es relativamente contante.

Morfología del hidrogel

Los geles formados presentan diferente apariencia, pasando de un gel translucido a una relación CMC/CS de 200, que no precipitaron rápidamente, mientras que se observó un hidrogel blanco en el que se observa una macro-aglomeración a una relación CMC/CS de 21. En la Figura 17 se observa la apariencia del formado a la relación CMC/CS de 21.

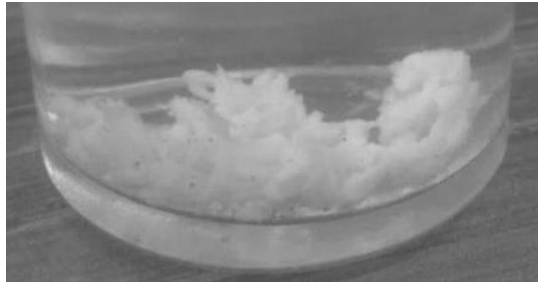


Figura 17. Gel formado con la relación CMC/CS 21

De acuerdo con Devi y *otros* (2012), la relación óptima se logra cuando el sobrenadante tiene la menor viscosidad [120]. Por esta razón, se forma un complejo insoluble cuando la concentración de polianión disminuye. Schatz propuso que la formación de hidrogel conduce a la floculación solo a proporciones de carga equilibrada; sin embargo, si la interacción ocurre en otras proporciones, el aumento en la viscosidad por un exceso de polímeros catiónicos o aniónicos puede impedir la difusión y un buen contacto [138].

La Figura 18 muestra un aumento en la aglomeración de partículas para hidrogeles de CMC/CS cuando la relación disminuyó. Proporciones más bajas dieron una red de hidrogel que relacionándola con la Figura 8 da una idea de la estructura a nivel macro, sugiere que es son partículas aglomeradas.

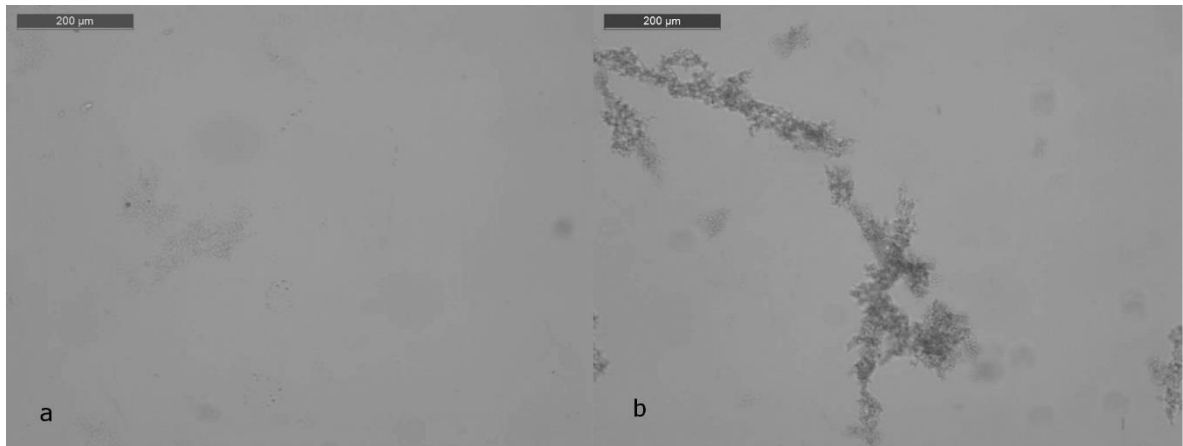


Figura 18. Imágenes de microscopía de hidrogel CMC / CS en proporciones: a) 200, b) 32.

Al liofilizar las muestras, todas las relaciones adoptaron una apariencia de esponjas porosas. Las micrografías SEM muestran que en la relación 200 (Figura 19a) la esponja presenta poros más pequeños que aquellos obtenidos con una relación de 75 (Figura 19b).

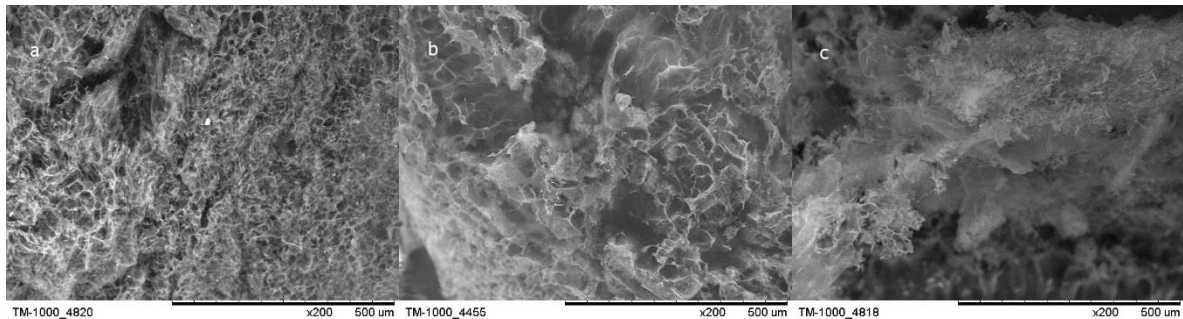


Figura 19. Imágenes SEM de hidrogel CMC / CS en diferentes proporciones: a) 200, b) 75 c) 32

Devi y otros, informaron que la formación de gel para complejos de CMC/CS tiene un comportamiento que depende de la cantidad de CS en la relación, hasta alcanzar un punto en el que la interacción mejoraba, lo que conducía a un aumento en el rendimiento de gel [120]. Por lo tanto, el aumento en la aglomeración podría estar relacionado con una mayor interacción entre los polímeros.

En todas las relaciones estudiadas para cada combinación de polímero, se formó un hidrogel, lo que sugiere una interacción efectiva entre los grupos funcionales de la CMC y el CS [19] dejando en claro que la morfología de los hidrogeles depende de las condiciones de preparación [15].

En estos geles el fármaco se puede encapsular por penetración o atrapamiento. Dependiendo de la porosidad del hidrogel, el tamaño del fármaco y las propiedades químicas de cada uno (carga química, compuestos químicos, solubilidad, entre otras), el fármaco se difundirá lentamente en el gel, la difusión se regulará probablemente mediante el movimiento a través de la matriz polimérica o mediante la erosión en masa del hidrogel a medida que se descompone. Los hidrogeles sensibles a cambios en el medio abren de manera efectiva sus poros para la difusión del fármaco [18].

pH y potencial z

Los pHs de las soluciones de CMC y CS antes de la interacción de cargas eran 6.31 y 2.28 respectivamente y el pH de la suspensión cambió según la relación polímero-polímero empleada (Figura 20). En la literatura algunos estudios han experimentado el control del pH con tampones, ácidos o bases [29, 120], pero en este trabajo se obtuvo un gel menos comprimido sin control de pH (pH alrededor de 3 ya que el pH de las suspensiones fue bajo a proporciones menores del polímero aniónico y fue aumentando al incrementar su cantidad) [121].

El pH ácido en el complejo de polielectrolito se debe a la presencia de iones H^+ (protonación) liberados parcialmente por el ácido acético en el que se solubilizó el CS, lo que también contribuye a un aumento de la conductividad. A valores de pH ácidos inferiores a 4-5, los grupos carboxilo están en forma de hidrógeno, lo que permite la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos carboxilo de los polianiones y los grupos hidroxilo de CS [139]. Por lo tanto, el aumento o disminución en la aglomeración del hidrogel observadas en el numeral anterior para cada combinación de polímeros utilizados en el trabajo (CMC/CS 200, 75, 32, 21, 2,6) puede explicarse por la formación o ausencia de enlaces de hidrógeno.

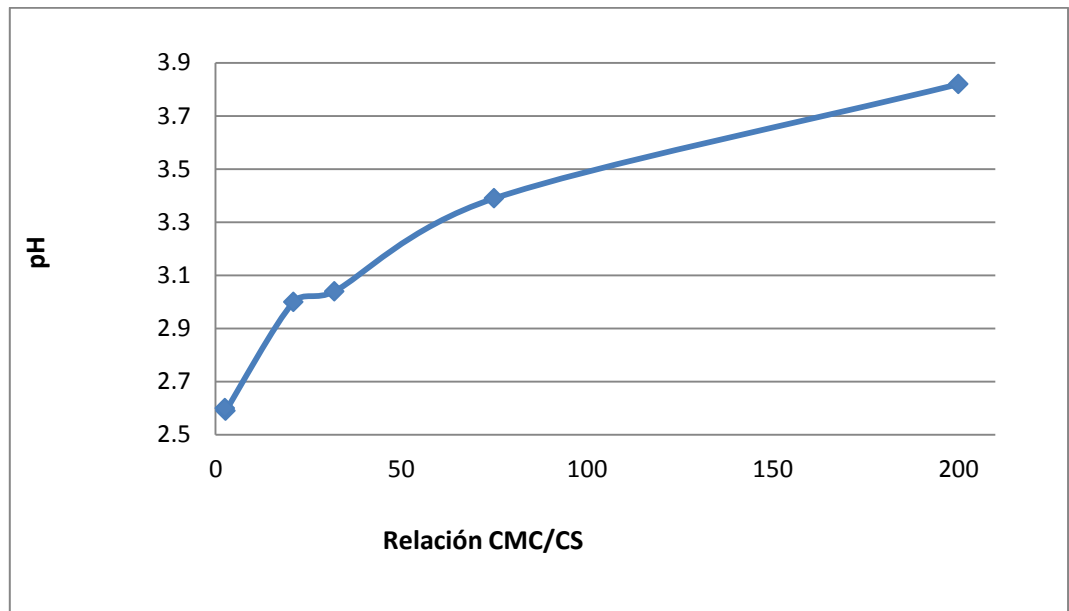


Figura 20. Efecto de la relación polímero-polímero en el pH de la solución final

Se ha sugerido que los polímeros que contienen grupos carboxilos son mejores que los sulfatados, ya que presentan propiedades mucoadhesivas [140, 141]. La mezcla de CMC con CS produjo un hidrogel a un pH inferior a 4. Gulrez y otros [140] afirman que a pHs ácidos el mecanismo promueve el enlace de hidrógeno, el cual induce a una disminución de la solubilidad en agua y dan como resultado la formación de un hidrogel elástico.

Otra razón para la aglomeración es la relación desequilibrada COO/N en las soluciones [121]. Cerca de la transición de carga positiva a negativa (cerca de la neutralidad), se observó la mayor agregación de partículas.

La Figura 21 muestra el efecto de la relación polímero-polímero sobre el potencial z de la solución final. La carga de la solución (mV) tiene tendencia a disminuir a medida que aumenta la relación polímero-polímero, debido a un incremento de iones negativos de los polianiones [121].

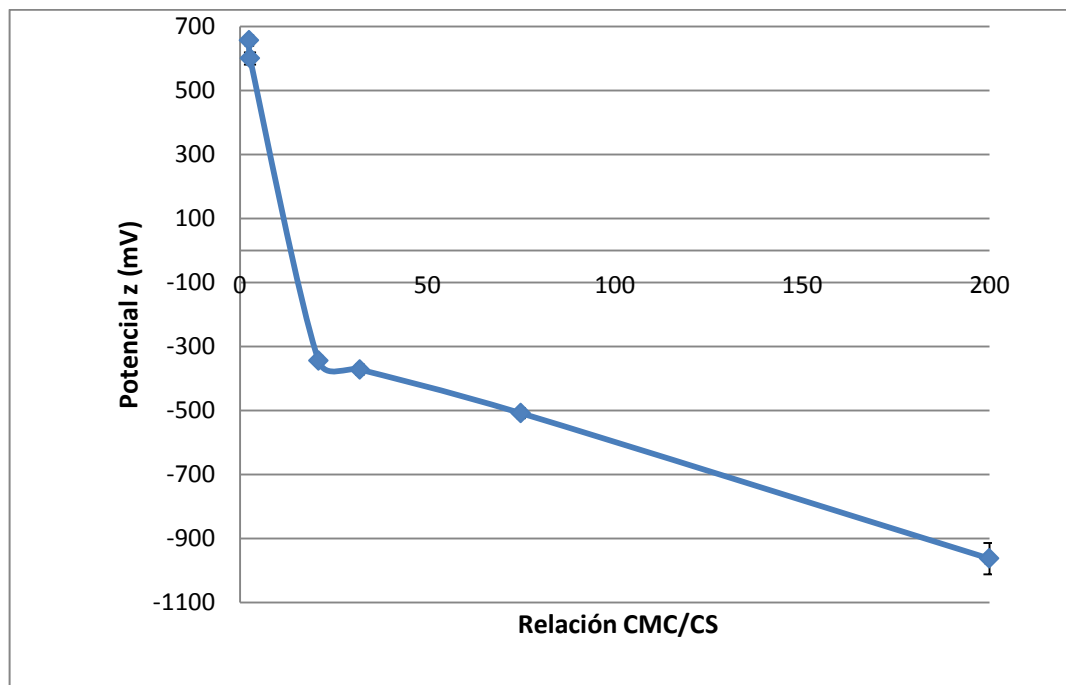


Figura 21. Efecto de la relación polímero-polímero sobre el potencial z de la solución final

Una alta relación CMC/CS (200) dio como resultado una suspensión turbia con potenciales z negativos (-962 mV). Para potenciales z entre -372 mV y 700 mV, el hidrogel tendió a flocular. Las partículas con valores positivos de potencial z son más estables y de acuerdo a Lamarra y otros [142] una mayor carga negativa da partículas más grandes y menos estables, lo que también se observó en este trabajo. Por otro lado, los valores de potencial z negativo parecen propiciar la agregación. Se sabe que el potencial z positivo mantiene una doble capa más gruesa que parece evitar la agregación [143]. Pero llega a un punto de exceso de carga negativa donde no se presenta aglomeración, lo que comprueba lo reportado por Sæther y otros. Quienes indican que trabajar con un exceso del componente principal estabiliza las partículas y no se obtiene agregación [121].

Con un exceso de uno de los polímeros, el potencial z tenía un gran valor positivo o negativo. Las partículas no agregadas se formaron debido a un exceso de polianión o polication, que estabilizó el hidrogel y evitó la aglomeración [121]. En cada caso, las concentraciones más altas y más bajas de polianión no produjeron agregación.

Caracterización FTIR de geles

La Figura 22 muestra los espectros IR de CS, CMC y el complejo polielectrolito de CMC/CS.

El espectro de CS tenía las bandas características a 1640 y 1560 cm^{-1} relacionadas con la vibración de los enlaces de carbonilo (C=O) de la amida secundaria y los grupos amino protonados en CS [133, 144]. Las bandas identificadas a 1420 y 1380 cm^{-1} indican pertenecía de metileno y amida II [145] respectivamente. La banda a 1310 cm^{-1} corresponde al estiramiento -CH₃ de los grupos acetilo, mientras que la banda a 1260 cm^{-1} está relacionada con los grupos C-O-H [133]. Las bandas a 1150, 1070 y 1030 cm^{-1} representan el estiramiento simétrico y asimétrico de los enlaces C-O-C [133, 144, 145]. La banda a 890 cm^{-1} se atribuyó al C-H del carbono anomérico en la estructura del sacárido [133].

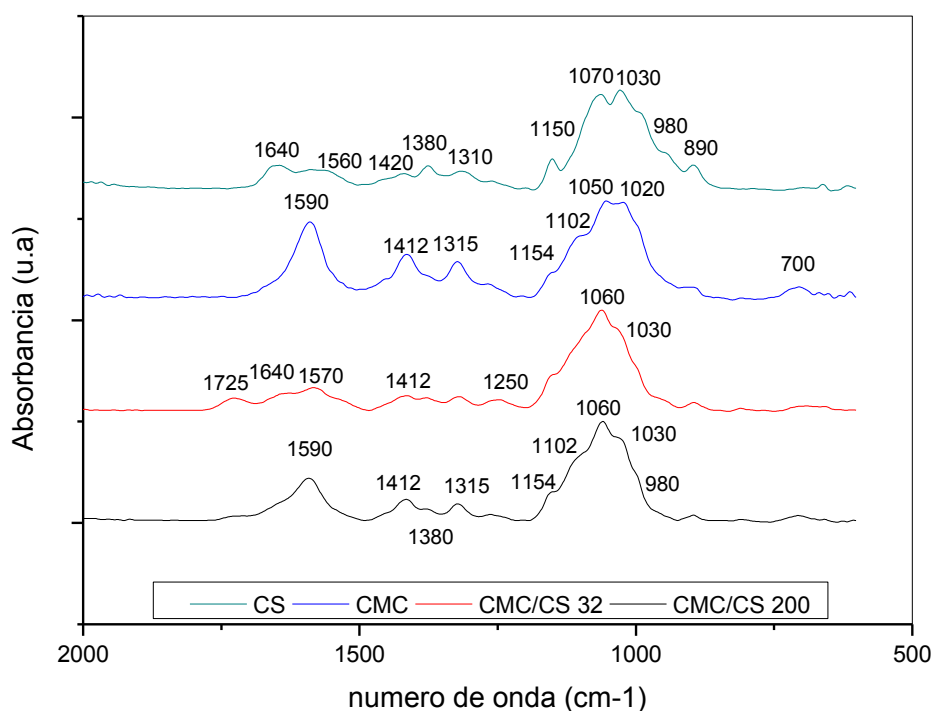


Figura 22. Espectros FTIR de CS, CMC, relación CMC / CS 32 y relación CMC / CS 200.

Las bandas características para el CMC son 1590, 1412, 1315, 1154, 1102, 1050 y 1020 cm^{-1} (Figura 22). Las de mayor interés, 1590 y 1412 cm^{-1} corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico de grupos $-\text{COO}-$ [145, 146]. El resto de las señales corresponden a grupos específicos de carbohidratos como se discutió anteriormente.

El complejo CMC/CS tiene bandas características tanto de CS como de CMC (Figura 22). La relación CMC/CS 200 tiene todas las bandas características de CMC pero también muestra la banda característica de CS a 1380 cm^{-1} , a su vez la banda a 1060 cm^{-1} (desplazamiento de 1070 cm^{-1} de CS y 1050 cm^{-1} de CMC) fue más pronunciada que la banda a 1030 cm^{-1} . La relación CMC/CS 32 muestra una nueva banda en 1725 cm^{-1} debida al estiramiento $\text{C}=\text{O}$ [146]. En la relación CMC/CS 200 que tienen más CMC la señal a 1640 cm^{-1} de la amida en CS disminuyó en gran proporción debido a la mayor cantidad de CMC, predominando así las señales de esta última a 1590 cm^{-1} , característico de la formación de complejos intermacromoleculares [145]. En esta misma relación ambas bandas a 1412 y 1315 cm^{-1} corresponden a CMC. Las señales a 1380 cm^{-1} correspondientes a $-\text{CH}_2$ de CS aparecieron también como un pico débil.

Todos los cambios observados en las diferentes pruebas entre las diferentes relaciones obedecen a la cantidad de CMC que hay en la muestra frente a la cantidad de CS ya que al emplear más cantidad de CMC aumenta su cantidad en el gel y cambiando las propiedades del gel.

Estudio de la estructura del gel por RMN

La Figura 23 muestra las estructuras químicas de la CMC y la CS con sus carbonos numerados para la interpretación del espectro RMN.

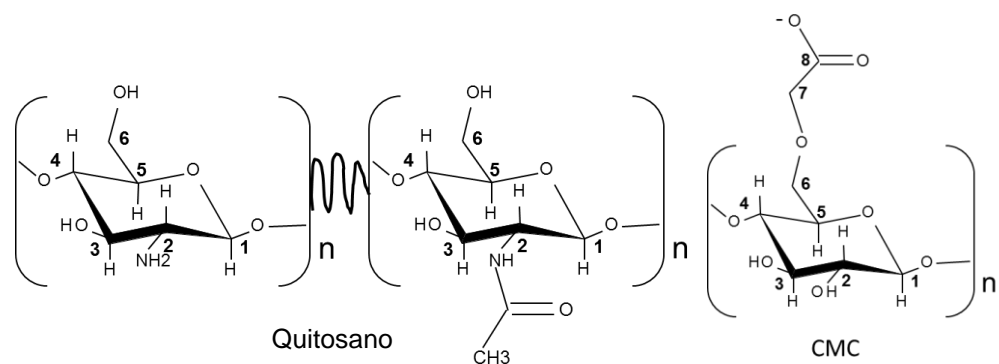


Figura 23. Estructuras químicas de la CMC y la CS

En el espectro RMN del gel formado con CMC, CS y CaCl_2 (Figura 24), se observa la presencia de los dos polímeros: CMC y CS. En 180 ppm se observa el enlace $\text{C}=\text{O}$ del CS, la literatura muestra que este enlace también se atribuye a la CMC [147] pero Kono y *otros* demuestran que la CMC con un grado de sustitución de 0,91 presenta un pico no tan claro en este rango, el cual aumenta al bajar el DS, por esta razón se atribuye a la CS. En 105ppm se encuentra el C1 (CS y CMC) y entre 90 y 60 ppm C4, C3, C5 y C6 (CS y CMC) en C2 para la CMC se encuentra entre 75 y 80 ppm y para la CS en 55 ppm [148] y en 25 el CH_3 del CS [149].

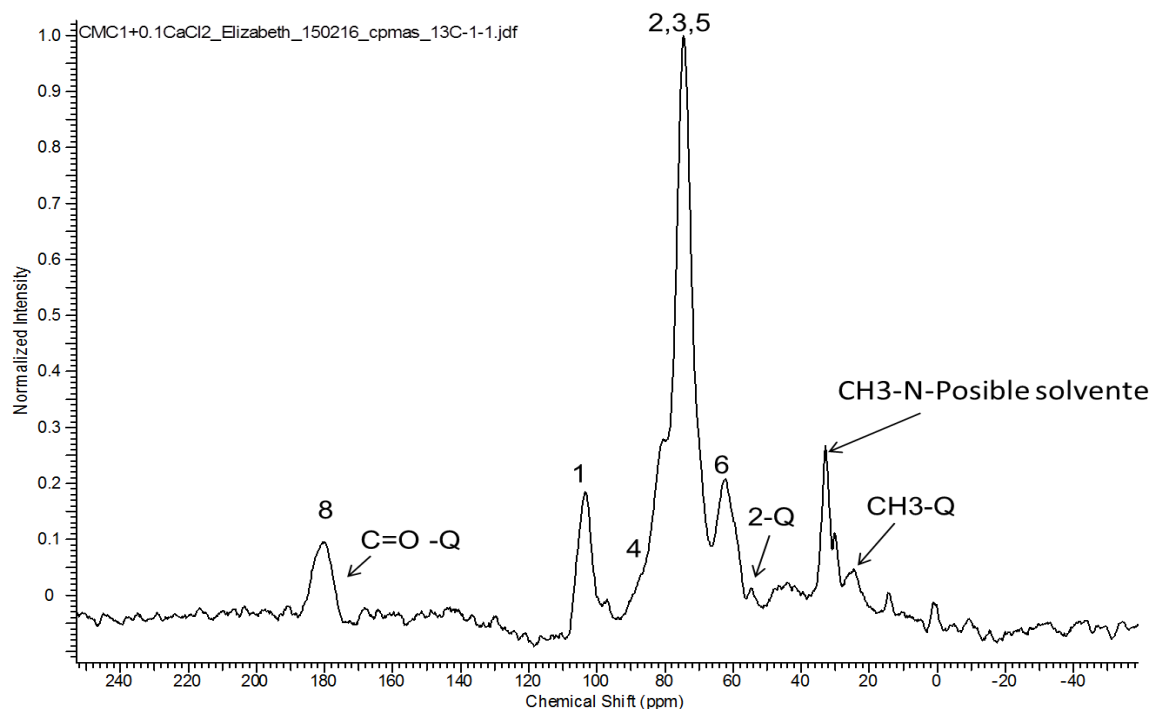


Figura 24. RMN de gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)/ CaCl₂ (1,33%)

4.1.5 Efecto del tiempo de gelación en la morfología del hidrogel

La Figura 25 muestra un hidrogel más aglomerado pasadas 24 horas de gelación, lo que indica que el tiempo produce un aparente aumento de las interacciones y que el tiempo da lugar a que más grupos ácidos de CMC reaccionen con grupos amino de CS [150]. Este proceso también arrojó una disminución en el potencial z del sistema,. El hidrogel CMC/CS en la relación 32 tenía una carga de -276 mV antes del tiempo de gelación y pasó a -372 mV después de la gelación, esto se debe a que al aumentar la aglomeración quedan menos grupos aminos disponibles y aun se presenta exceso de CMC.

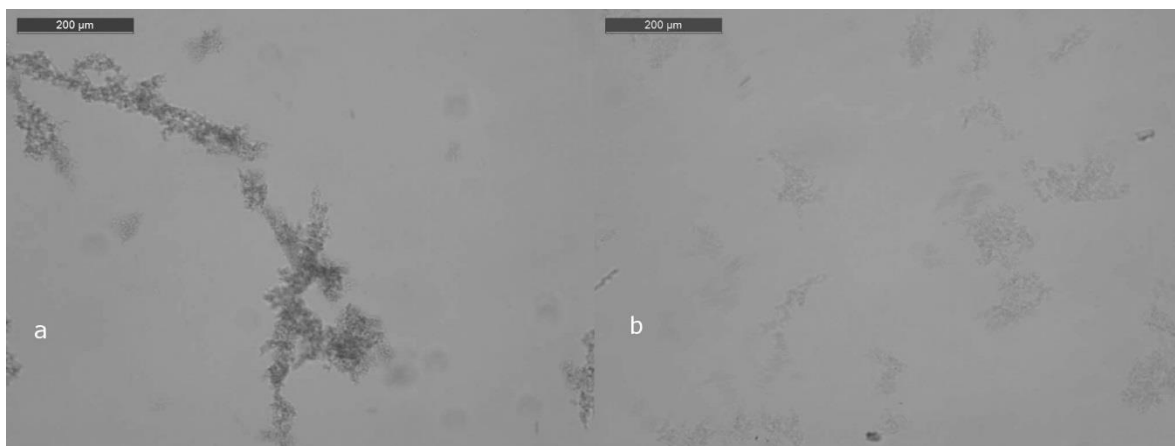


Figura 25. Hidrogeles para CMC / CS 32 a) después del tiempo de gelación b) antes del tiempo de gelación.

La morfología de los hidrogeles es muy sensible a los procedimientos de preparación [108, 128, 130].

4.2 ENCAPSULACIÓN DE ASA EN LOS HIDROGELES E INCLUSIÓN DE CD

4.2.1 Formación de gel y posterior encapsulación de ASA

Para el estudio de la encapsulación de ASA se buscó hacer un análisis comparativo utilizando la misma cantidad másica para todas las relaciones.

La Tabla 7 muestra los resultados de la encapsulación de ASA posterior a la formación del gel. En este caso se encontró que existe encapsulación del ASA en todas las relaciones estudiadas con y sin presencia de CaCl_2 , con tendencia a disminuir con la relación.

La mayor encapsulación lograda fue un 20% con la relación de CMC/CS de 21 sin CaCl_2 , mayor a lo reportado por Kono y Teshirogi para la encapsulación de ASA en hidrogeles basados en carboximetilquitosano (CMCS) y carboximetil- β -quitosano (CMCD), donde

obtienen mayor encapsulación de ASA, logrando un 13% p/p respecto al contenido inicial usando 4 g de CMCS y 12 gramos de CMCD [103].

Tabla 7. Encapsulación de ASA en el gel formado

Relación CMC/CS	CaCl ₂	ASA asociado	Eficacia asociación EA	Desviación
	M	mg	%	%
200	0,0000	0,2350	8,937	0,394
200	0,0904	0,2966	11,277	0,203
75	0,0000	0,3316	12,609	0,588
75	0,0904	0,2581	9,814	0,461
21	0,0000	0,5171	19,661	0,342
21	0,0904	0,2051	7,800	0,195
2,7	0,0000	0,1916	7,283	0,288
2,7	0,0904	0,1684	6,402	0,112

En esta relación CMC/CS de 21 el potencial z es cercano a cero, disminuyendo los grupos funcionales que posiblemente repelen el fármaco, cuando un gel está balanceado en cargas se encuentra colapsado, y al entrar en contacto con la solución con el fármaco las cargas adicionales modifican el gel [151]. El siguiente en EA es la relación 200 con CaCl₂, en esta relación la diferencia entre polímeros es amplia, por esta razón pudieron interactuar más iones Ca⁺² que a su vez interaccionarían con el fármaco disperso en la solución donde se agrega el gel. Omidian y otros encontraron en la formación de esferas a bajas concentraciones que agregar más Ca⁺² disminuye la encapsulación [152], está de acuerdo a lo que sucede para las relaciones desde 75 a 2,7.

4.2.2 Formación del hidrogel y encapsulación del ASA simultaneo

Los resultados para la formación y encapsulación simultánea se presentan en la Tabla 8. Entre las diferentes relaciones CMC/CS elaboradas con geles encapsulando ASA durante la formación, las relaciones 75 y 2,7 no arrojaron encapsulación de fármaco por ningún

método de interacción de cargas y la 21 es casi despreciable (%EA Tabla 8). Por otro lado, la relación CMC/CS de 200 disminuye la cantidad de ASA encapsulada con la adición de CaCl_2 .

Tabla 8. Encapsulación de ASA en la formación del gel

Relación CMC/CS	CaCl_2 M	ASA asociado mg	EA %	Desviación %
200	0,0000	1,0744	30,697	0,205
200	0,0904	0,3110	8,885	0,313
75	0,0000	0,0000	0,000	0,000
75	0,0904	0,0000	0,000	0,000
21	0,0000	0,4954	1,415	0,136
21	0,0904	0,7885	2,253	0,059
2,7	0,0000	0,0000	0,000	0,000
2,7	0,0904	0,0000	0,000	0,000

La Figura 26 muestra la mayor variación en la encapsulación de ASA para la relación 200 sin CaCl_2 cuando se adiciona el ASA simultáneo a la formación del gel.

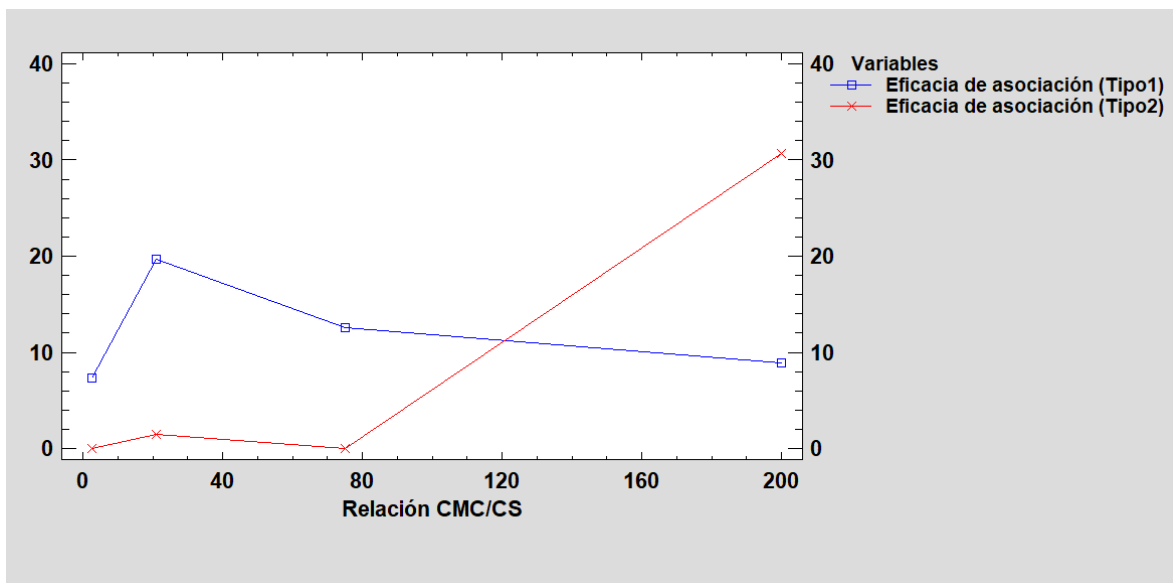


Figura 26. Encapsulación de ASA 1) en el gel formado y 2) durante la formación

Hay que recordar que la apariencia del gel formado cambia con las cantidades de polímeros adicionados, la relación CMC/CS de 200 presenta un gel translucido que se redispersa con agitación (antes del secado), la presencia de Ca^{+2} produce aumento en el rendimiento del gel (Tabla 9) debido a que el CMC en exceso interactúa con los iones Ca^{+2} en solución, entrecruzando grupos carboxilos [151] y esto está relacionado a una menor encapsulación debido a que el fármaco puede interactuar con el Ca^{+2} [153] y ya no interactuar con el CMC o puede impedir su encapsulación en el gel (al ser de mayor tamaño el complejo Ca^{+2} :fármaco). El Ca^{+2} también puede comportarse según el modelo “caja de huevo” (Figura 27), tal como el alginato y no dejar espacio para el fármaco [112], además el gel con CS y Ca^{+2} tiene poros más grandes lo que disminuye el atrapamiento. En cuanto a la relación CMC/CS de 21 el rendimiento es muy similar con CaCl_2 y con ASA, lo que indica que el Ca^{+2} no afecta la interacción del CS con el CMC [10]. Según Polk [11] y colaboradores, en geles hechos con CS y Ca^{+2} presentan mayor encapsulación a menor concentración de Ca^{+2} , lo que ocurre en este trabajo ya que el Ca^{+2} afecta la encapsulación.

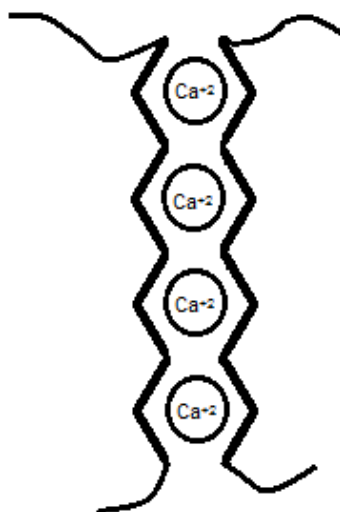


Figura 27. Modelo "caja de huevo"

En el gel encapsulado después de la formación del gel se mantiene el rendimiento inicial (Tabla 6), con pequeñas variaciones ocasionadas por la inclusión del fármaco (Tabla 9), la mayor diferencia se observa en la relación CMC/CS de 2,7 que a pesar de no encapsular fármaco (Tabla 8) disminuyó su rendimiento un 10% debido probablemente a la presencia de Ca^{+2} que compite con la CS, debido a que la concentración de los policationes es baja.

Tabla 9. Rendimiento del gel con ASA agregado en la formación del gel

Relación CMC/CS	CaCl ₂	R	Desviación
	M	%	%
200	0,0000	18,8344	0,8379
200	0,0904	21,5589	0,2171
75	0,0000	19,0351	0,4621
75	0,0904	17,0395	0,3663
21	0,0000	18,0736	0,7855
21	0,0904	18,2684	0,5289
2,7	0,0000	88,6887	2,1724
2,7	0,0904	88,5886	1,3090

Al preparar el gel con ASA en la relación CMC/CS de 2:1 sin CaCl_2 y no dar tiempo para gelación, el gel no encapsula fármaco y genera un rendimiento de 16,58% que es menor al obtenido con encapsulación.

Observación morfológica por SEM

En todos los hidrogeles formados se observan redes tridimensionales macroporosas similares a una esponja (Figura 28). El complejo polielectrolito y la incorporación de CaCl_2 producen una red porosa. Sriamornsak y Puttipipatkachorn en imágenes SEM también muestran como agregar CS produce un gel más algodonoso, con una red más densa.[10]

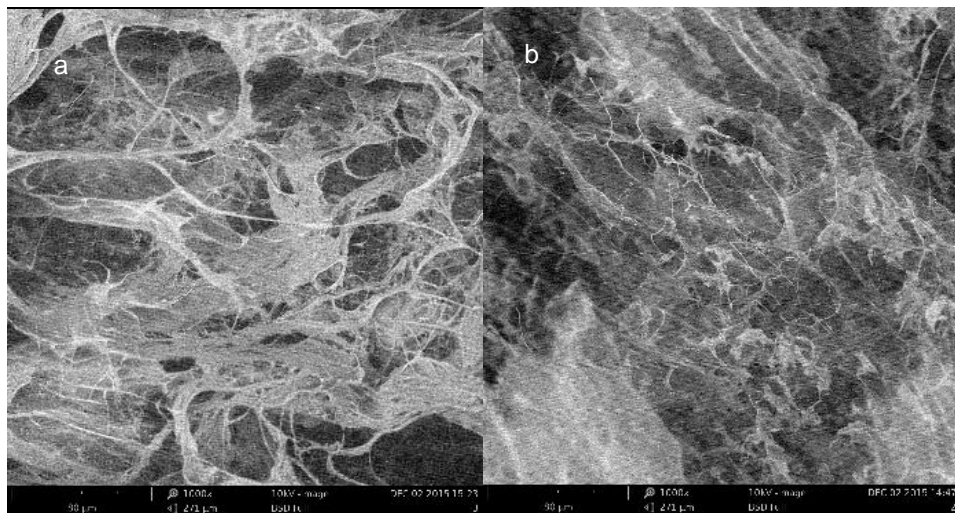


Figura 28. SEM del gel formado con a) CMC (2%p/v)/CS (0,01%p/v) b) CMC (2%p/v)/CS (0,01%p/v)/ CaCl_2 (1,33%v/v)

4.2.3 Efectos de la velocidad de dosificación y de agitación

Se continuó con la evaluación de las condiciones de preparación del gel y encapsulación para la relación 200, debido a que fue la relación que más ASA encapsuló. Se realizó la preparación del gel por complejos polielectrolitos y la encapsulación del fármaco durante la formación del gel.

La tabla ANOVA (Tabla 10) muestra que tanto la velocidad de flujo de CMC, la velocidad de agitación y la interacción de estos tienen efecto en el rendimiento del gel. Los valores-P de la tabla prueban la significancia estadística de cada uno de los factores.

Puesto que los 3 valores-P de la Tabla 10 son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre el rendimiento con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 10. Análisis de Varianza para Rendimiento

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:dosis	12,05	1	12,05	375,81	0,0000
B:velocidad	12,5	1	12,5	389,71	0,0000
INTERACCIONES					
AB	19,034	1	19,034	593,44	0,0000
RESIDUOS	0,128	4	0,032		
TOTAL	43,717	7			
(CORREGIDO)					

La Figura 29 muestra los gráficos de interacción para el rendimiento del hidrogel. Se obtienen los mismos rendimientos elaborando el gel a altas y bajas velocidades de agitación (400 y 800 rpm), pero con el flujo de adición en su límite inferior (40 mL/h) ya que en 400 rpm el rendimiento baja cuando se trabaja a 80 mL/h, esto debido a que el grosor de la doble capa de la superficie del gel disminuye con el incremento de la velocidad de agitación [154] lo que favorece la interacción y aumentan la formación de gel. Por otro lado, Wakiyama afirma que los geles de alginato aumentan el rendimiento a mayor agitación [12].

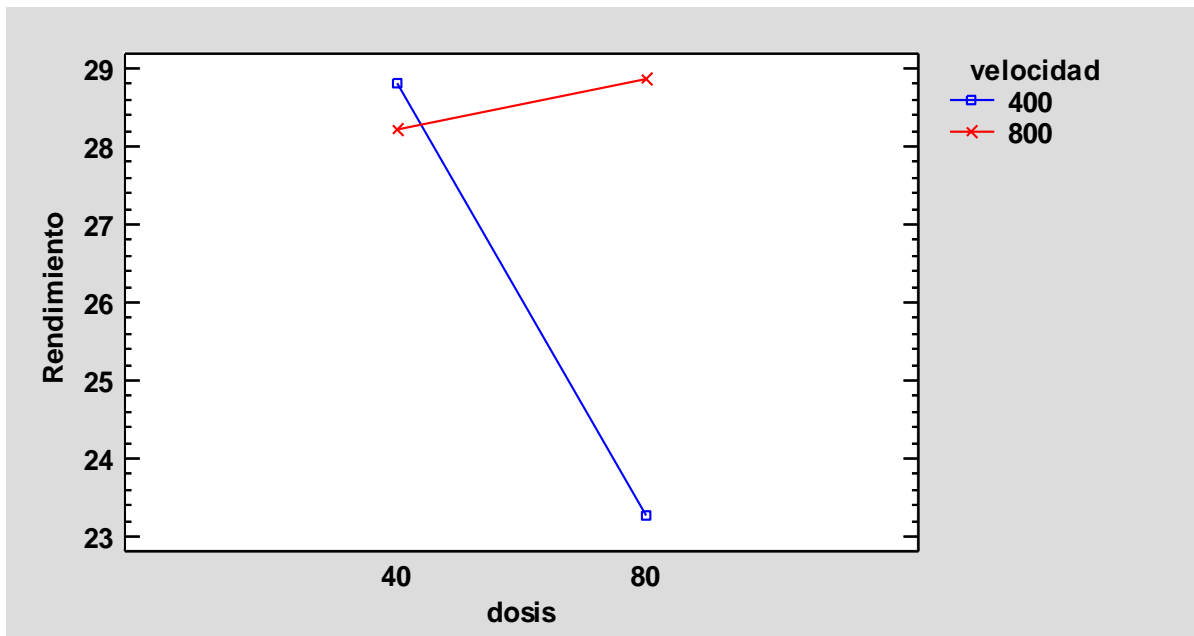


Figura 29. Rendimiento con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)

La tabla ANOVA (Tabla 11) muestra los resultados del diseño de experimentos para la eficacia de asociación, los resultados obtenidos corroboran que tanto la velocidad de flujo de CMC. Para cumplir los supuestos estadísticos se realizó una transformación de la respuesta elevándola al cubo.

La velocidad de agitación y la interacción de estos tienen efecto en la eficacia de asociación del gel. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre (Eficacia asociación)³ con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 11. Análisis de Varianza para (Eficacia asociación)³

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:dosis	1,01591E11	1	1,01591E11	1280,09	0,0000
B:velocidad	5,1097E10	1	5,1097E10	643,85	0,0000
INTERACCIONES					
AB	1,57908E10	1	1,57908E10	198,97	0,0001
RESIDUOS	3,17449E8	4	7,93622E7		
TOTAL	1,68796E11	7			
(CORREGIDO)					

En la Figura 30 se presenta el gráfico de interacción para la eficacia de asociación, donde puede observarse que se obtiene mayor encapsulación trabajando con cualquier velocidad de agitación y el mayor flujo, similar al rendimiento.

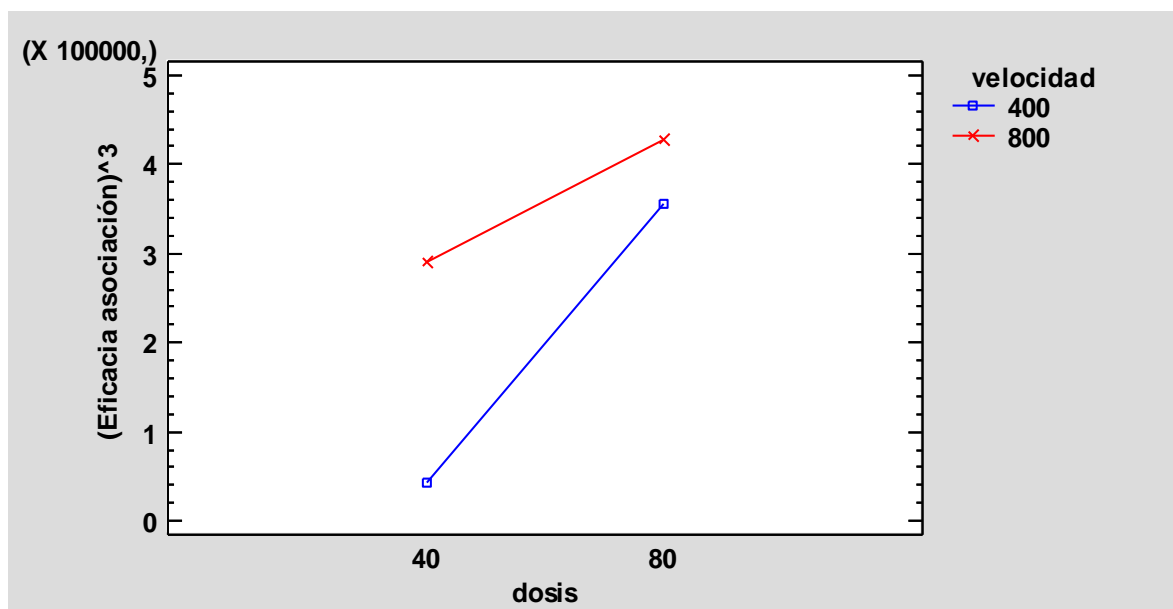


Figura 30. Eficacia de asociación con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%)

Wakiyama encontró que para el caso del alginato aumenta la cantidad de fármaco encapsulado al aumentar la velocidad de agitación [12]. Según Makadia y Siegel, la velocidad de agitación afecta predominantemente la eficacia de encapsulación y el tamaño final de partícula [155].

La tabla ANOVA (Tabla 12) corrobora que tanto la velocidad de flujo de CMC, la velocidad de agitación y la interacción de estos tienen efecto en la de Absorción de agua. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Absorción de agua con un 95,0% de nivel de confianza.

Tabla 12. Análisis de Varianza para Absorción de agua

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:dosis	6767,51	1	6767,51	14,76	0,0311
B:velocidad	1,00814E6	1	1,00814E6	2199,07	0,0000
INTERACCIONES					
AB	273998,	1	273998,	597,68	0,0002
RESIDUOS	1375,32	3	458,439		
TOTAL (CORREGIDO)	1,29028E6	6			

En la absorción de agua es mejor trabajar a bajas velocidades de agitación y altos flujos (Figura 31). Al parecer cuando más se encapsula menos grupos carboxilos quedan disponibles y por ende se produce menos absorción de agua.

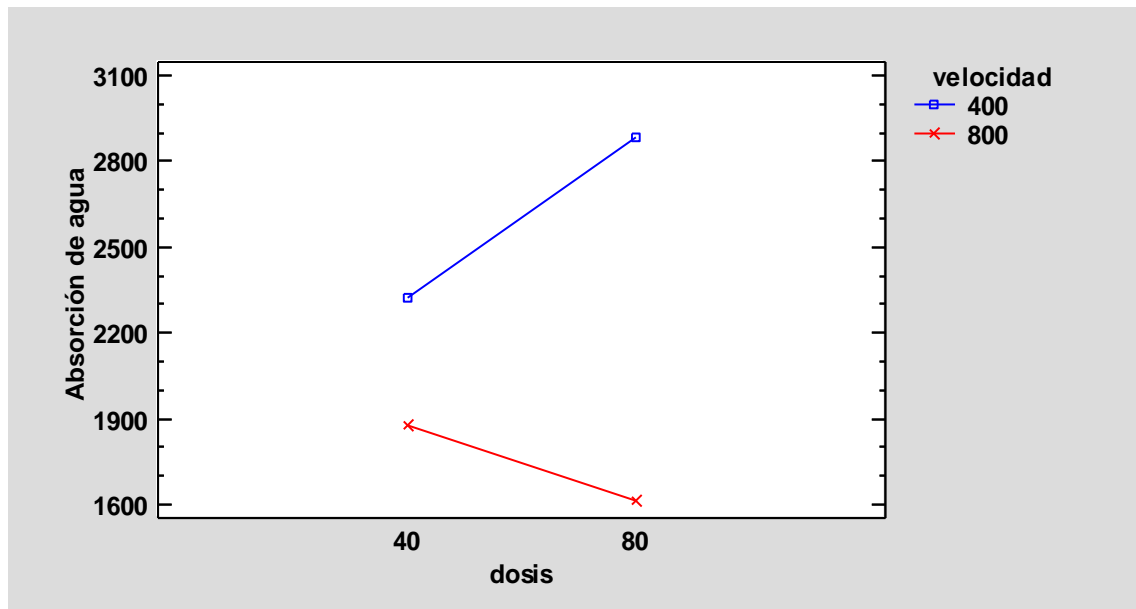


Figura 31. Absorción de agua con la velocidad de agitación y el flujo de CMC del gel formado con CMC (2%)/CS (0,01%).

En este estudio se ha visto que a medida que se obtiene mayor encapsulación, aumenta el rendimiento, pero también disminuye la absorción de agua.

4.2.4 Inclusión de HP- β -CD en la elaboración del gel

Se emplearon las condiciones que garantizaron mayor encapsulación de ASA para evaluar el efecto de la inclusión de CD en los geles. Incluir HP- β -CD en los geles de relación 200 genera un gel menos compacto, que se desintegra con facilidad. En cuanto a la encapsulación de ASA, incluir CD incrementa la encapsulación a un 98%, empleando una relación CMC/HP- β -CD de 1/1 y reduciendo la relación CMC/CS a 100. Esta relación produce un descenso en el rendimiento de 20 a 17%, debido a la disminución de CMC en la formulación ya que se tiene menos cantidad másica de carga aniónica, reduciendo las posibles interacciones con el CS.

Hinchamiento libre del hidrogel con fármaco incluido

Como muestra la Figura 32, en los primeros 10 minutos el gel retienen 120% de líquido a pH 2, debido probablemente a la humectación o agua asociada y se mantiene estable durante 24 horas, el gel a pH 5,8 alcanza 570% de aumento en peso y la de 7,4 un 800% en las mismas 24 horas. Las muestras no se pudieron realizar por más tiempo debido a que los geles perdían su consistencia debido a su pobre entrecruzamiento ya que el ASA y la CD interfiere en la interacción entre el CMC y el CS, tal como le pasó a Ghorpade y Dias [156] en su gel de β -CD con CMC al emplear poco ácido cítrico, su contra-ión catiónico, menos del 20% en relación a la cantidad del polímero (como en este trabajo).

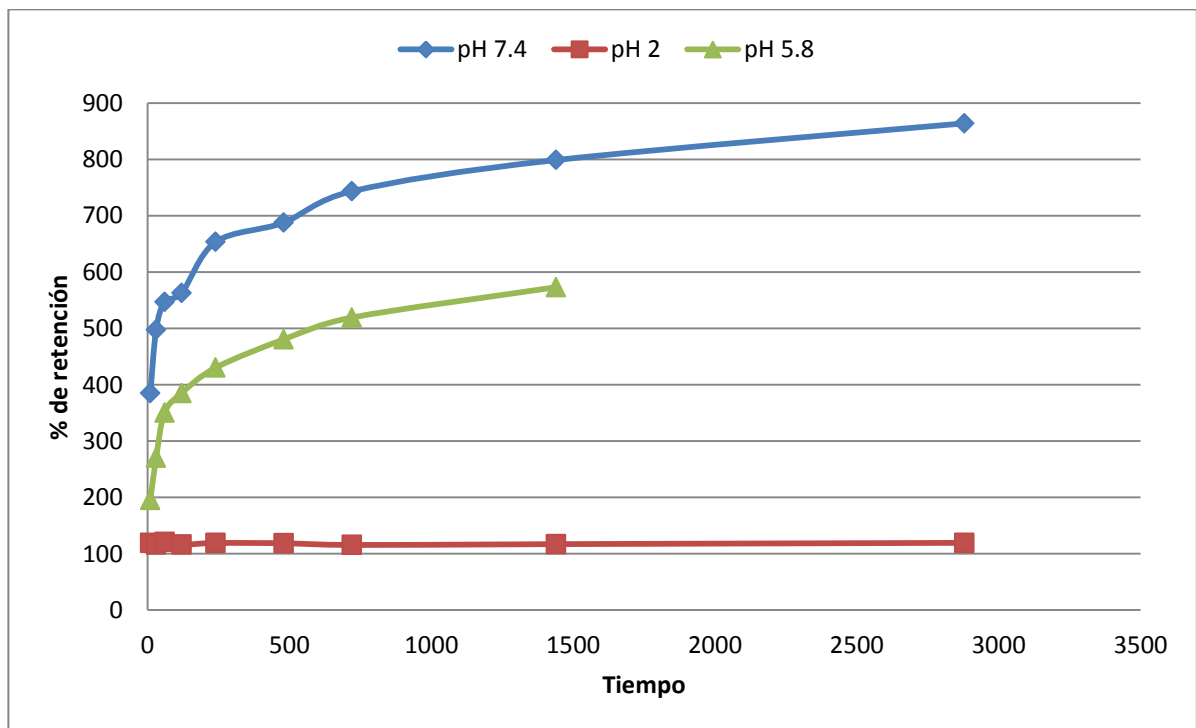


Figura 32. Retención de los geles a diferentes pHs.

La CMC exhibe pobre entrecruzamiento cuando se usa solo debido a los pocos grupos hidroxilos en la posición C6 y la naturaleza menos reactiva de las posiciones C2 y C3, también a la repulsión electrostática del grupo COO^- de la cadena polimérica adyacente que dificulta el entrecruzamiento.

Para Zhang y otros [79], las microcápsulas sumergidas en solución buffer pH 1,0 presentaron menor porcentaje de hinchamiento (250%), en comparación con las sumergidas en pH 7,2 (1300%). Ellos indican que esto se debe a que la capacidad de hinchamiento de las microcápsulas en un ambiente ácido se debilita debido a que los grupos amino del CS se protonan y fortalecen la interacción electrostática de los grupos carboxilo de CMC con los grupos amina del CS, dando como resultado una estructura densa.

4.3 ENCAPSULACIÓN DE IB EN LOS HIDROGELES E INCLUSIÓN DE CD

4.3.1 Efecto de la velocidad de agitación y el flujo de CMC en la encapsulación del IB en gel

Del comportamiento de la encapsulación de ASA se decidió trabajar con el mayor punto de velocidad de flujo estudiado (80 mL/h), ya que favorece la encapsulación y el hinchamiento con agua libre. Diversas investigaciones reportan que la velocidad de agitación afecta la morfología de los hidrogeles y con esto se afecta la encapsulación, por ejemplo Nagarwal y otros [157] indican que la velocidad de agitación es clave en la morfología del gel. Específicamente, Sun y otros [158] reportaron que altas velocidades de agitación forman estructuras esponjosas con forma irregular. Por esta razón se evaluó de nuevo el efecto de la velocidad de agitación en la formación de geles con IB.

En este trabajo se encontró que una menor velocidad de agitación favorece la eficacia de asociación para el IB, arrojando mayor encapsulación de fármaco (Figura 33). En trabajos previos elaborados con ASA la encapsulación se veía influenciada mayormente por el flujo, siendo similar la encapsulación para las dos velocidades de agitación empleadas. Con IB la influencia de la velocidad de agitación es más marcada, siendo hasta un 25% mayor la encapsulación al emplear baja velocidad de agitación. Esto puede ser debido a que la cadena de IB es más larga por lo que necesita un mayor tiempo de contacto ya que alta velocidad de agitación acelera el contacto entre los polímeros y la formación del gel.

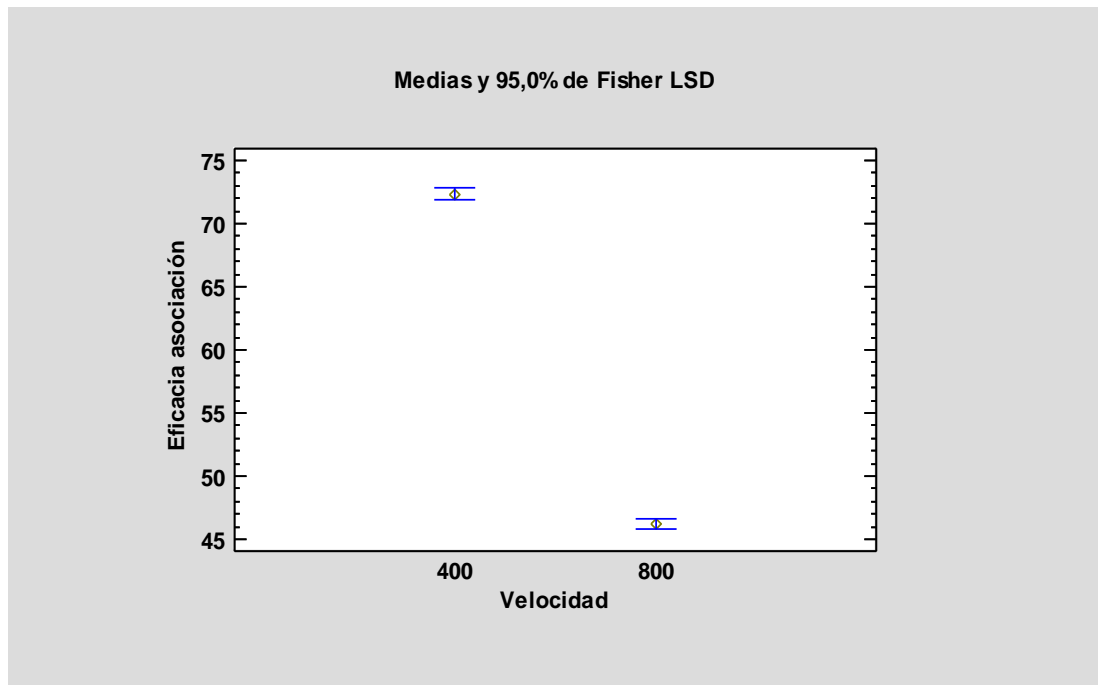


Figura 33. Efecto de la velocidad de agitación en la eficacia de encapsulación del IB

La tabla ANOVA (Tabla 13) afirma lo mostrado en la Figura y puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de la eficacia asociación entre la velocidad de agitación a 400 y 800rpm, con un nivel del 5% de significación.

Tabla 13. Tabla ANOVA para Eficacia asociación por Velocidad

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	684,346	1	684,346	18152,40	0,0001
Intra grupos	0,0754	2	0,0377		
Total (Corr.)	684,421	3			

En la literatura, Pignatello y *otros* [159] no observaron ningún efecto de la velocidad de agitación en el rango estudiado (de 9500 a 20500 rpm) sobre la cantidad de IB asociado con las matrices poliméricas. Gaba y *otros* [160] reportan lo mismo para glipizida en microesferas mucoadhesivas recubiertas de galactomanano.

El comportamiento es contrario al que se presentó con el ASA, ya que con este flujo se obtiene mayor rendimiento a mayores velocidades de agitación (Figura 34), la cual era la condición más desfavorable para el ASA. Esto es contrario a la encapsulación (Figura 34), al parecer cuando más se encapsula menos gel se forma por el impedimento estereoquímico. Wakiyama indica que con alginato, aumenta el rendimiento al aumentar la velocidad de agitación [12]. Gaba y otros [160] también indican que el rendimiento aumenta un 7% aproximadamente para velocidades entre 2000 y 4000 rpm.

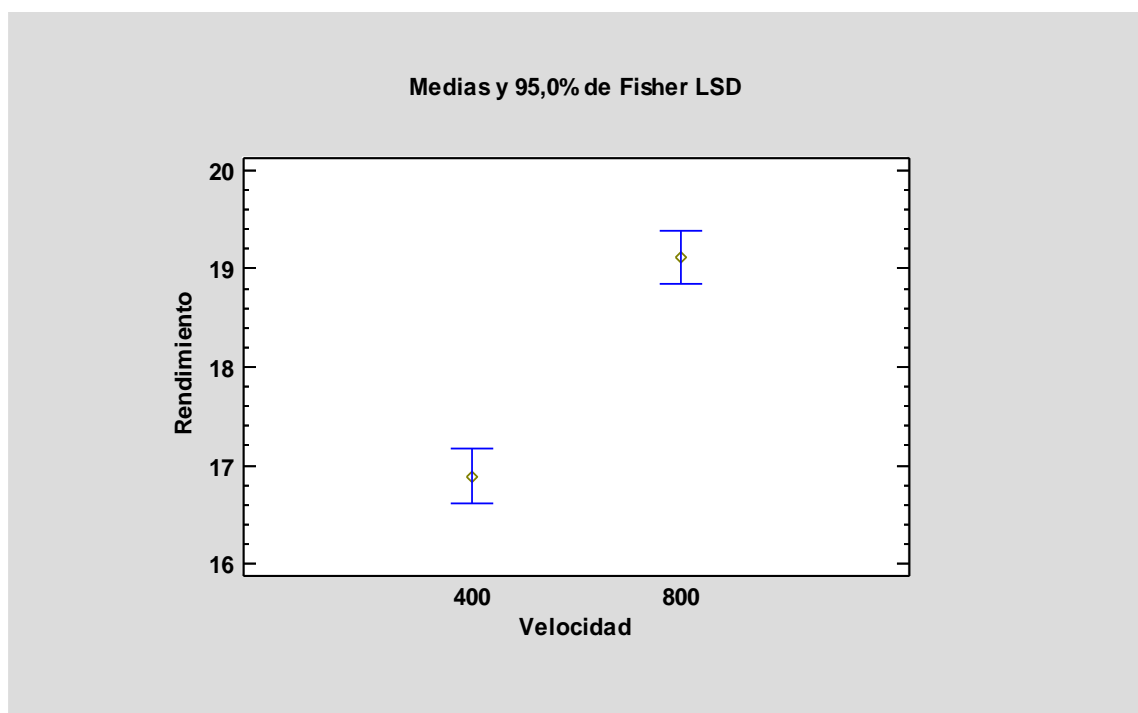


Figura 34. Efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento de gel.

La Tabla 14 ANOVA, muestra el efecto de la velocidad de agitación en el rendimiento del gel. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del Rendimiento entre un nivel de velocidad de agitación y otro, con un nivel del 5% de significación

Tabla 14. Tabla ANOVA para Rendimiento por Velocidad

Fuente	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	4,95062	1	4,95062	303,25	0,0033
Intra grupos	0,03265	2	0,016325		
Total (Corr.)	4,98327	3			

4.3.2 Diagrama de solubilidad de fases del Ibuprofeno con las ciclodextrinas

Los resultados mostrados en la Figura 35 demuestran que para todos los derivados de β -CD, las solubilidades aparentes del IB aumentan con cantidades crecientes de CD, siendo la β -CD la menos soluble en agua y la que menor solubilidad del fármaco presenta en agua. La modificación de la β -CD mejora su solubilidad acuosa como es el caso de HP- β -CD y A- β -CD, lo que a su vez aumenta la solubilidad del fármaco [97].

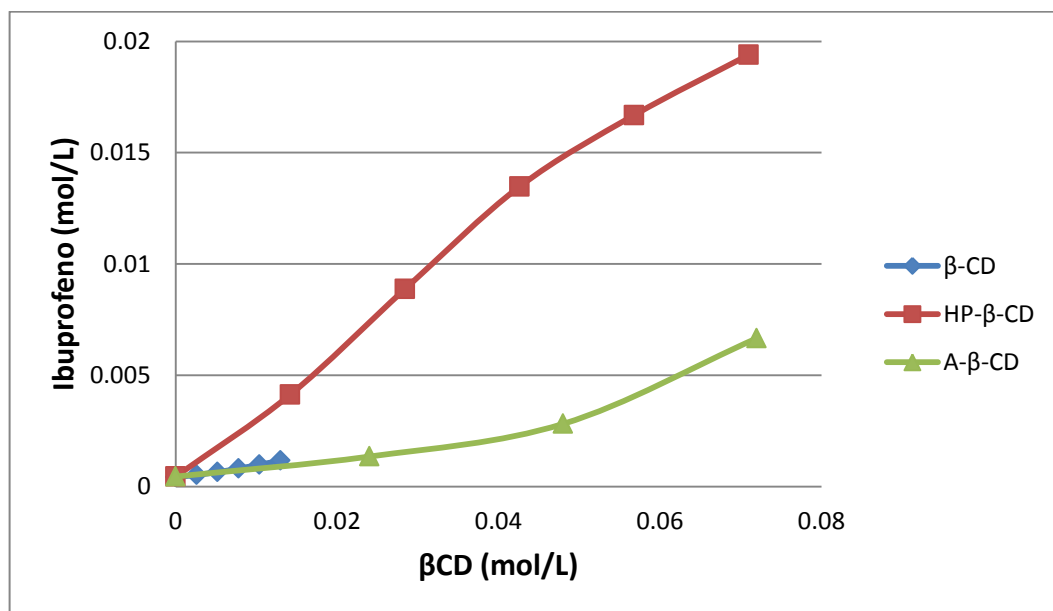


Figura 35. Diagrama de fase de solubilidad del IB con β -CD, HP- β -CD y A- β -CD a 25°C.

En la Figura 35 se observan los diagramas de solubilidad de fases del IB con la diferentes β -CDs. La β -CD y la HP- β -CD muestran una línea con tendencia recta (Ecuaciones 11 y

12) representando una curva del tipo A_L (aumentos lineales de la solubilidad del fármaco en función de la concentración de CD), con unas $r^2 > 0,99$; los cuales indican una relación estequiometría 1:1 entre el fármaco y la respectiva CD y son típicos de la formación de complejos de inclusión solubles [161]. Mientras que la A- β -CD presenta una curva del tipo A_p (isoterma de desviación positiva), dentro de los intervalos estudiados.

β -CD:

$$y = 0,0584x + 0,0004, R^2 = 0,9901 \quad \text{Ecuación 11}$$

HP- β -CD

$$y = 0,2757x + 0,0007, R^2 = 0,9913 \quad \text{Ecuación 12}$$

La diferencia en el tipo de diagrama entre la HP- β -CD y la A- β -CD, hace que la cantidad necesaria de este último para solubilizar el IB sea mayor que para la HP- β -CD, ya que su solubilización del IB es mejor a concentraciones más altas. La línea A_p sugiere la formación de complejos de orden superior respecto a la CD a concentraciones más altas [162]. Como se observa en la Figura 36, para obtener una concentración de IB de 0,005 mol/L es necesario una concentración de HP- β -CD de aproximadamente 0,02 mol/L, mientras que son necesarios aproximadamente 0,06 mol/L de A- β -CD.

De las tres CDs empleadas, la β -CD es la que presenta menor solubilidad en agua, es por lo que la gráfica se realizó a bajas concentraciones de ésta (Figura 35). Comparando la solubilidad del IB en las diferentes CD resulta un 360% más soluble en HP- β -CD que en β -CD a una concentración 0,013 molar y muy similar a la A- β -CD. Ya que la A- β -CD tiene un crecimiento del tipo A_p , su efecto en la solubilidad de fármaco se intensifica con la concentración; es por esto que a medida que aumenta la concentración de A- β -CD disminuye su diferencia respecto a la HP- β -CD, existiendo una diferencia de solubilidad de 307% a una concentración 0,072 molar. La HP- β -CD es la que da lugar el mayor aumento de solubilidad de IB, una posible explicación es el efecto de HP- β -CD como estabilizador del sistema sobresaturado mediante nucleación e inhibición del crecimiento cristalino [163, 164].

La parte lineal de la línea de A-β-CD cumple la Ecuación 13.

$$y = 0,0387x + 0,0004 \quad , R^2 = 0,9994 \quad \text{Ecuación 13}$$

Asumiendo una estequiometría 1:1 [162]. La estabilidad de los complejos de inclusión depende del grado de acomplejamiento entre la molécula huésped y la CD, por eso a mayor K mayor estabilidad del complejo, en este caso el mejor complejo es HP-β-CD:IB con una constante casi 6 veces mayor q la β-CD (Tabla 15). El incremento del K mejora la eficacia de complejación y así menos CD sería necesario para incorporar una cantidad fija de fármaco[98].

Tabla 15. Solubilidad del IB en BCD, HP-β-CD y A-β -CD.

	B-CD [M]	HP-β-CD [M]	A-β-CD [M]
Pendiente	0,0584	0,2757	0,0387
So (M)	0,00041	0,00045	0,000045
K1:1 (M-1)	150,11	850,76	89.58
CE	0,06202	0,38064	0,04
D:CD (mol:mol)	17,123	3,627	25,84

Ribeiro y *otros*, reportan una K de 75 M⁻¹ para el complejo BCD: IBU [165]. Otros autores han reportado un valor K del IB entre 210 y 2500 M⁻¹, los cuales dependen del método aplicado y la concentración del fármaco [162]. La K se ve modificada por la temperatura o el método de solubilización, es por eso que en la literatura existen valores tan diversos para un mismo sistema [85, 166].

A las condiciones experimentales de este trabajo se obtiene un K de 850 M⁻¹ para IBU:HP-β-CD (Tabla 15); Oh y *otros* lograron una K 533 M⁻¹ para el mismo sistema a 20°C e indican una disminución con el aumento de la temperatura [166]. La HP-β-CD es la que da lugar al mayor aumento de solubilidad de IB. Contrario a varios autores, en este trabajo se logró una K más alta con HP-β-CD que con BCD para el IB [165].

En la literatura no se reportan valores de K para el sistema IBU:A- β -CD, asumiendo la parte lineal[167], se obtiene una K de 89,58 M⁻¹, muy por debajo de la K de la β -CD sin modificar.

En cuanto a la eficiencia de complejación, Loftsson y *otros* [115] reportan que un CE alrededor de 0,3 indica que en promedio una de cada cuatro moléculas de CD en solución están formando un complejo soluble en agua con los fármacos poco soluble. Si CE presenta un valor de 0,01 entonces solo 1 de cada 100 CDs forman un complejo.

4.3.3 Encapsulación de IB en la relación CMC/CS 200 con CD

La Tabla 3 muestra las cantidades de CMC, HP- β -CD y CS empleadas a partir de la relación CMC/CS 200, para evaluar el efecto de la HP- β -CD en el rendimiento, la eficacia de asociación, carga, tamaño de las partículas y el pH.

El rendimiento del gel decrece con la disminución de CMC en la relación, presentando el máximo en la muestra 2, con 100 mg de CMC y 40 mg de CD, superando el rendimiento del gel formado sin CD, después de este punto, el incremento de la CD disminuye el rendimiento (Figura 36). Kono y *otros* afirman que la inclusión de CD afecta el rendimiento del gel [104]. La adición de CD puede reducir la formación de entrecruzamiento CMC-CMC por interferencia y la aparición de enlaces CD-CMC, es por esto que se forma menos gel, por otro lado el entrecruzamiento también puede ocurrir entre las CDs [156]. La inclusión del IB no refleja cambios significativos en el rendimiento del sistema.

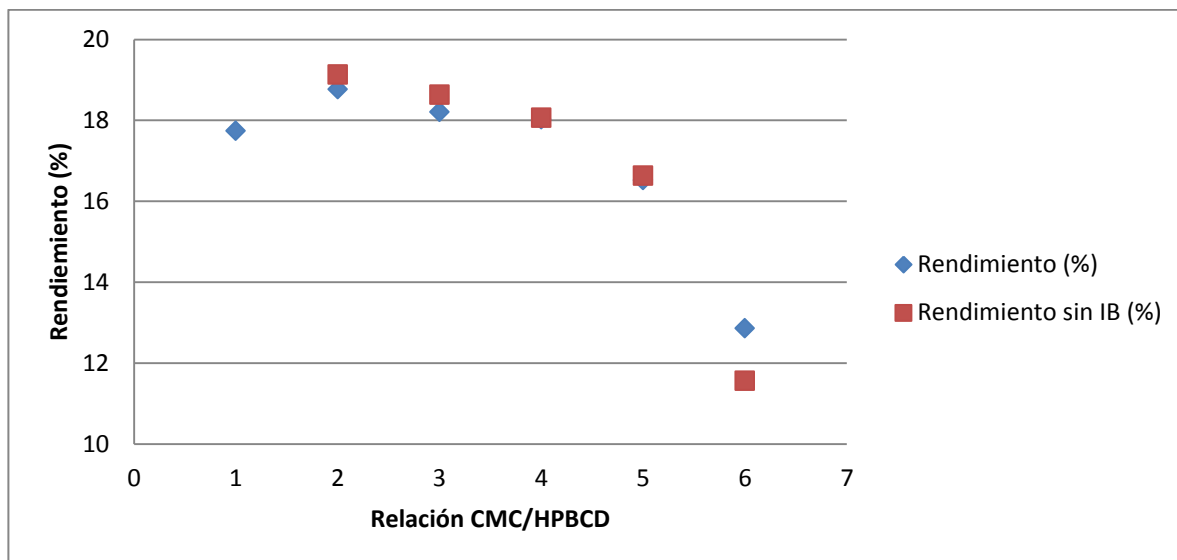


Figura 36. Efecto de la relación CMC/HP-β-CD en la formación del gel con y sin IB.

En la Figura 37 se observa como la eficacia de asociación del fármaco tiene un máximo cuando se emplea una relación másica 1/1 de CMC/HP-β-CD, muestra 4 de la tabla 3 (CMC/CS/ HP-β-CD 70 mg/0,7 mg/ 70 mg), los mínimos se obtienen sin CMC (punto 1) y con exceso de CD (punto 6). En los primeros puntos de la gráfica (2 y 3), cuando en la relación CMC/HP-β-CD aún prima la cantidad de CMC empleada (poca CD), no se nota el efecto de la complejación con la CD en el aumento de la encapsulación del gel. Por el contrario, al primar el CD en la relación CMC/HP-β-CD se obtiene poco rendimiento de gel (menos transportador) y con esto también se obtiene menos encapsulación.

Kono y otros [104] trabajaron con BPA (bisfenol A), éste al igual que el IB es hidrófobo y sus fenoles se adsorben dentro de la cavidad de la CD, ellos sugieren que la encapsulación depende de la cantidad de CD en el gel CD/CMC y que geles sin CD muestran una capacidad de adsorción de BPA muy débil. Por otro lado, Gorpade y otros también afirman que la cantidad de fármaco encapsulado aumenta con la cantidad de CD [156].

Según Maswal y otros el IB encapsulado dentro del hidrogel se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno entre grupos carboxilo de moléculas de fármaco y grupos hidroxilo de la red polimérica, interacciones polares de las moléculas de fármaco con los grupos

ionizados de la cadena de polímero e interacción hidrófoba entre los restos hidrófobos respectivos del fármaco y del hidrogel [168].

Sin IB el último punto (muestra 6) tiene menor rendimiento y por eso menor encapsulación, los geles son muy compactos por la alta presencia de CD [168].

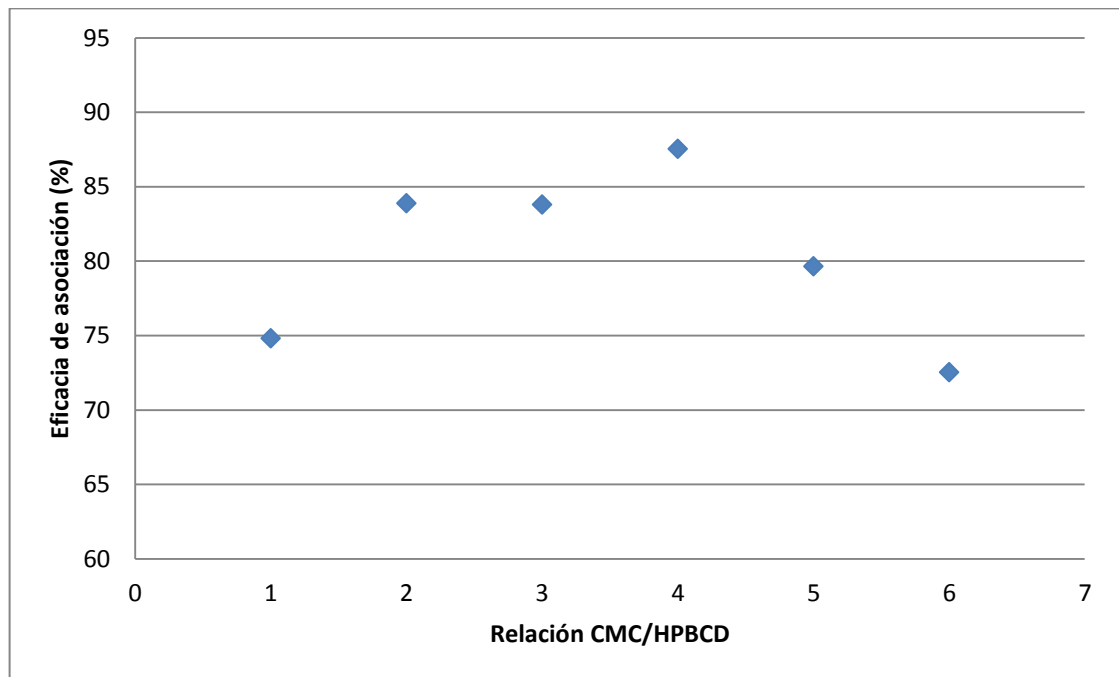


Figura 37. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la eficacia de encapsulación de IB.

En cuanto a la carga del gel, aumentar la cantidad de HP- β -CD y disminuir la de CMC ocasiona que el potencial z se acerque a cero (Figura 38), por la reducción del exceso de carga negativa aportada por la CMC en relación con el CS que se reduce de 200. En la Figura 38 también se puede observar que el IB y el tiempo de gelación no afectan la carga del gel

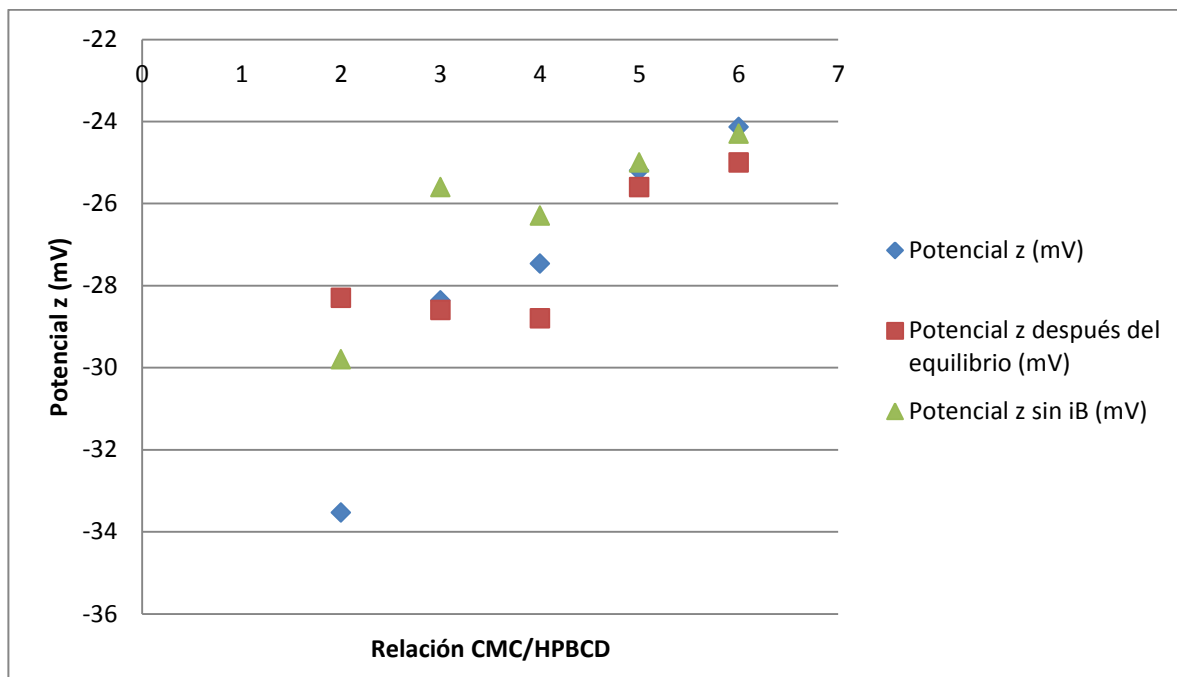


Figura 38. Efecto de la relación CMC/HP-β-CD en la carga del gel

Como se mencionó anteriormente la adición de CD puede reducir la formación de entrecruzamiento CMC-CMC por interferencia pero aumenta la formación de enlaces CD-CMC [156] al mismo tiempo puede existir reticulación de los polímeros con la CD lo que disminuye las interacciones fármaco-polímero [168]. Los hidrogeles con concentraciones de CD inferiores suministran menos cavidades hidrófobas para la encapsulación del fármaco, pero al mismo tiempo, la menor reticulación es favorable para las interacciones fármaco-polímero ya que a altas concentraciones de CD el hidrogel está ampliamente entrecruzado y se obtiene una estructura similar a un sólido rígido que tiene menos atractivo para el fármaco [168].

Loftsson y otros [115] también indican que es importante usar poca CD en preparaciones farmacéuticas para que la eficacia de solubilización de la CDs en el vehículo acuoso sea el aspecto importante.

La Figura 39 muestra que el tamaño de las partículas al terminar el goteo disminuye con la adición de CD siendo más grandes cuando tienen IB, a excepción del último punto. El

tamaño aumenta cuando se tiene mayor cantidad de CMC con el IB, por el aumento de la probabilidad de formación de enlaces entre la CMC con el IB y también por la formación de enlaces CD-CMC y CMC-CD-CMC, al ser el CMC un polímero de cadena larga proporciona un mayor tamaño. Aunque el tamaño disminuye con la inclusión de CD, en el caso del gel sin IB la variación es muy poca, caso contrario para los geles con IB, donde el mayor cambio se observa a alta cantidad de CMC (muestra 2) y alta cantidad de CD (muestra 6) de la Tabla 3.

La diferencia entre el tamaño del gel con IB y el sin IB es mayor cuando se tiene más CMC que CD. Kono y *otros* indican que el tamaño se ve afectado por la cantidad de CD en la relación, disminuyendo con su aumento frente al CMC [104].

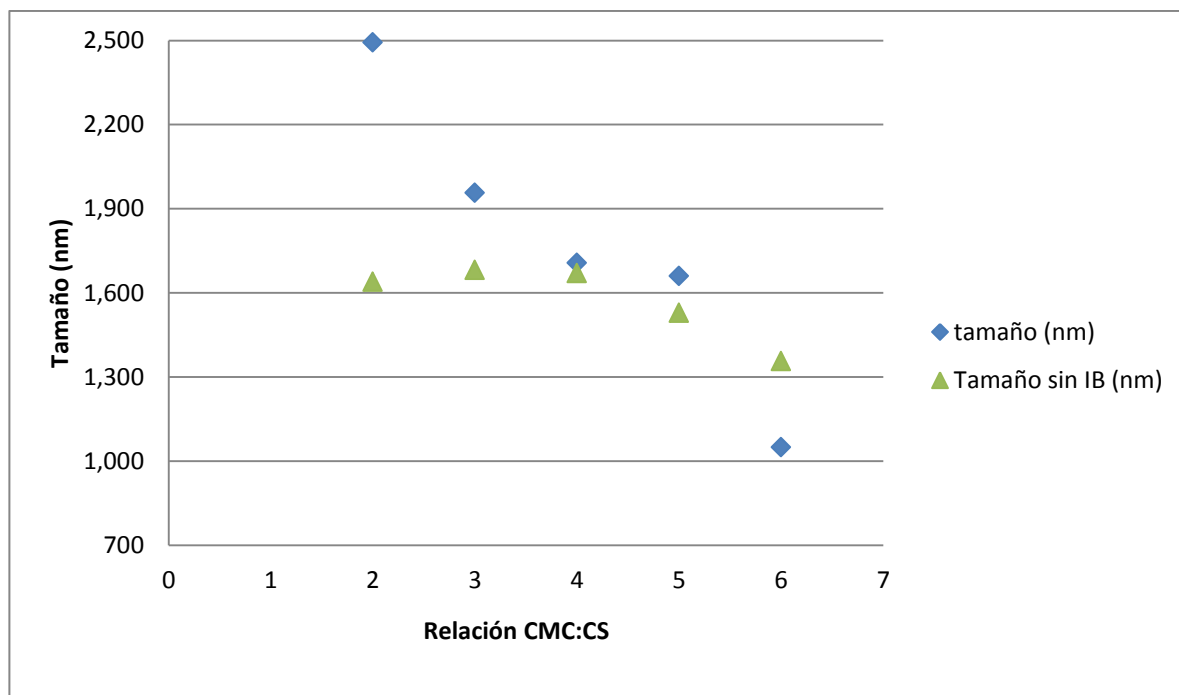


Figura 39. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el tamaño de las partículas.

Singh y *otros* [169] indican que el rango de pH estimado para neutralidad de carga está cerca de 3,8. En la Figura 40 se observa que el pH se mantiene igual tanto para las muestras con IB como para las diferentes relaciones CMC/HP- β -CD, debido a que la CD también es aniónica y se realiza una compensación al reemplazar con esta lo que se elimina de CMC.

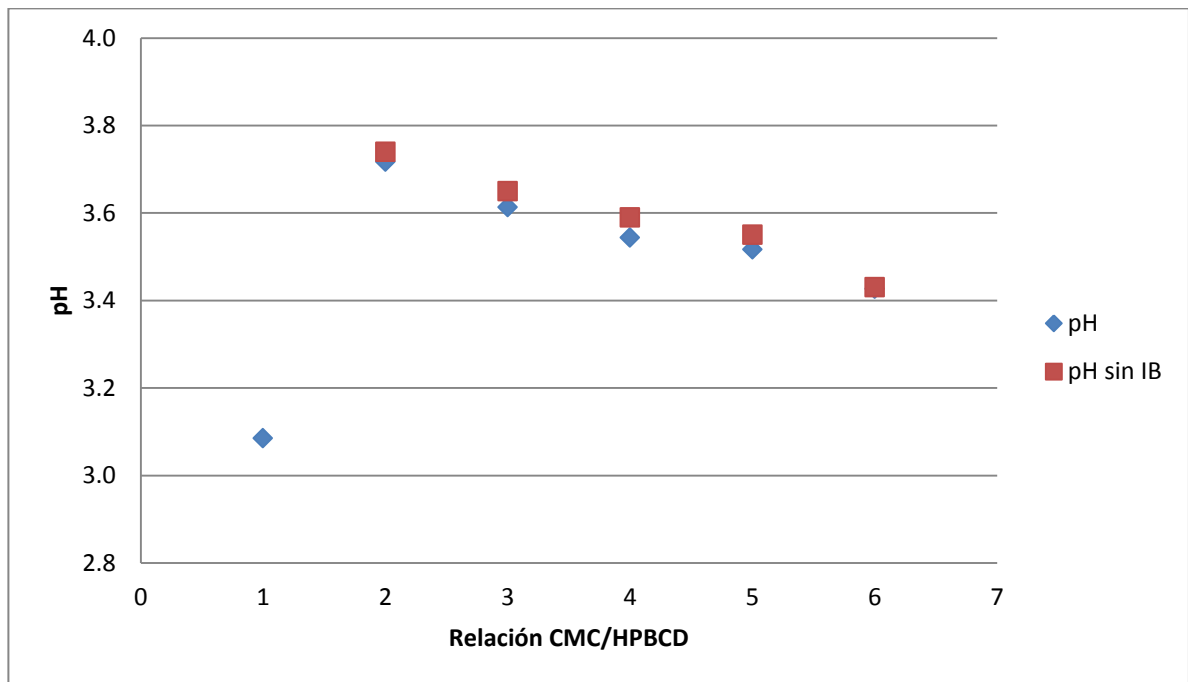


Figura 40. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el pH del gel

En la relación 200 aumenta la cantidad de encapsulación de 75% para 1 mg a 99% para 70 mg de CMC, 70 mg de A- β -CD, 0,7 mg de CS y 2 mg IB.

4.3.4 Encapsulación de IB en la relación CMC/CS 2,7 con CD

Esta relación de CMC/CS es un gel compacto que no encapsula IB sin presencia de CD. Contrario al caso anterior, este gel, CMC/CS 2,7; presenta mayor consistencia y concuerda, lo que concuerda con lo propuesto por Ghorpade y Dias [156] quienes indican que emplear más cantidad de contra ion proporciona más integridad del gel al generar mayor entrecruzamiento, complementado por lo explicado por Maswal y otros, que afirman que un gel ampliamente entrecruzado y que satisface las cargas desequilibradas, tiene una estructura similar a un sólido rígido y es poco atractivo para el fármaco [168].

Tabla 16. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el rendimiento del gel

#	Muestra	R (%)
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	64.87
2	24.3 mg CMC, 24.3 mg HP- β -CD , 9 mg CS, 10 mg IB	41.07
3	24.3 mg CMC, 9 mg HP- β -CD , 9 mg CS, 10 mg IB	56.34

En este estudio también se observa como al aumentar la cantidad de CD guardando la misma proporción CMC/CS disminuye el rendimiento (muestra 2), debido a que impide la formación del gel entre el CMC y el CS como se explicó anteriormente [156]. Aunque la muestra 2 tiene gran cantidad de CD (Tabla 16), guardando la misma relación CMC/CS de los puntos anteriores, tiene menor rendimiento, como se vio anteriormente un exceso de CD no favorece las interacciones entre los polímeros [168] y afecta el rendimiento.

Disminuir la cantidad de CMC y CD a la mitad de las cantidades tratadas en el paso anterior manteniendo la cantidad de CS fija, afecta el rendimiento en más de un 40% (

Tabla 17). El punto 2,7 tiene exceso de carga catiónica, como se vio en las muestras de potencial sin fármaco, es por eso que al disminuir la carga aniónica disminuye la formación del gel y al aumentarlo con CD aumenta el rendimiento, como en el punto 2 del paso anterior, aunque el exceso de CD después afecta de nuevo el rendimiento, (muestra 3)

Tabla 17. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el rendimiento del gel

#	Muestra	R (%)
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	64.87
2	24.3 mg CMC, 125 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 4 mg IB	23.23
3	12.15 mg CMC, 4.5mg HP- β -CD, 9 mg CS, 2 mg IB	9.64

En la Tabla 18 se observa que cuando el gel no tiene CD no se alcanza encapsulación de IB y la encapsulación entre los puntos 2 y 3 es similar siendo predominante la del punto que contiene más CD (punto 3). Concuera con lo explicado anteriormente, la CD

disminuye la interacción entre polímeros y por eso es mayor el rendimiento con menos CD, punto 3. Al igualar la relación CMC/CD a 1 aumenta muy poco la cantidad de IB encapsulada frente a la relación CS/CD de 1.

Tabla 18. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la eficacia de encapsulación de IB

#	Muestra	EA (%)
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	0.0000
2	24.3 mg CMC, 24.3 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 10 mg IB	84.41
3	24.3 mg CMC, 9 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 10 mg IB	76.49

En la Tabla 19 se observa que el exceso de CD interfiere con la encapsulación de fármaco, eliminando la presencia de IB en el gel, por otro lado al disminuir la cantidad de CMC y CS también disminuye la encapsulación, esto debido a la disminución en la cantidad de gel obtenido.

Tabla 19. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en la eficacia de encapsulación de IB.

#	Muestra	EA (%)
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	0.0000
2	24.3 mg CMC, 125 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 4 mg IB	24.59
3	12.15 mg CMC, 4.5mg HP- β -CD, 9 mg CS, 2 mg IB	50.00

Como sucedió con la relación 200, en esta relación el pH tampoco se ve afectado por la inclusión de CD ni de IB, siendo en este caso más constante a pesar de las variaciones de la formulación (Tabla 20). Argüelles-Monal y otros indican que a pH 4 la composición del complejo está muy cercana la equimolaridad [170].

Tabla 20. Efecto de la relación CMC/HP- β -CD en el pH

#	Muestra	pH
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	2.53
2	24.3 mg CMC, 24.3 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 10 mg IB	3.08
3	24.3 mg CMC, 9 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 10 mg IB	3.09

En ambas tablas (Tabla 20 y Tabla 21) se observa que a medida que se incrementa la cantidad de CD, también incrementa el pH, esto se debe a la característica básica de la HP- β -CD.

Tabla 21. Efecto de la relación CMC: HP- β -CD en el pH

#	Muestra	pH
1	24.3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB	2.53
2	24.3 mg CMC, 125 mg HP- β -CD, 9 mg CS, 4 mg IB	3.23
3	12.15 mg CMC, 4.5mg HP- β -CD, 9 mg CS, 2 mg IB	2.91

El IB se estabiliza a través del enlace H y las interacciones polares del fármaco con los grupos ionizados de la cadena del polímero y a través de la interacción hidrófoba entre el fármaco y el hidrogel, por eso la capacidad de encapsulación y carga es menor para el hidrogel preparado a pH más bajo, aumenta para el preparado a pH neutro, [171] ya que el valor de pKa de IB alrededor de 4,5 y 5,2, por lo que a pH 1 su solubilización se registrará principalmente por la unión en H y en cuanto al gel este se encuentra extensamente reticulado para satisfacer las cargas desequilibradas, mientras que un pH más neutro tanto las interacciones dipolo-dipolo y enlaces de hidrogeno son más óptimas para la solubilización de IB [171], por lo que un pH cercano a 4 favorece el encapsulamiento, por eso la relación 200 fue la que más encapsuló y la de 2,7 presentó encapsulación nula sin CD. El gel sin CD tiene un pH más ácido, lo que también afecta el encapsulamiento.

Efecto del tiempo de gelación en el encapsulamiento

En este trabajo se encontró una constante en la eficacia de encapsulación hasta el minuto 3, punto donde se libera un 2% de fármaco y queda constante en 77% (Figura 41). Kono y otros [104] en su estudio encontraron una saturación del gel con BPA a los 180 minutos.

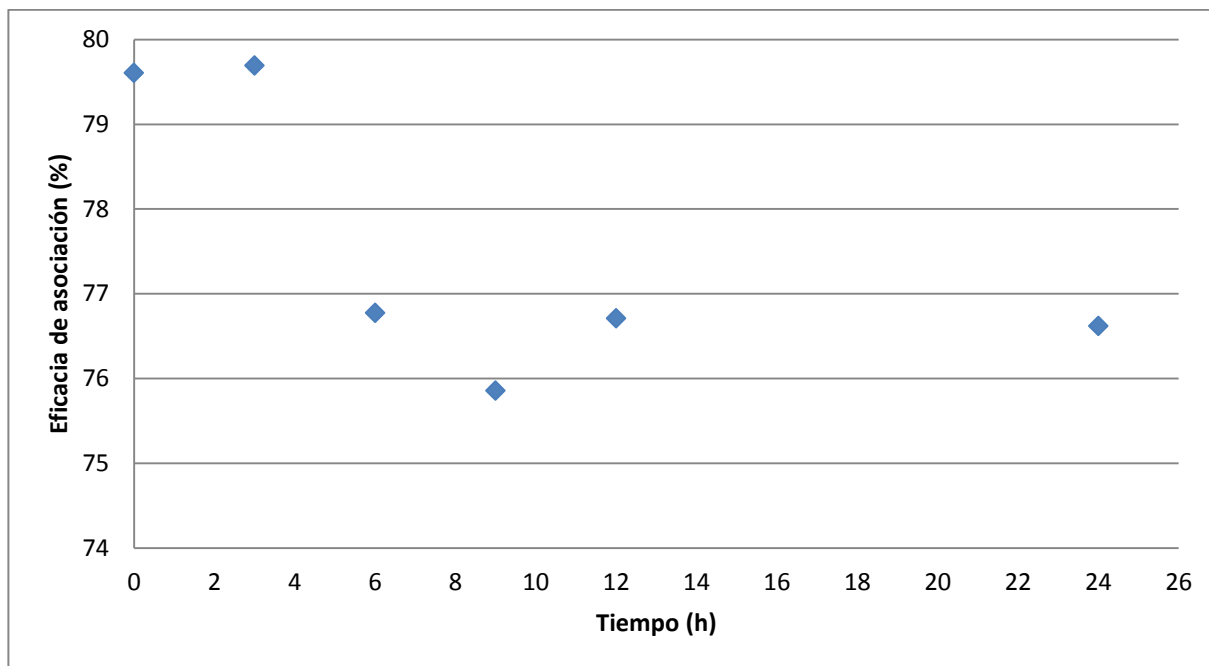


Figura 41. Efecto del tiempo de gelación en el encapsulamiento

Solubilidad del IB con los polímeros.

Uno de los objetivos de este trabajo de investigación es incorporar el fármaco a un hidrogel de polímeros con CDs. La interacción de fármaco-CD no es específica, por lo que la presencia de otras moléculas (que pueden competir o promover la formación del complejo de inclusión) se debe tener en cuenta, como las interacciones entre polímeros y CDs. En la Figura 42 se observa que la adición de CMC y CS en soluciones de CD modifica la solubilidad del IB en comparación a la CD sola.

La presencia de polímeros en la suspensión donde se solubiliza el fármaco tiene influencia la mayoría de las veces en su solubilidad, incrementándola o disminuyéndola.

La Figura 42 muestra como CMC/HP- β -CD genera hasta un 50% más solubilidad respecto a la HP- β -CD sola. En promedio para muchos fármacos el CMC mejora la solubilidad el fármaco en HP- β -CD en un 27% alcanzando con otros fármacos más del 100% [98]. Esto es favorable para la industria farmacéutica, debido a que es más económico emplear el polímero que la CD [98]. Shelton y *otros* encontraron que algunos

derivados de celulosa mejoran la solubilidad de fármacos poco solubles [172] y Yi y Zhang sugirieron posibles interacciones iónicas entre el IB y la CMC [173]. Estas interacciones sumadas a las existentes entre la CD y el IB, hacen que aumente la solubilidad del IB en agua.

Algunos polímero solubles en agua como la CMC mejoran la CE debido a un incremento en la K [174], la entropía de la constante de estabilidad se vuelve más negativa, indicando un complejo de estructura más ordenada [98].

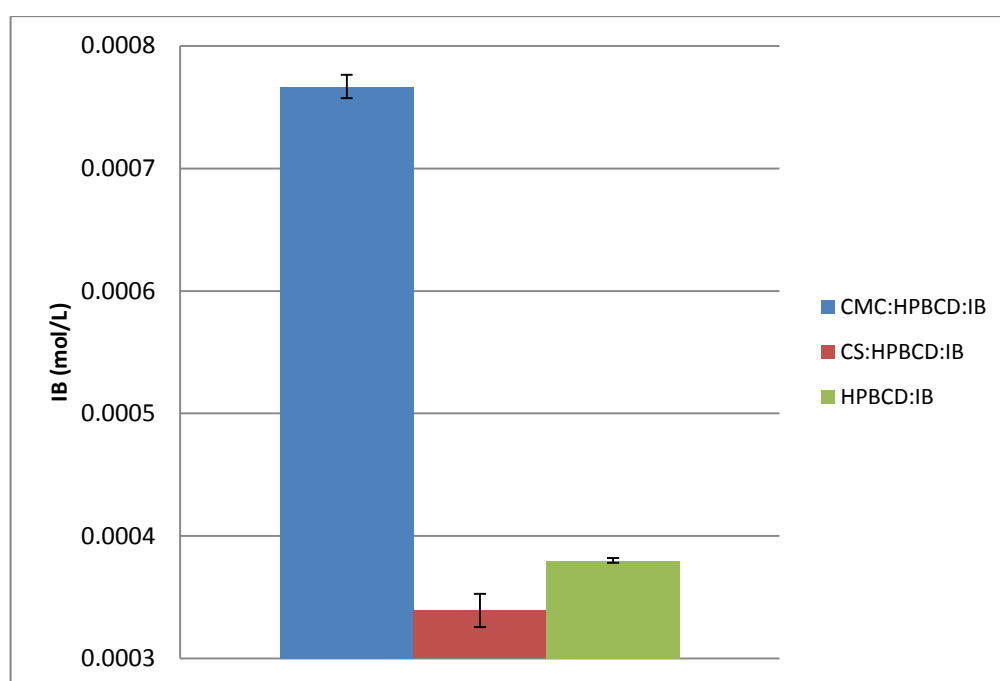


Figura 42. Efecto de los polímeros en la solubilidad del IB con HP- β -CD

Por otro lado, en la misma Figura se observa como la CS disminuye la solubilidad del IB en un 11% respecto a la HP- β -CD sola y un 56% respecto a la CMC/HP- β -CD. Estudios recientes demostraron que la presencia de CS reduce el poder de complejación de CD con varios fármacos, atribuido a la formación de interacciones entre CS y CD, que impedía la complejación fármaco-CD [175]. Según Mura y otros, la adición de CS al medio de complejación de CD provoca una disminución en el poder complejante con fármacos como: Gliburida, Naproxeno, Ketoprofeno, Econazol, Triclosan, entre otros, independiente

de sus diferentes propiedades fisicoquímicas, debido a la presencia de interacciones de CS/CS y/o CS- complejo (fármaco-CD) [175].

La solubilidad del IB también se incrementa con el pH [176], por esta razón es menos soluble en la CS, ya que el pH de las solución está por debajo de 3 y más soluble en el CMC que está por encima de 6.

Argüelles-Monal y *otros* [170] en su trabajo encontraron que la adición de CS al medio de complejación de CD provocó una disminución del poder complejante de la CD hacia todos los fármacos examinados, a pesar de tener propiedades fisicoquímicas muy diferentes y explicaron los resultados debido a la que las interacciones CS-CD obstaculizaron la formación del complejo fármaco-CD [175].

Zerrouk y *otros* también concluyen que cuando el CS y la CD estaba presentes simultáneamente, se observa una fuerte reducción de la eficacia de solubilización de CD hacia el fármaco, y lo atribuyen a un posible efecto de competición del polímero y el fármaco por interacción con el macrociclo [177].

Influencia de solubilizar la CD y el IB en el CMC o en el CS

Para evaluar la influencia de solubilizar la CD y el IB en el CMC o en el CS antes del goteo se realizaron pruebas usando la relación CMC/CS 2,7 con 9 mL de HP- β -CD. Se encontró que en cuanto a eficacia de asociación es indiferente pero experimentalmente la primera dejaba IB sin solubilizar lo que podría producir resultados erróneos.

Se descubrió que aunque la CS afecta la solubilidad del IB y de la CD, al gotear la CMC se lograba solubilizar todo el IB. Hay que recordar que la CS forma interacciones con la CD y con el fármaco [175], y posiblemente al agregar la CMC favorece la complejación y la misma vez que el CMC aumenta la solubilidad del IB aún insoluble (Tabla 22).

Tabla 22. Efecto del orden de solubilización en el gel.

	EA	Desv.	Rendimiento	Desv.	pH	Desv.
	%	%	%	%		
Solubilizando CD y IB en CMC	76,900	0,208	55,641	0,506	3,080	0,010
Solubilizando IB y CD en CS	76,489	0,646	56,342	0,796	3,080	0,010

Inclusión de A- β -CD

Los geles CMC/CS a una relación 2,7 con A-B-CD, no presentaron encapsulación de IB ni con la relación CMC/A- β -CD 1/1, ni CS/A- β -CD 1/1

Porosimetría

La prueba de porosidad se realizó a la muestra CMC/CS 2,7 que presentaba una forma compacta de gel, la muestra CMC/CS 200 tiene un aspecto algodonoso y no soportaba las condiciones de la prueba.

La Figura 43b presenta el tamaño de poro para los geles a una relación CMC/CS de 2,7 con IB sin HP- β -CD, revelando un tamaño de poro promedio de aproximadamente 5 μ m con un pico secundario alrededor de 6 μ m y otros picos menos pronunciados alrededor de 50 μ m.

Adicionar HP- β -CD a la formulación del gel (Figura 43a) disminuye el tamaño de poro promedio a 1 μ m y su incremento en la formulación disminuye un poco el tamaño de los poros a 0,9 μ m aproximadamente (Figura 43c). Ungaro y otros [178] afirman que el HP- β -CD debería generar presiones osmóticas en soluciones acuosas como una función de su concentración y que su aparición durante el endurecimiento de partículas da como resultado la formación de una superficie porosa.

El área de poro incremental, es mayor para la Figura 43a, con menos cantidad de HP- β -CD (9mg) $2,7\text{m}^2/\text{g}$, frente a $0,14\text{ m}^2/\text{g}$ para el gel sin HP- β -CD (Figura 43b) y $1,7\text{ m}^2/\text{g}$ para el gel con 24,3 mg de HP- β -CD (Figura 43c).

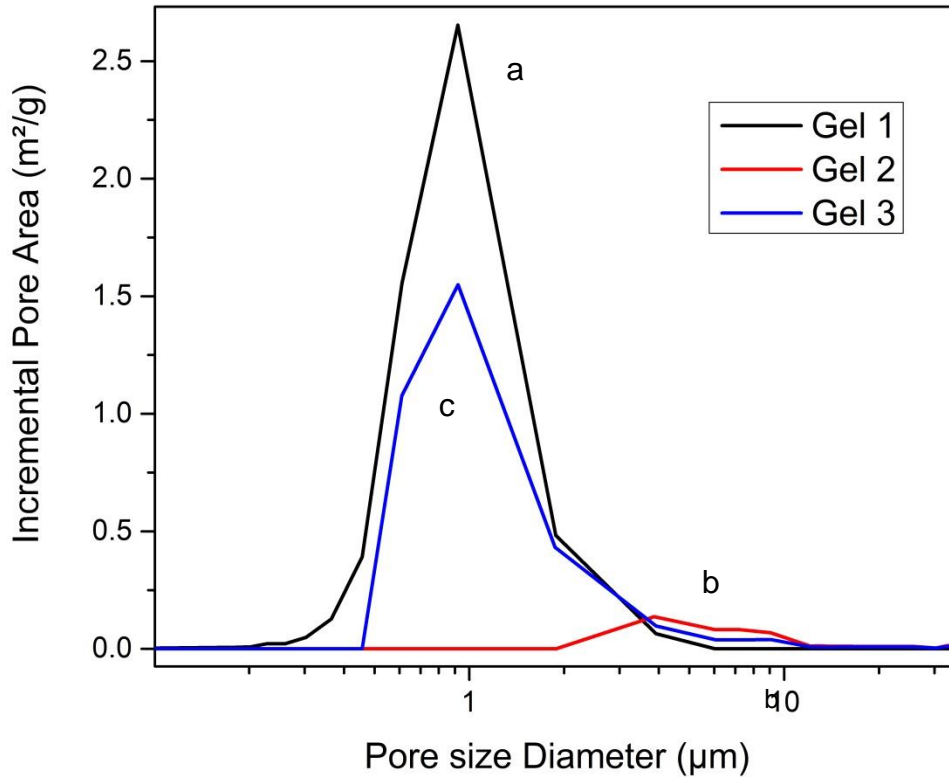


Figura 43. Porosimetría de los geles a las relaciones: a) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 9 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB, b) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 4 mg de IB, c) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 24,3 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB

El área de poro acumulada del gel sin HP- β -CD (Figura 43b) presenta $0,50\text{ m}^2/\text{g}$, el que tiene 9 mg de HP- β -CD (Figura 43a) presenta $5,4\text{ m}^2/\text{g}$ y $3,5\text{ m}^2/\text{g}$ para el gel con 24,3 mg de HP- β -CD (Figura 43c), mostrando que una gran cantidad de CD disminuye la porosidad. Esto puede ser debido también a que esta relación encapsula una mayor cantidad de IB, dejando menos poros vacíos.

FTIR

La relación CMC/CS 2,7 muestra La señal a 1640 cm^{-1} de la amida en CS, las bandas a 1412 y 1315 cm^{-1} correspondientes a CMC y la señal a 1380 cm^{-1} correspondientes a -CH_2 de CS (Figura 44).

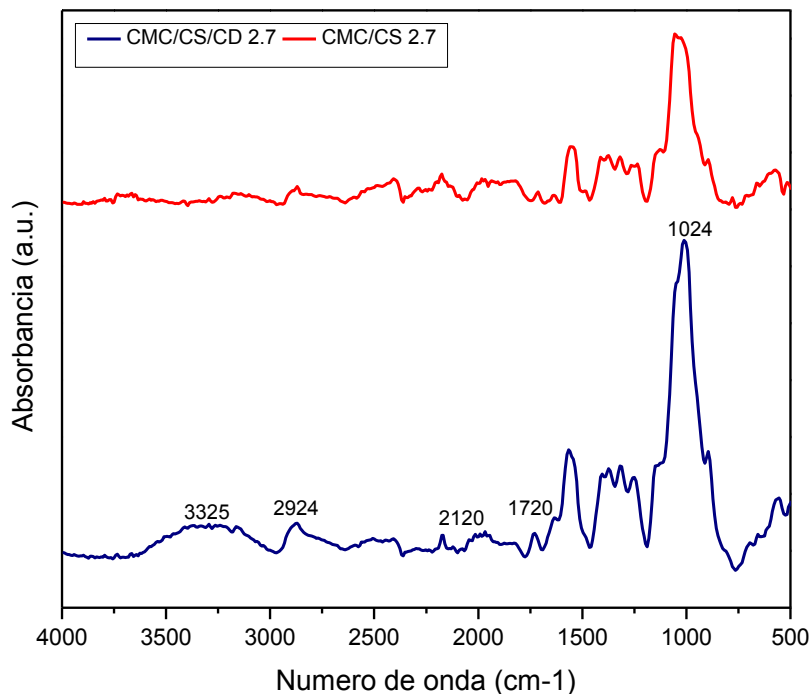


Figura 44. Espectros FTIR de hidrogeles hechos de a) CMC/CS/CD 2,7/1/1 (b) CMC/CS 2,7/1.

El gel la relación CMC/CS/CD muestra los picos característicos de la CMC, CS y CD. Las CDs presentan picos de los sacáridos alrededor de $1000\text{-}1200\text{ cm}^{-1}$ y los grupos hidroxilo en 1635 cm^{-1} [179], en 3325 cm^{-1} presenta las bandas O-H, en 2924 cm^{-1} las vibraciones C-H de CH_2 , en 1456 cm^{-1} la banda C-H de CH_2 y CH_3 y en 1364 cm^{-1} el C-H de CH_3 . Una de los cambios más notorios se observa en la bandas 2120 y 1720 cm^{-1} del enlace C-O. En 1331 cm^{-1} se encuentran acopladas las bandas de O-C-H, C-O-H y H-C-H, en 1152 cm^{-1} el enlace C-O-C, en 1024 cm^{-1} el enlace C-C-O de C-OH y en

947 cm^{-1} la vibración que implica el enlace α -1,4. Finalmente en 851 cm^{-1} las vibraciones C–C–H, C–O, C–C [180]

SEM de los hidrogeles con CD y fármacos

HP- β -CD

Finalmente, en la Figura 45 se puede observar el gel obtenido bajo las condiciones CMC/CS/HP- β -CD 2,7/1/1, el cual da lugar a una eficacia de asociación de IB del 76.5%, es poroso y tiene apariencia de esponja. Varios trabajos han coincidido en que la CMC y la CS son excelentes formadores de gel [74] ya que entre las dos mejoran el patrón de entrecruzamiento y liberación controlada por vía oral. El CS se solubiliza a pHs ácidos como el del estómago; es allí donde la CMC juega un papel importante al interactuar con el junto con el fármaco y permitir que la liberación se de en el intestino [50]. Un exceso de CMC mejora el encapsulamiento y la liberación controlada [81]. En este trabajo se logró obtener un gel mediante interacción de cargas entre el CMC y el CS y junto con la HP- β -CD se logra una eficacia de encapsulamiento del 76%, lo que sugiere que el sistema es adecuado para la liberación controlada de IB.

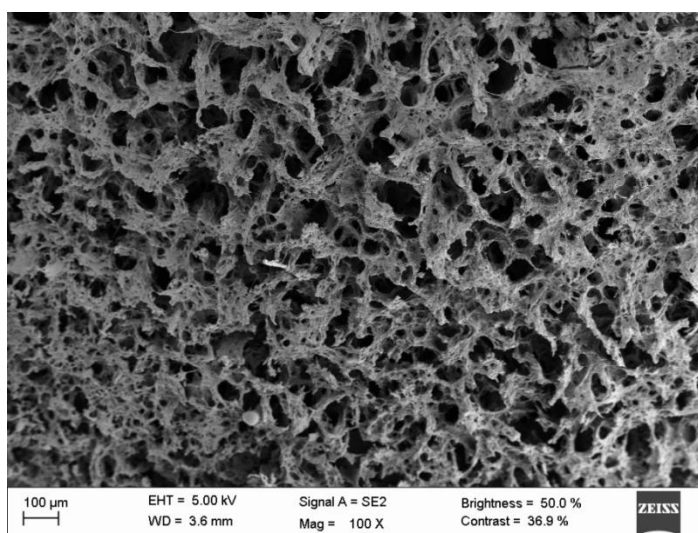


Figura 45. Imagen SEM del gel CMC/CS-HP- β -CD (2,7:1:1) con 9 mg IB

El gel elaborado con una relación CMC/CS de 2,7 muestra un gel compacto y duro. La imágenes SEM (Figura 46) no muestran grandes diferencias entre los geles sin HP- β -CD y con IB (Figura 46a), con HP- β -CD sin IB (Figura 46b) y con HP- β -CD y con IB (Figura 46c) aunque son un poco más parecidas las Figura 46 a y c, que son las que tienen IB. Kono y otros [104] afirman que la superficie de los materiales CD:CMC parece compactarse en comparación al hidrogel de CMC.

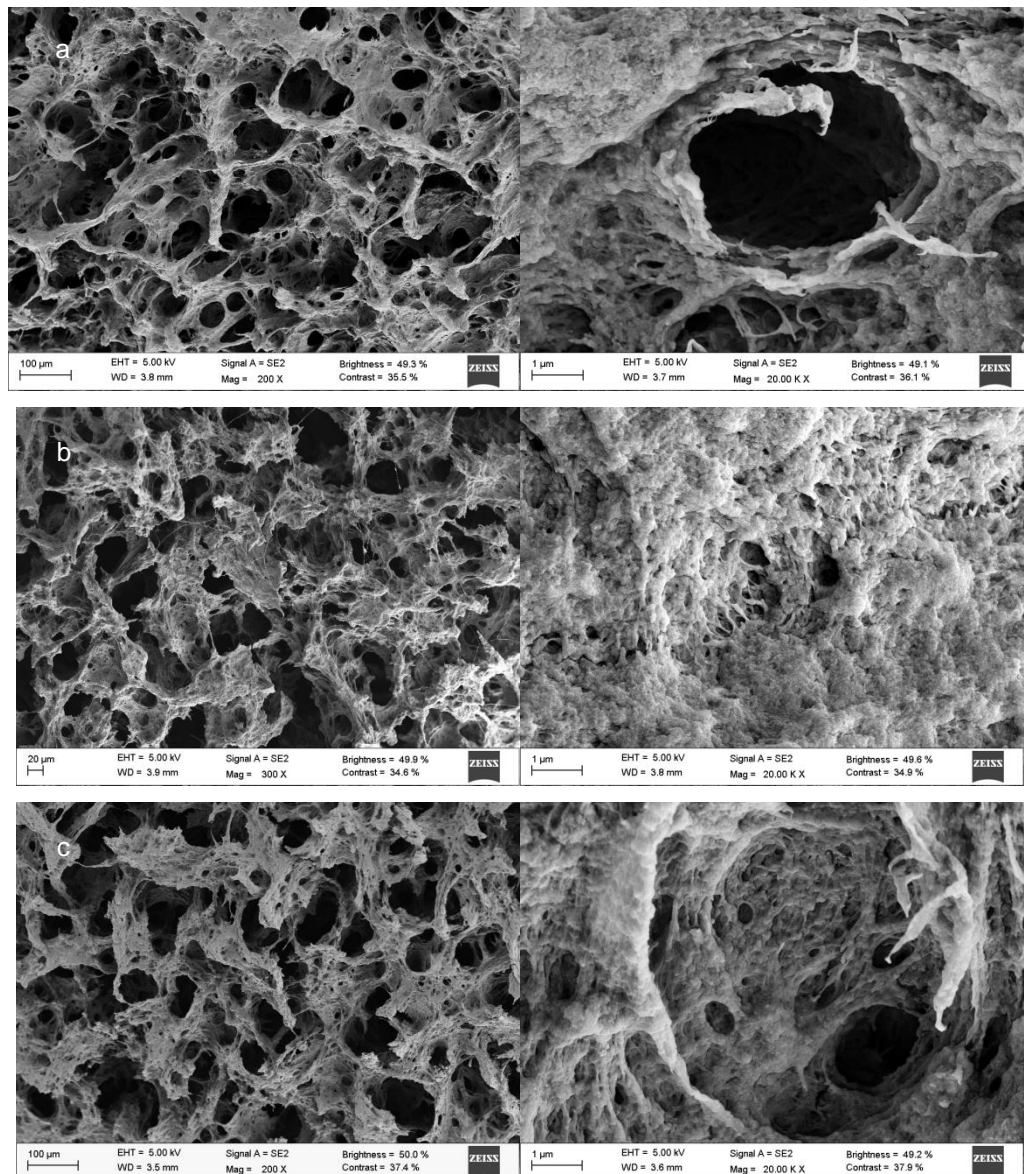
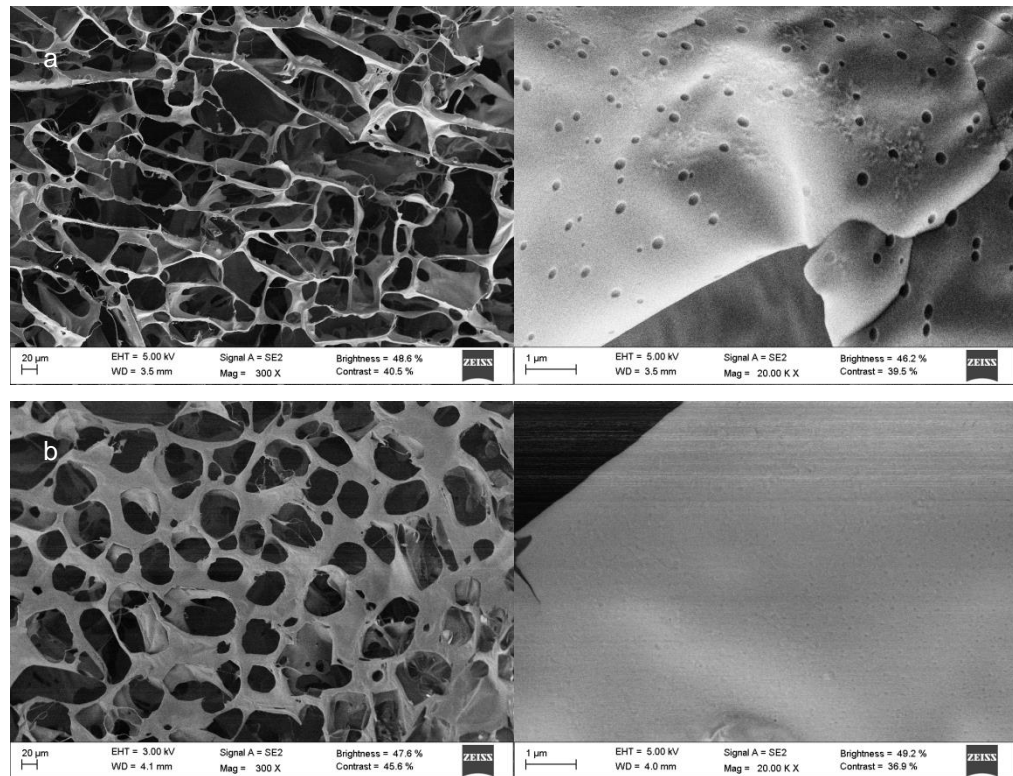


Figura 46. a) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB, b) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 9 mg HP- β -CD, c) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 7 mg IB, 9 mg HP- β -CD.

Temtem y otros [181] adjudican el alargamiento de los poros al introducir el IB a la plastificación y la hinchazón de la matriz polimérica por la descompresión rápida de cambio de presiones. En este trabajo se observa el mismo comportamiento usando una técnica de interacción de cargas.

En cuanto a la relación CMC/CS 200, las muestras a simple vista tienen una estructura algodonosa. Las imágenes SEM muestran redes con poros de tamaños no uniformes. De nuevo las imágenes más similares son las Figura 47 a y c que son las que tienen IB. El gel sin HP- β -CD y con IB muestra una pared con poros muy pequeños (Figura 47a), que desaparecen al quitar el IB e incluir HP- β -CD (Figura 47b) y aparecen más pequeños al incluir de nuevo el IB (Figura 47c).



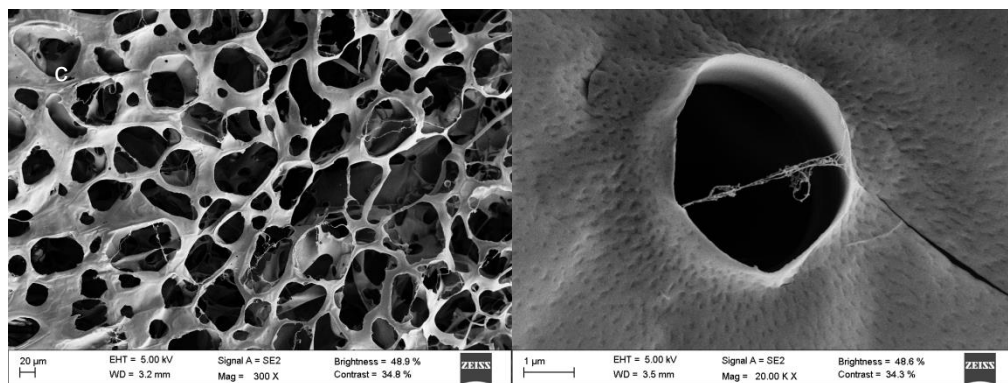


Figura 47. A) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 0,6 mg IB B) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 70 mg HP- β -CDC) 70 mg CMC, 0,7 mg CS, 1 mg IB, 70 mg HP- β -CD

Según Temtem y otros [181] la liberación de fármaco de la membrana sin CDs se debe principalmente a la alta porosidad de la matriz que permiten la humectación dentro de la matriz promoviendo la disolución y difusión desde la membrana. Al agregar CDs hay un aumento significativo en la liberación, que puede deberse a la capacidad de la CD de actuar como un agente hidratante, debido a sus grupos hidroxilo que forman enlaces de hidrógeno, y así interferir en la conformación de cadenas poliméricas durante la formación de la membrana, volviendo la matriz menos hidrofóbica.

A- β -CD

En las imágenes SEM (Figura 48) se ve que agregar A- β -CD conduce a la generación de menos poros en la red y que al aumentar su cantidad, se obtienen poros pequeños no distribuidos uniformemente y una red muy densa, un comportamiento muy diferente al obtenido con HP- β -CD donde aún se observan poros grandes.

La A- β -CD tiene una carga positiva, esta puede ser la razón por la cual se ve una estructura más densa y sin poros, debido al incremento de la interacción por la neutralización de cargas, lo que no deja espacio a la interacción con el fármaco.

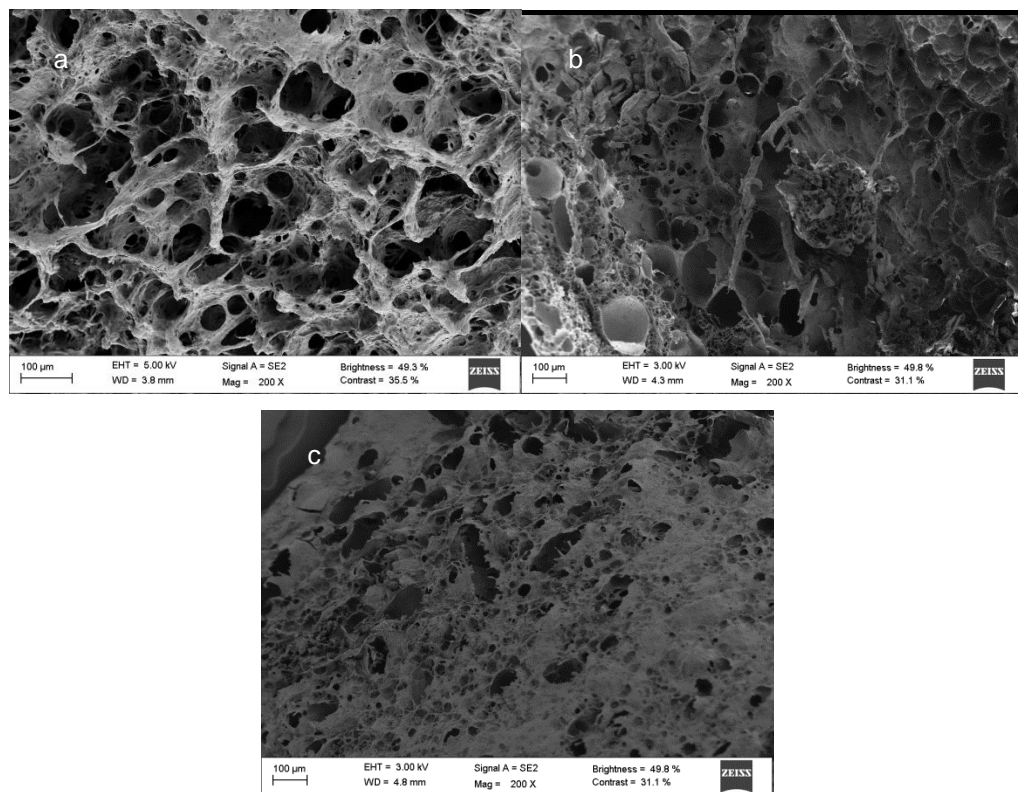


Figura 48. a) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 4 mg IB, b) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 10 mg IB, 9 mg HP- β -CD. c) 24,3 mg CMC, 9 mg CS, 10 mg IB, 24,3 mg HP- β -CD.

Varde y Pack[182] afirman que la inclusión de algunos excipientes interfiere en la encapsulación y liberación de fármacos y dan como ejemplo un trabajo Jain y otros[183] donde al agregar manitol aumentaron la porosidad inicial de la matriz de PLGA, contrario a lo obtenido en este trabajo con la A- β -CD, donde su inclusión condujo a la extinción de poros, lo que afectó la encapsulación de fármaco.

Hinchamiento

Los geles a relación CMC/CS 200 no conservan su estructura, esto se debe a que con alta carga neta la mayoría de las macropartículas se desintegran ya que la CMC se ioniza por completo mientras que CS no está cargado [169].

A pH bajo, los grupos $-NH_2$ en las cadenas CS en el microgel están cargados positivamente debido a la protonación de los grupos amina y por la repulsión entre los

grupos -NH^{3+} en las cadenas CS, el microgel se hincha y aumenta de tamaño [184] (Figura 49).

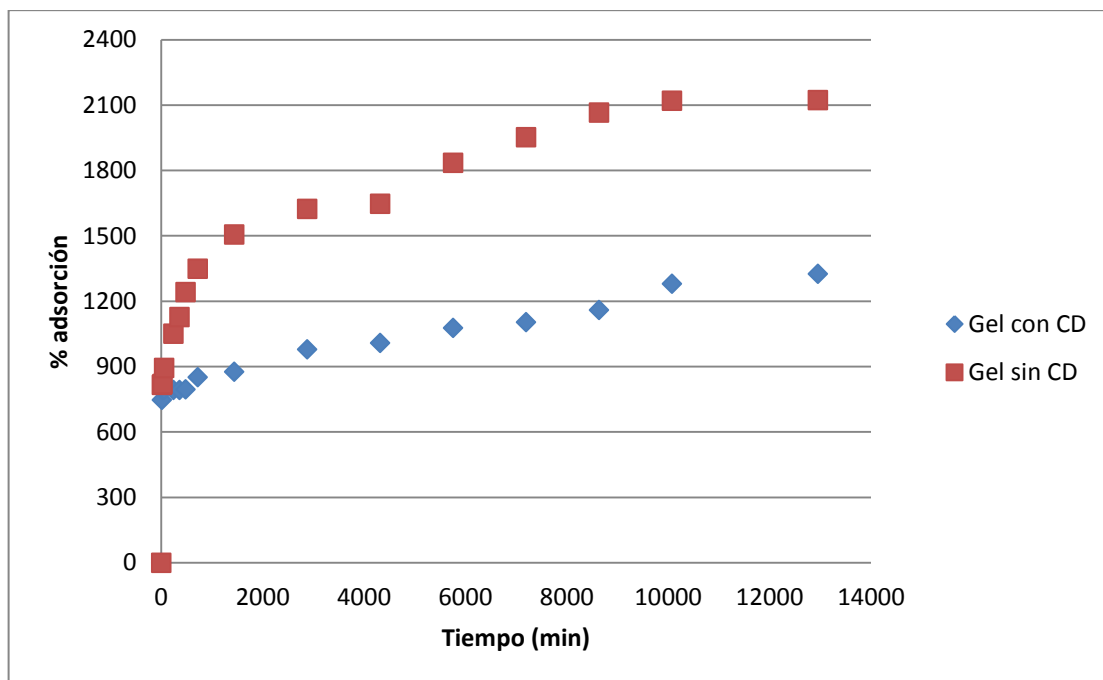


Figura 49. Hinchamiento del gel a pH 2.

A valores de pH extremos ($\text{pH} < 4$ y $\text{pH} > 10$), el tamaño de los microgeles disminuye un poco por la hidrólisis catalizada por ácidos y bases de los enlaces amida dentro del microgel [184]. A pH 2 es menos el hinchamiento con CD debido a su característica aniónica.

A pH 2,4 el CS está protonado ($\text{pKa} \approx 6.5$) mientras que a pH 5, la CMC está ionizada ($\text{pKa} \approx 3.65$), por lo tanto debería esperarse un menor hinchamiento en estos pHs cuando ambos polímeros con carga opuesta están ionizados. Sin embargo Singh y otros [169] observaron un hinchamiento de 3 veces su valor inicial a pH 5 para geles CMC-CS debido a condiciones de cargas no neutras. Como se observó en los potenciales z (Figura 21), los hidrogeles obtenidos en este trabajo no tienen carga neutra y tiene una tendencia negativa y el exceso de CMC es el causal del hinchamiento a pH neutro (Figura 50). A este pH se obtuvo más hinchamiento en el gel con CDs

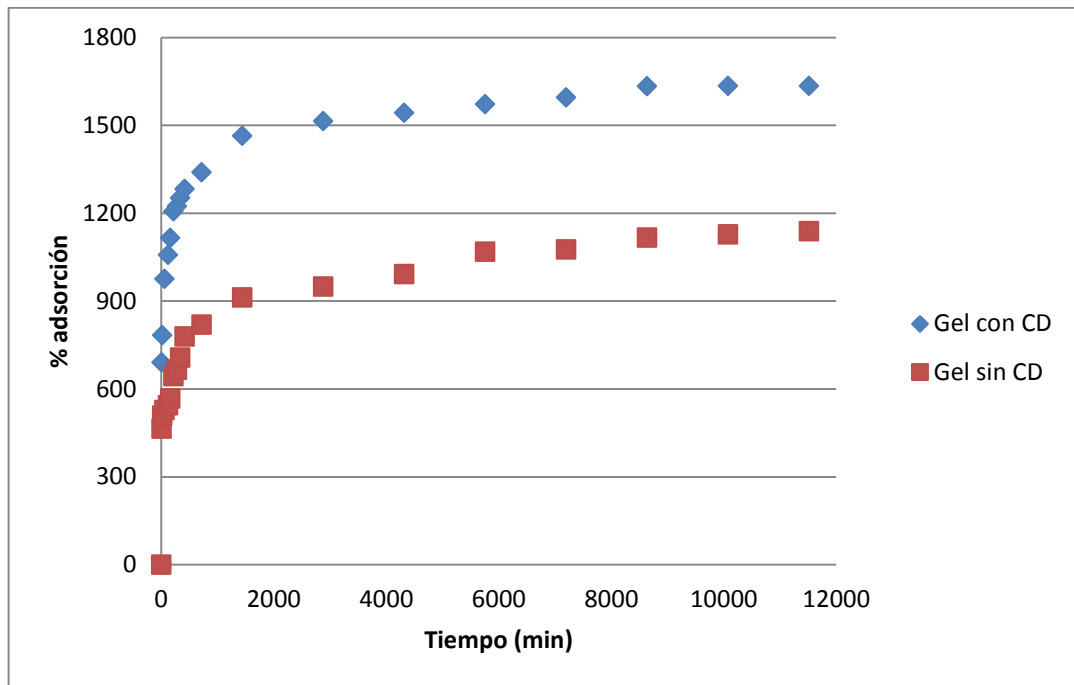


Figura 50. Hinchamiento del gel a pH 5,8.

Los hidrogeles CMC/CS 2,7 presentan mayor hinchamiento a pH 7,4 (Figura 51).

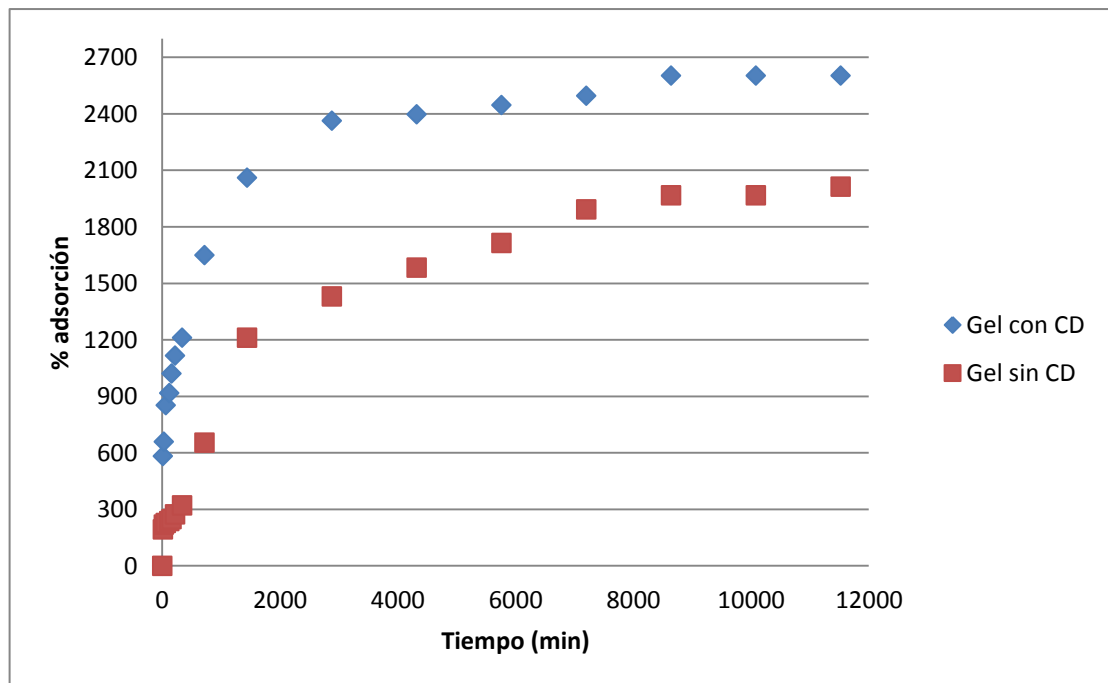


Figura 51. Hinchamiento del gel a pH 7,4.

A pH alto, los grupos $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ en las cadenas de CMC están cargados negativamente debido a la desprotonación de grupos de ácido carboxílico. Por lo tanto, la repulsión entre los grupos $-\text{OCH}_2\text{COO}^-$ en las cadenas de CMC induce el hinchamiento del microgel [184]. A este pH, como en el caso anterior, también se obtuvo más hinchamiento en el gel con CDs

Dhar y otros[184] afirman que obtuvieron mayor hinchamiento a pH bajo que a pH alto, debido a que el CS se encontraba presente en el núcleo del microgel y la CMC en la superficie; por lo tanto, la presencia de grupos $-\text{NH}_2$ en el núcleo de microgel induce una mayor hinchazón a valores de pH más bajos mientras que los grupos $-\text{OCH}_2\text{COOH}$ en ellas superficies de microgel da como resultado una partícula cargada más negativamente en valores de pH más altos. Esto es contrario a este trabajo donde el hinchamiento aumenta con el pH, debido a que el núcleo es CMC

La absorbancia del hidrogel aumenta notablemente con el aumentando el pH del tampón debido a la presencia de grupos carboxilo en la estructura de hidrogel. En la región de pH neutro y alcalino, porque las especies cargadas dominantes en estos hidrogeles no están protonadas grupo carboxilo, los hidrogeles están hinchados debido a una presión intraiónica repulsión entre los grupos carboxilo no protonados [104].

4.4 LIBERACIÓN DE ASA Y DE IB A DIFERENTES pHS

4.4.1 Liberación de ASA a diferentes pH

Al dejar los geles en las diferentes soluciones buffer, se observa que estos presentan diferentes comportamientos según el pH de la solución. A pH 2 no se presenta liberación y entre pH 5,8 y pH 7,4 los geles liberan alrededor de un 80% del ASA encapsulado (Figura 52) de los 1,1 mg encapsulados, siendo mayor la liberación a pH 7,4. Esto está relacionado con el hinchamiento de los geles en cada solución buffer, a mayor

hinchamiento mayor liberación, esto es debido a que las moléculas de agua entran y retiran el fármaco.

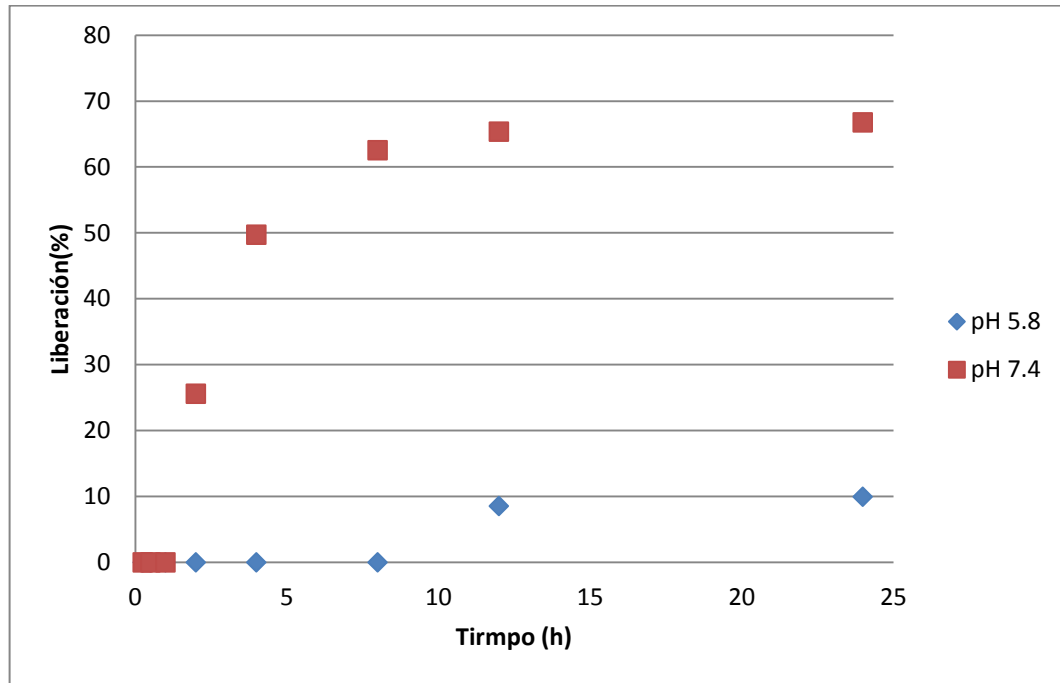


Figura 52. Liberación de ASA a diferentes pHs en geles elaborados sin CD

Con HP- β -CD se obtiene un 40% de liberación sobre los 3,4 mg encapsulados (Figura 53), a diferencia del gel sin CD. La cantidad liberada es casi el doble de la liberada sin usar CD. Este gel pierde su consistencia en menor tiempo al gel que no tiene CD y a pHs 2 y 5,8 no presenta liberación.

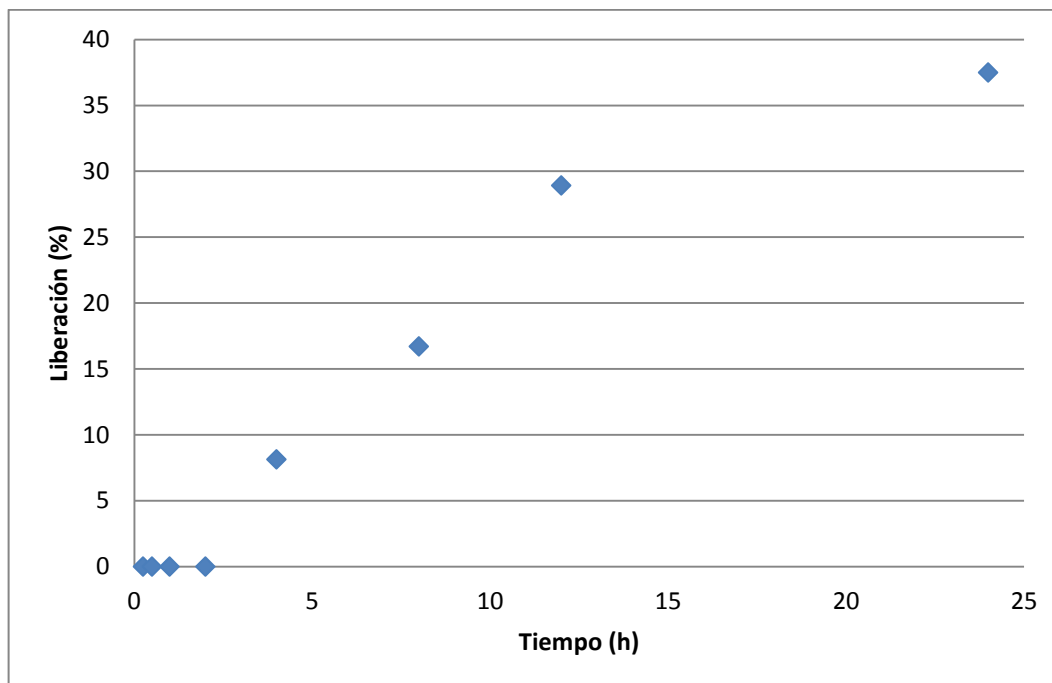


Figura 53. Liberación de ASA a pH 7,4 en geles con CD.

Los hidrogeles a relación 200 sin CD hinchaban en agua sin desintegrarse, esto es debido a que la CD disminuye las interacciones poliméricas [168] y Según Kono y otros [104], el hinchamiento disminuye con el aumento de las CD.

4.4.2 Liberación de IB a diferentes pH

Los geles preparados a una relación de 200 presentan muy mala estabilidad en suspensiones acuosas, dificultando la lectura de la liberación en el IB e impidiendo la determinación del hinchamiento.

Los geles preparados con la relación 90 mL CMC (0,27 mg/ml), 90 mL CS (0,1mL/mL), 0,9 mg HP- β -CD y 10 mg IB no liberaron fármaco a pH 5,8; la liberación se realiza a pH 1,2 y 7,4 (Figura 54), a pH 2 la liberación comienza a las 2 horas, alcanzando un valor constante a los 4 días. Esto es efecto del exceso de CS en la muestra, representado por un potencial z positivo en el gel CMC/CS.

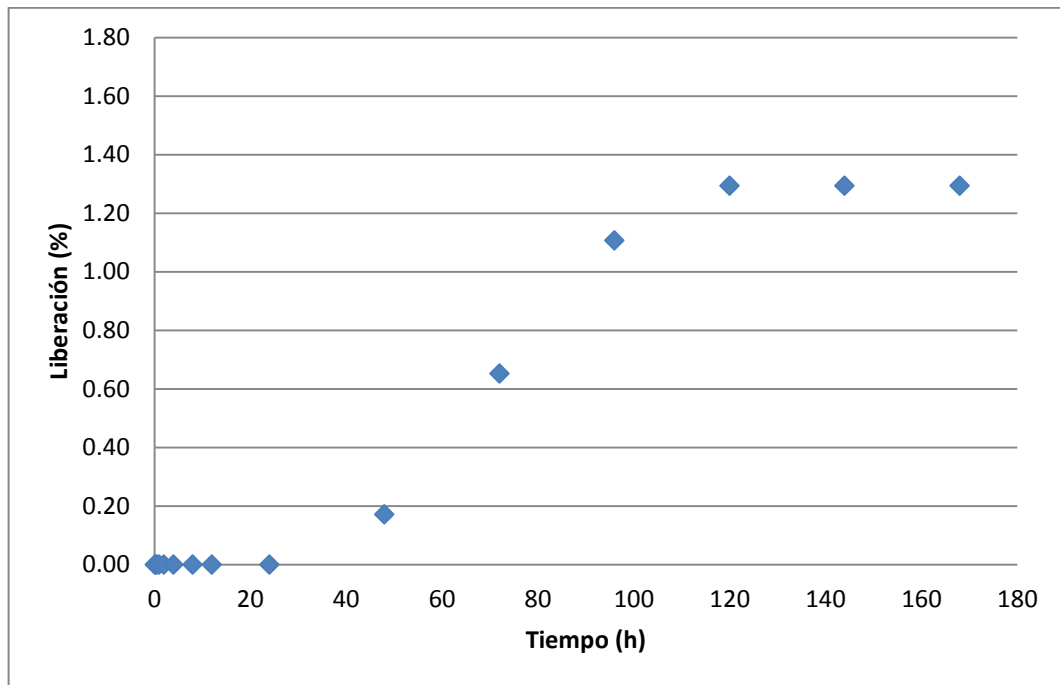


Figura 54. Liberación del IB con el tiempo pH 2

A pH 7,4 la liberación comienza en el minuto 5 siendo mayor entre el minuto 20 y el 100 llegando a una liberación de 37% (Figura 55).

A el comportamiento de liberación a pH 7.4 adopta el modelo de la Ecuación 14 [185].

$$\% = K_1 * (t - K_2)^{K_3}$$

Ecuación 14

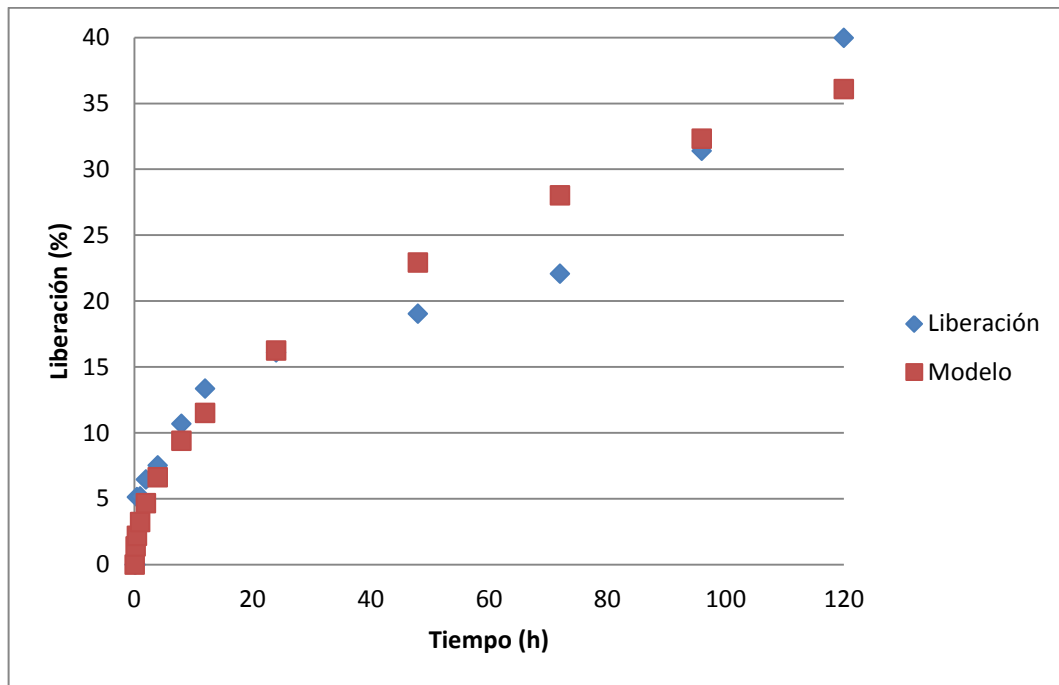


Figura 55. Modelo de liberación pH 7,4

Zhang y *otros* [79] afirman que los geles de CMC y CS a un pH inferior a 2 la liberación es baja debido a que se produce una interacción fuerte entre la CMC y el CS para formar una membrana de superficie densa, la liberación se produce a pH 7,2 debido a la fácil penetración que induce el hinchamiento del polímero.

Jabeen y *otros* indican [171] que los geles de alginato preparados a bajo pH liberan el IB lentamente. Por otro lado los aditivos de celulosa prolongan significativamente la liberación del IB [186]. Tempem y *otros* en membranas de polimetilmetacrilato con CD lograron liberar máximo 12% en peso de IB para la membrana con el contenido más alto de CD en 40 días, mostrando que las tasas de liberación aumentan al aumentar el contenido de CD [181].

4.5 EFECTO DE ESTIMULOS EXTERNOS EN EL HIDROGEL

4.5.1 Análisis termo gravimétrico (TGA)

Para los geles formados con una relación CMC/CS de 2,7; la primera degradación en la región entre 30 y 160°C tiene su origen en la eliminación de agua de los hidrogeles (10% aproximadamente). Esta agua puede estar asociada con la estructura de red de los hidrogeles así como atrapada en la cavidad β CD [156, 187]. La CMC exhibe dos fases de descomposición distintas una a 55°C asociada a la pérdida de humedad y la segunda en el rango entre 230 - 290°C asociada con la descomposición del grupo carboximetilo [187]. La región entre 200 a 350°C puede deberse también a la descomposición de enlaces cruzados de CMC y β CD con una reducción de aproximadamente 40% [156] ya que el HP- β -CD se degrada a 300°C [188].

Malik y *otros* observaron hasta 290°C una pérdida de peso del 43,88% [187] y una masa de hidrogel residual después de los 350°C de aproximadamente 42,03%, que consideran bastante alta representando una gran estabilidad térmica de los hidrogeles de β -CD/CMC-co-ácido poli acrílico.

Entre la Figura 56a y la c no se observa gran diferencia, a pesar de la inclusión de HP- β -CD en la Figura 56a, sólo se observa que se degrada un 2% menos del gel que contiene CD, debido probablemente al aumento de la cantidad de IB.

Aumentar la cantidad de HP- β -CD en el gel (Figura 56d), muestra un aumento en la degradación inicial, incrementando la caída de la curva inicial a 150°C y llegando casi al 15% (comparado con la degradación inicial de 10% en los anteriores), esto se debe a que mayor cantidad de CD produce mayor cantidad de agua atrapada en la cavidad β -CD [156, 187]. La degradación total es la misma que en los casos anteriores, aumentando la cantidad hasta 150°C y disminuyendo entre 150 y 350°C. La presencia de la CD restringe los grados de libertad en la conformación de las cadenas poliméricas, y proporciona una

organización menos aleatoria, lo que también explica el incremento temperatura mientras aumenta la concentración de CD [189].

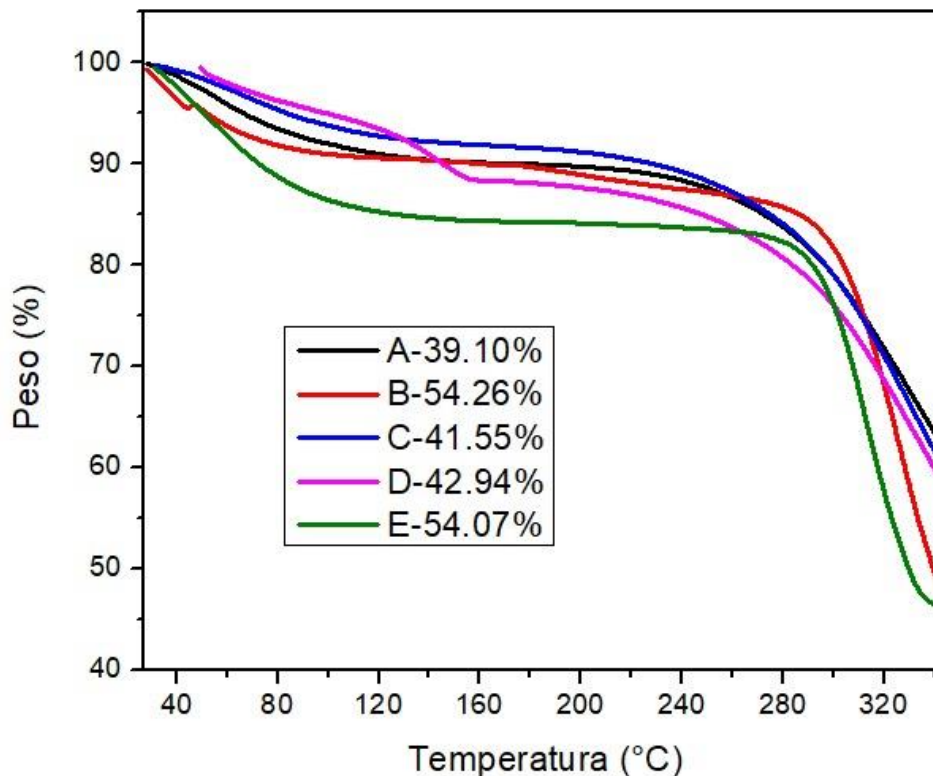


Figura 56. Análisis termo gravimétrico de los geles a las relaciones: a) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 9 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB, b) 140 mg de CMC, 0,7 mg de CS, c) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 4 mg de IB, d) 24,3 mg de CMC, 9 mg de CS, 24,3 mg de HP- β -CD, 10 mg de IB e) 70 mg de CMC, 0,7 mg de CS, 70 mg de HP- β -CD, 1 mg de IB

Variar la proporción de CMC a CS, relación CMC/CS de 200 (Figura 56b y e) frente a la relación CMC/CS 2,7 (Figura 56a, c y d) modifica la degradación térmica del hidrogel, comparando los casos que no tienen HP- β -CD (Figura 56b y c). Aumentar la cantidad de CMC en la relación CMC/CS (Figura 56b) incrementa la cantidad total de gel degradado a 350°C en aproximadamente un 10%, pasando de 10% a casi 20%, dando indicios a que en la relación anterior (CMC/CS 2,7) la mayor parte de gel residual es CS, confirmando su efecto en la liberación a pH 2.

Aumentar la cantidad de HP- β -CD y reducir la CMC en el gel (para la relación CMC/CS 200) (Figura 56e), disminuye el porcentaje de degradación inicial entre 0 y 80°C, por otro lado, genera una pendiente más pronunciada entre los 80 y los 300°C, proporcionando con esto la misma degradación a 300°C con respecto a la Figura 56b y la misma cantidad final de gel degradado a 350°C. Esto se puede explicar por la mayor cantidad de enlaces cruzados de CMC y β CD en la región entre 200 a 350°C [156] y menor descomposición de CMC a 55°C asociada a la pérdida de humedad [187].

4.5.2 Degradación enzimática

La metodología 1 (descrita en métodos) presentó degradación tanto con CD como sin CD (Figura 57), siendo mayor la degradación del hidrogel cuando no hay presencia de CD como consecuencia probable de la disminución del tamaño de poro promedio lo que baja la permeación y disminuye el contacto con todo el gel, además la ciclodextrina inhibe la hidrólisis de amilasa porque se une al centro activo de la amilasa pancreática[190].

La metodología 2 (descrita en métodos) no arrojó degradación o cambio en el peso del gel pre-incubar los geles inicialmente en HCl para pretratar el gel y posteriormente sumergirlos en la enzima. El gel a la relación 2,7 fue elaborado a condiciones ácidas, es por esto que el HCl no lo afecta y es más difícil para las enzimas su degradación.

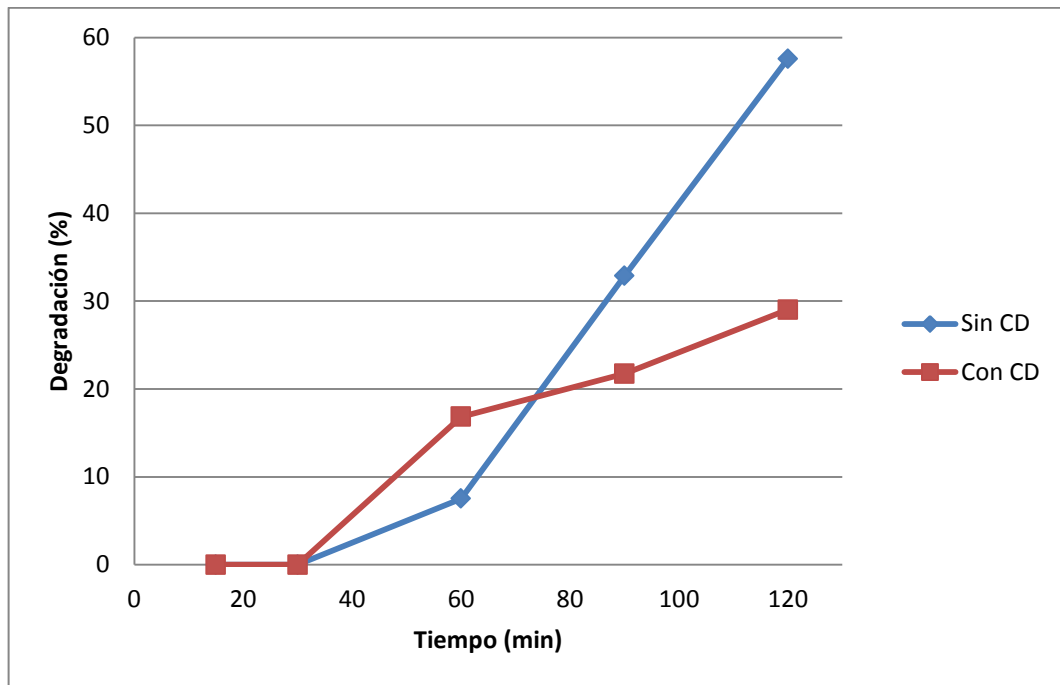


Figura 57. Degradación enzimática

La CD puede ser hidrolizada por la amilasa humana y en un trabajo donde realizaron geles con almidón y CS afirman que la degradación con amilasa es sólo superficial[191] debido a las interacciones entre los polímeros retrasa la degradación del almidón.

Los geles realizados con a una relación CMC/CS de 2.7 contienen mayor cantidad de CS, este polímero es pobremente degradado por la amilasa y no es afectado por el HCl, pero su interacción con otros polímeros como la CMC en la formación de hidrogeles puede interferir aumentando su degradación.[191]

CONCLUSIONES

Agregar CS/CMC genera más rendimiento a altas concentraciones, pero abajas no genera gel, en cuanto al hinchamiento, el que mejores resultados da es CMC/CS por la afinidad del CMC con el agua, siendo el CMC el núcleo del gel, tal como se planeó en el documento. Los poros al contacto con agua se llenan y facilitan la difusión inicial del fármaco y un hinchamiento del polímero lleva a cambios de los poros que también ayuda a la difusión del medicamento.

La complejación de polielectrolitos produce partículas que tienden a aglomerarse. Esto se debe probablemente a la dificultad de las cadenas poliméricas catiónicas y aniónicas para establecer interacciones electrostáticas apropiadas.

La combinación de gelación ionotrópica y técnicas de complejación de polielectrolitos produce valores de potencial z que se acercan a una neutralización de cargas para altas relaciones de CMC/CS, debido a que existe mayor presencia de cargas positivas aportada por el CaCl_2 .

El aumento de cargas positivas aportada por el CaCl_2 a la mezcla CMC/CS, conduce a la obtención de geles con poros más grandes y una red más densa.

Los geles obtenidos a pH 3 y 6 son muy similares, los geles obtenidos sin control de medio están alrededor de 3, pH que según la literatura favorece la encapsulación.

Se obtiene mayor encapsulación de ASA a la mayor relación CMC/CS por disposición de espacio y en la relación 21 cuando se encapsula ASA en el gel ya formado, cuando el potencial z del gel es cercano a cero disminuyendo la repulsión

Para obtener la mayor eficacia de asociación se debe trabajar con la mayor velocidad de flujo y la mayor velocidad de agitación. El diseño de experimento que comprobó que favorece la interacción entre los polímeros y el fármaco.

El rendimiento de gel se ve afectado por la encapsulación del fármaco, debidos a que hay menos puntos de interacción entre polímeros ya que están ocupados por el fármaco

Las CD modificadas proporcionan mayor solubilidad del IB en comparación con la CD sin modificar. La HP- β -CD es la que tiene un mayor efecto sobre solubilidad teniendo al igual que la β -CD un comportamiento lineal positivo, mientras que la A- β -CD presenta una desviación positiva. La mayor afinidad se debe a que el HP- β -CD es también un estabilizador.

La mezcla CD/CMC mejora la solubilidad del IB mientras que la mezcla CD/CS la disminuye, respecto a la CD sola. Porque la adición de CS al medio de complejación de CD provoca una disminución en el poder complejante con fármacos.

A pH 7,4 la repulsión entre los grupos -OCH₂COO- en las cadenas de CMC induce el hinchamiento del microgel, mientras que la presencia de grupos -NH₂ induce una mayor hinchazón a valores de pH más bajos

El hidrogel obtenido en este trabajo es adecuado para liberación a pH 7.4, esto se relaciona con la capacidad de hinchamiento de los geles en cada solución buffer, a mayor hinchamiento mayor liberación debido a que el líquido puede penetrar el gel, expandir su estructura y retirar el fármaco

La degradación térmica evidencia la presencia de los 3 compuestos, CMC, CS y CD, sugiriendo además la no formación de enlaces químicos junto con el FTIR y el RMN.

Las pruebas de degradación enzimática muestran que existió degradación de los hidrogeles tanto con CD como sin CD (Figura 57), siendo mayor la degradación del hidrogel cuando no hay presencia de CD debido a que la ciclodextrina inhibe la hidrólisis de amilasa.

La investigación permitió estandarizar los parámetros de obtención de hidrogeles a partir de CMC y CS con CD, encontrando que el CaCl_2 obstruye la interacción entre polímeros la encapsulación, que la relación CMC/CS afecta la morfología de los geles y que la CD aumenta la encapsulación de fármaco en estos geles.

El gel obtenido puede ser aplicado en la industria debido a que proporciona buenos rendimientos y su materia prima es altamente comercial, podría ser evaluado con otros fármacos para evaluar su porcentaje de liberación y hacer un estudio financiero para evaluar la viabilidad de su aplicación comercial

Se recomienda probar las esponjas de la relación 200 en liberación de parches o en tratamiento bucal

REFERENCIAS

- [1] Siepmann J, Siege RA, Rathbone MJ. Fundamentals and Applications of Controlled Release Drug Delivery. *Advances in Delivery Science and Technology*. New York, NY, United States: Springer-Verlag New York Inc.; 2012. p. 594.
- [2] Barbucci R. *Hydrogels, biological properties and applications*: Springer; 2009.
- [3] Park K, Ottenbrite RM, Okano T. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* 2010.
- [4] Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002;54:3-12.
- [5] Soto D, Oliva H. Métodos para preparar hidrogeles químicos y físicos basados en almidón: Una revisión. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 2012;32:154-75.
- [6] Patil JS, Kamalapur MV, Marapur SC, Kadam DV. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: the novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: a review. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures* 2010;5:241-8.
- [7] Ottenbrite RM, Park K, Okano T. *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* - Springer. In: University VC, Dept. Biomedical Engineering PU, College TWsM, editors. New York: Springer New York; 2010.
- [8] Poonam Patil, Daksha C, Wagh M. A REVIEW ON IONOTROPIC GELATION METHOD: NOVEL APPROACH FOR CONTROLLED GASTRORETENTIVE GELISPHERES. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012;4:27-32.
- [9] Kulkarni RV, Boppana R, Krishna Mohan G, Mutalik S, Kalyane NV. pH-responsive interpenetrating network hydrogel beads of poly(acrylamide)-g-carrageenan and sodium alginate for intestinal targeted drug delivery: Synthesis, in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012;367:509-17.

- [10] Sriamornsak P, Puttipipatkachorn S. Chitosan-Pectin Composite Gel Spheres: Effect of Some Formulation Variables on Drug Release. *Macromolecular Symposia*. 2004;216:17-22.
- [11] Polk A, Amsden B, De Yao K, Peng T, Goosen MFA. Controlled release of albumin from chitosan—alginate microcapsules. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1994;83:178-85.
- [12] Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics 1981.
- [13] Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 2001;70:1-20.
- [14] Singh R, Lillard Jr JW. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology* 2009;83:364-9.
- [15] Ito T, Yeo Y, Highley CB, Bellas E, Benitez CA, Kohane DS. The prevention of peritoneal adhesions by in situ cross-linking hydrogels of hyaluronic acid and cellulose derivatives. *Biomaterials*. 2007;28:975-83.
- [16] Chen SC, Wu YC, Mi FL, Lin YH, Yu LC, Sung HW. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2004;96:285-300.
- [17] Munjeri O, Collett JH, Fell JT. Hydrogel beads based on amidated pectins for colon-specific drug delivery: the role of chitosan in modifying drug release. *Journal of Controlled Release*. 1997;46:273-8.
- [18] Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2010;62:83-99.
- [19] Watkins KA, Chen R. pH-responsive, lysine-based hydrogels for the oral delivery of a wide size range of molecules. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;478:496-503.
- [20] Sahiner M, Alpaslan D, Bitlisli BO. Collagen-based hydrogel films as drug-delivery devices with antimicrobial properties. *Polymer Bulletin*. 2014;71:3017-33.
- [21] Varghese JS, Chellappa N, Fathima NN. Gelatin–carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;113:346-51.
- [22] Luo Y, Teng Z, Wang X, Wang Q. Development of carboxymethyl chitosan hydrogel beads in alcohol-aqueous binary solvent for nutrient delivery applications. *Food Hydrocolloids*. 2012;31:332-9.

- [23] Feeney M, Giannuzzo M, Paolicelli P, Casadei MA. Hydrogels of Dextran Containing Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs as Pendant Agents. *Drug Delivery*. 2007;14:87-93.
- [24] Zamora-Mora V, Velasco D, Hernández R, Mijangos C, Kumacheva E. Chitosan/agarose hydrogels: Cooperative properties and microfluidic preparation. *Carbohydrate Polymers*. 2014;111:348-55.
- [25] Dulong V, Mocanu G, Le Cerf D. A novel amphiphilic pH-sensitive hydrogel based on pullulan. *Colloid and Polymer Science*. 2007;285:1085-91.
- [26] Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55:329-47.
- [27] Liu Z, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2008;60:1650-62.
- [28] Alvarez C, Blanco AM, Concheiro A. Crosslinked ionic polysaccharides for stimuli-sensitive drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008;65:1148-71.
- [29] Fukuda H. Polyelectrolyte Complexes of Chitosan with Sodium Carboxymethylcellulose. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 1980;53:837-40.
- [30] El-Sherbiny I, Abdel-Mogib M, Dawidar AM, Elsayed A, Smyth HDC. Biodegradable pH-responsive alginate-poly (lactic-co-glycolic acid) nano/micro hydrogel matrices for oral delivery of silymarin. *Carbohydrate Polymers*. 2011;83:1345-54.
- [31] Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012;64:49-60.
- [32] Devarakonda B, Hill RA, Liebenberg W, Brits M, de Villiers MM. Comparison of the aqueous solubilization of practically insoluble niclosamide by polyamidoamine (PAMAM) dendrimers and cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;304:193-209.
- [33] Yu H, Wei H, Hou D, Zhang A-y, Feng Z-g. Composite hydrogels filled with inclusion complexes made from β -cyclodextrins with poly(propylene glycol) bisamine. *Current Applied Physics*. 2007;7:116-9.
- [34] Rodriguez-Tenreiro C, Alvarez-Lorenzo C, Rodriguez-Perez A, Concheiro A, Torres-Labandeira JJ. Estradiol sustained release from high affinity cyclodextrin hydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2007;66:55-62.
- [35] Fundueanu G, Constantin M, Dalpiaz A, Bortolotti F, Cortesi R, Ascenzi P, et al. Preparation and characterization of starch/cyclodextrin bioadhesive microspheres as platform for nasal administration of Gabexate Mesylate (Foy®) in allergic rhinitis treatment. *Biomaterials*. 2004;25:159-70.

- [36] Lee ES, Kwon MJ, Lee H, Kim JJ. Stabilization of protein encapsulated in poly(lactide-co-glycolide) microspheres by novel viscous S/W/O/W method. *International Journal of Pharmaceutics*. 2007;331:27-37.
- [37] Maestrelli F, Garcia-Fuentes M, Mura P, Alonso MJ. A new drug nanocarrier consisting of chitosan and hydroxypropylcyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;63:79-86.
- [38] Filipović-Grčić J, Voinovich D, Moneghini M, Bećirević-Laćan M, Magarotto L, Jalšenjak I. Chitosan microspheres with hydrocortisone and hydrocortisone-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2000;9:373-9.
- [39] De Rosa G, Larobina D, Immacolata La Rotonda M, Musto P, Quaglia F, Ungaro F. How cyclodextrin incorporation affects the properties of protein-loaded PLGA-based microspheres: the case of insulin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin system. *Journal of Controlled Release*. 2005;102:71-83.
- [40] Boudad H, Legrand P, Lebas G, Cheron M, Duchêne D, Ponchel G. Combined hydroxypropyl- β -cyclodextrin and poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles intended for oral administration of saquinavir. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;218:113-24.
- [41] Scalia S, Tursilli R, Bianchi A, Nostro PL, Bocci E, Ridi F, et al. Incorporation of the sunscreen agent, octyl methoxycinnamate in a cellulosic fabric grafted with β -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006;308:155-9.
- [42] Wang J-h, Cai Z. Incorporation of the antibacterial agent, miconazole nitrate into a cellulosic fabric grafted with β -cyclodextrin. *Carbohydrate Polymers*. 2008;72:695-700.
- [43] Smith JS, MacRae RJ, Snowden MJ. Effect of SBE7- β -cyclodextrin complexation on carbamazepine release from sustained release beads. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2005;60:73-80.
- [44] Cirri M, Rangoni C, Maestrelli F, Corti G, Mura P. Development of Fast-Dissolving Tablets of Flurbiprofen-Cyclodextrin Complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2005;31:697-707.
- [45] Doane T, Burda C. Nanoparticle mediated non-covalent drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2012;65:607-21.
- [46] Gong R, Li C, Zhu S, Zhang Y, Du Y, Jiang J. A novel pH-sensitive hydrogel based on dual crosslinked alginate/N- α -glutaric acid chitosan for oral delivery of protein. *Carbohydrate Polymers*. 2011;85:869-74.

- [47] Heydari S, kakhki RM. Thermodynamic study of complex formation of β -cyclodextrin with ibuprofen by conductometric method and determination of ibuprofen in pharmaceutical drugs. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017;10:S1223-S6.
- [48] Islam A, Yasin T, Bano I, Riaz M. Controlled release of aspirin from pH-sensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Journal of Applied Polymer Science*. 2012;124:4184-92.
- [49] Lamprecht A, Ubrich N, Yamamoto H, Schäfer U, Takeuchi H, Maincent P, et al. Biodegradable Nanoparticles for Targeted Drug Delivery in Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *J Pharmacol*. 2001;299:775-81
- [50] Sinha VR, Kumria R. Polysaccharides in colon-specific drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2001;224:19-38.
- [51] Tozaki H, Fujita T, Odoriba T, Terabe A, Suzuki T, Tanaka C, et al. Colon-specific delivery of R68070, a new thromboxane synthase inhibitor, using chitosan capsules: Therapeutic effects against 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced ulcerative colitis in rats. *Life Sciences*. 1999;64:1155-62.
- [52] Mustafa A, Tomescu A, Cadar E, Cherim M, Sirbu R. Polyelectrolyte Complexes Based on Chitosa and Natural Polymers. *European Journal of Interdisciplinary Studies*. 2016;4:100-7.
- [53] Remuñán-López C, Portero A, Vila-Jato JL, Alonso MaJ. Design and evaluation of chitosan/ethylcellulose mucoadhesive bilayered devices for buccal drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 1998;55:143-52.
- [54] Marciello M, Rossi S, Caramella C, Remuñán-López C. Freeze-dried cylinders carrying chitosan nanoparticles for vaginal peptide delivery. *Carbohydrate Polymers*. 2017;170:43-51.
- [55] Portero A, Teijeiro-Osorio D, Alonso MJ, Remuñán-López C. Development of chitosan sponges for buccal administration of insulin. *Carbohydrate Polymers*. 2007;68:617-25.
- [56] Zhou HY, Chen XG, Kong M, Liu CS, Cha DS, Kennedy JF. Effect of molecular weight and degree of chitosan deacetylation on the preparation and characteristics of chitosan thermosensitive hydrogel as a delivery system. *Carbohydrate Polymers*. 2008;73:265-73.
- [57] Ko JA, Park HJ, Hwang SJ, Park JB, Lee JS. Preparation and characterization of chitosan microparticles intended for controlled drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;249:165-74.

- [58] Wang Q, Zhang J, Wang A. Preparation and characterization of a novel pH-sensitive chitosan-g-poly (acrylic acid)/attapulgit/sodium alginate composite hydrogel bead for controlled release of diclofenac sodium. *Carbohydrate Polymers*. 2009;78:731-7.
- [59] Islam A, Riaz M, Yasin T. Structural and viscoelastic properties of chitosan-based hydrogel and its drug delivery application. 2013;59:119-24.
- [60] Belluzo MS, Medina LF, Cortizo AM, Cortizo MS. Ultrasonic compatibilization of polyelectrolyte complex based on polysaccharides for biomedical applications. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2016;30:1-8.
- [61] Nascimento A, Laranjeira MC, Fávere VT, Josué A. Impregnation and release of aspirin from chitosan/poly(acrylic acid) graft copolymer microspheres. *J Microencapsul*. 2001;18:679-84.
- [62] Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, et al. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 2004;274:1-33.
- [63] Lai W-F, Shum HC. Hypromellose-*graft*-chitosan and its polyelectrolyte complex as novel system of sustained drug delivery. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016;7:10501-10.
- [64] Abioye AO, Issah S, Kola-Mustapha AT. *Ex vivo* skin permeation and retention studies on chitosan-ibuprofen-gellan *ternary* nanogel prepared by *in situ* ionic gelation technique-a tool for controlled transdermal delivery of ibuprofen. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;490:112-30.
- [65] Saboktakin MR, Tabatabaie RM, Maharramov A, Ramazanov MA. Synthesis and *in vitro* evaluation of carboxymethyl starch–chitosan nanoparticles as drug delivery system to the colon. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2011;48:381-5.
- [66] Gotoh T, Matsushima K, Kikuchi K-I. Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. *Chemosphere*. 2004;55:135-40.
- [67] Wang L, Khor E, Lim L-Y. Chitosan - alginate - CaCl₂ system for membrane coat application. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2001; 90:1134-42.
- [68] Tavakol M, Vasheghani-Farahani E, Hashemi-Najafabadi S. The effect of polymer and CaCl₂ concentrations on the sulfasalazine release from alginate-N,O-carboxymethyl chitosan beads. *Progress in Biomaterials*. 2013;2:1-8.
- [69] Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan - based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;64:353-67.

- [70] Kim MS, Park SJ, Gu BK, Kim C-H. Ionically crosslinked alginate-carboxymethyl cellulose beads for the delivery of protein therapeutics. *Applied Surface Science* 2012;262:28:33.
- [71] Lin SY, Lin PC. The influence of sodium bicarbonate and sodium tripolyphosphate and the adding sequence on the formation and dissolution of theophylline chitosan microcapsules. *STP pharma sciences*. 1992;2:500-5.
- [72] Madhusudana Rao K, Mallikarjuna B, Krishna Rao KSV, Prabhakar MN, Chowdoji Rao K, Subha MCS. Preparation and characterization of pH sensitive poly(vinyl alcohol)/sodium carboxymethyl cellulose IPN microspheres for in vitro release studies of an anti-cancer drug. *Polymer Bulletin*. 2012;68:1905-19.
- [73] Xiao C, Li H, Gao Y. Preparation of fast pH-responsive ferric carboxymethylcellulose/poly(vinyl alcohol) double-network microparticles. *Polymer International*. 2009;58:112-5.
- [74] Poonam P, Chavanke D, Milind W. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive gelspheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2012;4:27-32.
- [75] Cui Z, Mumper RJ. Chitosan-based nanoparticles for topical genetic immunization. *Journal of Controlled Release* 2001;75:409:19.
- [76] Bhattacharya SS, Ghosh AK, Banerjee S, Chattopadhyay P, Ghosh A. Al³⁺ ion cross-linked interpenetrating polymeric network microbeads from tailored natural polysaccharides. *International Journal of Biological Macromolecules* 2012;51:1173-84.
- [77] Yang S, Fu S, Zhou Y, Xie C, Li X. Preparation and Release Properties of a pH-Tunable Carboxymethyl Cellulose Hydrogel/Methylene Blue Host/Guest Model. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 2010;60:62-74.
- [78] Pal K, Paulson AT, Rousseau D. Biopolymers in Controlled-Release Delivery Systems. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Boston: William Andrew Publishing; 2013. p. 329-63.
- [79] Zhang L, Jin Y, Liu H, Du Y. Structure and Control Release of Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Microcapsules. *Journal of Applied Polymer Science*. 2001;82:584-92.
- [80] Bigucci F, Abruzzo A, Vitali B, Saladini B, Cerchiara T, Galluci MC, et al. Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of

chlorhexidine: Preparation, characterization and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*. 2015;478:456-63.

[81] Cerchiara T, Abruzzo A, Parolin C, Vitali B, Bigucci F, Galluci MC, et al. Microparticles based on chitosan/carboxymethylcellulose polyelectrolyte complexes for colon delivery of vancomycin. *Carbohydrate Polymers*. 2016;143:124-30.

[82] Wang FJ, Lu FS, Cui M, Shao ZQ. Biocompatible Microcapsule of Carboxymethyl Cellulose/Chitosan as Drug Carrier. *Advanced Materials Research*. 2015;1118:227-36.

[83] Siritientong T, Aramwit P. Characteristics of carboxymethyl cellulose/sericin hydrogels and the influence of molecular weight of carboxymethyl cellulose. *Macromolecular Research*. 2015;23:861-6.

[84] Wach RA, Mitomo H, Nagasawa N, Yoshii F. Radiation crosslinking of carboxymethylcellulose of various degree of substitution at high concentration in aqueous solutions of natural pH. *Radiation Physics and Chemistry*. 2003;68:771-9.

[85] Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *J Pharm Sci* 1996;85:1017-25.

[86] Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem Rev* 1998;98:1743-54.

[87] Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*. 2004;39:1033-46.

[88] Zhang N, Li J, Jiang W, Ren C, Li J, Xin J, et al. Effective protection and controlled release of insulin by cationic β -cyclodextrin polymers from alginate/chitosan nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2010;393:213-9.

[89] Yang X, Kim J-C. Novel pH-sensitive microgels prepared using salt bridge. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;388:58-63.

[90] Xin J, Guo Z, Chen X, Jiang W, Li J, Li M. Study of branched cationic β -cyclodextrin polymer/indomethacin complex and its release profile from alginate hydrogel. *International Journal of Pharmaceutics* 2010;386:221-8.

[91] Cataldo D, Evrard B, Noel A, Foidart JM. Use of cyclodextrin for treatment and prevention of bronchial inflammatory diseases. *Google Patents*; 2010.

[92] Rajewskix RA, Stella VJ. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1996;85:1142-69.

[93] Challa R, Ahuja A, Ali J, Khar RK. Cyclodextrins in drug delivery: An updated review. *AAPS PharmSciTech*. 2005;6:E329-E57.

- [94] Li J, Xiao H, Li J, Zhong Y. Drug carrier systems based on water-soluble cationic β -cyclodextrin polymers. *International Journal of Pharmaceutics* 2004;278:329-42.
- [95] Gil ES, Li J, Xiao H, Lowe TL. Quaternary Ammonium β -Cyclodextrin Nanoparticles for Enhancing Doxorubicin Permeability across the In Vitro Blood-Brain Barrier. *Biomacromolecules* 2009;10:505-16.
- [96] Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:1023-35.
- [97] Hattrem MN, Kristiansen KA, Aachmann FL, Dille MJ, Draget KI. Ibuprofen-in-cyclodextrin-in-W/O/W emulsion – Improving the initial and long-term encapsulation efficiency of a model active ingredient. *International Journal of Pharmaceutics.* 2015;487:1-7.
- [98] Loftsson T. Increasing the cyclodextrin complexation of drugs and drug bioavailability through addition of water-soluble polymers 1998.
- [99] Moses LR, Dileep KJ, Sharma CP. Beta cyclodextrin-insulin-encapsulated chitosan/alginate matrix: Oral delivery system. *Journal of Applied Polymer Science.* 2000;75:1089-96.
- [100] Carje A, Juvancz Z, Tokes B. Quantitative Characterization of Derivatization Effects in Separations Techniques I. Derivatization of Ibuprofen. *Acta Polytechnica Hungarica.* 2013;10:219-230.
- [101] Krauland AH, Alonso MJ. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as macromolecular drug delivery system. *International Journal of Pharmaceutics* 2007;340:134-42.
- [102] Chen Y, Song G, Qiu Y, Tan H, Ye Y, Guo Y. The recent progress in the preparation of chitosan 6-OH immobilized cyclodextrin and its application. *Mini-Reviews in organic chemistry.* 2016;13:154-63.
- [103] Kono H, Teshirogi T. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules.* 2015;72:299-308.
- [104] Kono H, Onishi K, Nakamura T. Characterization and bisphenol A adsorption capacity of β -cyclodextrin-carboxymethylcellulose-based hydrogels. *Carbohydrate Polymers.* 2013;98:784-92.
- [105] Junthip J, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Maton M, Cazaux F, et al. Layer-by-layer coating of textile with two oppositely charged cyclodextrin polyelectrolytes for extended drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research.* 2016;104A:1408-24.

- [106] Yalcin A, Soddu E, Turunc Bayrakdar E, Uyanikgil Y, Kanit L, Armagan G, et al. Neuroprotective Effects of Engineered Polymeric Nasal Microspheres Containing Hydroxypropyl- β -cyclodextrin on β -Amyloid (1-42)-Induced Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105:2372-80.
- [107] Tereyama H. Method of colloid titration (a new titration between polymer ions). *Journal of polymer science Part A*. 1952;8:243-53.
- [108] Lindsay B, Tien CL, Lucia M, Paola P, Mircea Alexandru M. Carboxymethyl starch/alginate microspheres containing diamine oxidase for intestinal targeting. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2016;63:344-53.
- [109] Angelova N, Hunkeler D. Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in biotechnology*. 1999;17:409-21.
- [110] Kaihara S, Suzuki Y, Fujimoto K. *In Situ* synthesis of polysaccharide nanoparticles via polyion complex of carboxymethyl cellulose and chitosan. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*. 2011;85:343-8.
- [111] Severino P, da Silva CF, da Silva MA, Santana MHA, Souto EB. Chitosan Cross-Linked Pentasodium Tripolyphosphate Micro/Nanoparticles Produced by Ionotropic Gelation. *Sugar Tech*. 2016;18:49-54.
- [112] Al-Musa S, Abu Fara D, Badwan AA. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*. 1999;57:223-32.
- [113] Zhu Y-f, Shi J-l, Li Y-s, Chen H-r, Shen W-h, Dong X-p. Storage and release of ibuprofen drug molecules in hollow mesoporous silica spheres with modified pore surface. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2005;85:75-81.
- [114] Wang G, Otuonye AN, Blair EA, Denton K, Tao Z, Asefa T. Functionalized mesoporous materials for adsorption and release of different drug molecules: A comparative study. *Journal of Solid State Chemistry*. 2009;182:1649-60.
- [115] Loftsson T, Hreinsdóttir D, Másson M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005;302:18-28.
- [116] Zhang L, Ruan D, Zhou J. Structure and Properties of Regenerated Cellulose Films Prepared from Cotton Linters in NaOH/Urea Aqueous Solution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2001;40:5923-8.

- [117] Banerjee S, Siddiqui L, Bhattacharya SS, Kaity S, Ghosh A, Chattopadhyay P, et al. Interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel microspheres for oral controlled release application. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012;50:198-206.
- [118] K.C. Gupta, Jabrail FH. Preparation and characterization of sodium hexameta phosphate cross-linked chitosan microspheres for controlled and sustained delivery of centchroman. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2006;38:272–83.
- [119] Rahmouni M, Chouinard F, Nekka F, Lenaerts V, Leroux JC. Enzymatic degradation of cross-linked high amylose starch tablets and its effect on in vitro release of sodium diclofenac. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2001;51:191-8.
- [120] Devi N, Kakati DK, Maji TK. Development of Polyelectrolyte Complex Microparticles for the Encapsulation of Isoniazid. *Macromolecular Symposia*. 2012;313-314:69-78.
- [121] Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2008;74:813-21.
- [122] Barbucci R, Magnani A, Consumi M. Swelling Behavior of Carboxymethylcellulose Hydrogels in Relation to Cross-Linking, pH, and Charge Density. *Macromolecules*. 2000;33:7475-80.
- [123] Liu W, Lv L, Li Y, Wang Y, Wang J, Xue C, et al. Effects of slurry composition on the properties of 3-1 type porous PZT ceramics prepared by ionotropic gelation. *Ceramics International*. 2017;43:6542-7.
- [124] Kulkarni AD, Vanjari YH, Sancheti KH, Patel HM, Belgamwar VS, Surana SJ, et al. Polyelectrolyte complexes: mechanisms, critical experimental aspects, and applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016;44:1615-25.
- [125] Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;53:321-39.
- [126] Horcajada P, Rámila A, Pérez-Pariente J, Vallet R, x, M. Influence of pore size of MCM-41 matrices on drug delivery rate. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2004;68:105-9.
- [127] Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *International Journal of Pharmaceutics*. 1983;15:25-35.
- [128] Dhanaraju M, Sundar V, NandhaKumar S, Bhaskar K. Development and Evaluation of Sustained Delivery of Diclofenac Sodium from Hydrophilic Polymeric Beads. *J Young Pharm*. 2009;1:301-4.

- [129] Huei GOS, Muniyandy S, Sathasivam T, Kumar A, Janarthanan P. Iron cross-linked carboxymethyl cellulose–gelatin complex coacervate beads for sustained drug delivery. *Chemical Papers- Slovak Academy of Sciences*. 2016;70:243-52.
- [130] Hosny EA, Al-Helw ARM, Al-Dardiri MA. Comparative study of in-vitro release and bioavailability of sustained release diclofenac sodium from certain hydrophilic polymers and commercial tablets in beagle dogs. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 1997;72:159-64.
- [131] Sadeghi AMM, Dorkoosh FA, Avadi MR, Saadat P, Rafiee-Tehrani M, Junginger HE. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;355:299-306.
- [132] Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2)2013.
- [133] Silva S, M.L, Braga CRC, Fook MVL, Raposo CMO, Carvalho LH, Canedo EL. Application of Infrared Spectroscopy to Analysis of Chitosan/Clay Nanocomposites. In: (Ed.) TT, editor. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology Brazil InTech*; 2012. p. 524.
- [134] Wang J, Somasundaran P. Adsorption and conformation of carboxymethyl cellulose at solid-liquid interfaces using spectroscopic, AFM and allied techniques. *J Colloid Interface Sci*. 2005;291:75-83.
- [135] Cho AR, Chun YG, Kim BK, Park DJ. Preparation of alginate–CaCl₂ microspheres as resveratrol carriers. *Journal of Materials Science*. 2014;49:4612-9.
- [136] Gåserød O, Smidsrød O, Skjåk-Bræk G. Microcapsules of alginate-chitosan – I: A quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. *Biomaterials*. 1998;19:1815-25.
- [137] Fukuda H, Kikuchi Y. Polyelectrolyte complexes of sodium carboxymethylcellulose with chitosan2003.
- [138] Schatz C, Domard A, Viton C, Pichot C, Delair T. Versatile and Efficient Formation of Colloids of Biopolymer-Based Polyelectrolyte Complexes. *Biomacromolecules*. 2004;5:1882-92.
- [139] Qiu Y, Park. K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64:49-60.

- [140] Gulrez SKH, Al-Assaf S, Phillips GO. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications. In: Carpi A, editor. Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modeling to Technology Applications. Rijeka: InTech; 2011. p. Ch. 05.
- [141] Russo E, Selmin F, Baldassari S, Gennari CGM, Caviglioli G, Cilurzo F, et al. A focus on mucoadhesive polymers and their application in buccal dosage forms. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2016;32:113-25.
- [142] Lamarra J, Rivero S, Pinotti A. Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering: C*. 2016;67:717-26.
- [143] Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2010;6:58-63.
- [144] Lawrie G, Keen I, Drew B, Chandler-Temple A, Rintoul L, Fredericks P, et al. Interactions between Alginate and Chitosan Biopolymers Characterized Using FTIR and XPS. *Biomacromolecules*. 2007;8:2533-41.
- [145] Rosca C, Popa MI, Lisa G, Chitanu GC. Interaction of chitosan with natural or synthetic anionic polyelectrolytes. 1. The chitosan-carboxymethylcellulose complex. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62:35-41.
- [146] Zhao Q, Qian J, An Q, Gao C, Gui Z, Jin H. Synthesis and characterization of soluble chitosan/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complexes and the pervaporation dehydration of their homogeneous membranes. *Journal of Membrane Science*. 2009;333:68-78.
- [147] Baar A, Kulicke W-M, Szablikowski K, Kiesewetter R. Nuclear magnetic resonance spectroscopic characterization of carboxymethylcellulose. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 1994; 195:1483:1492.
- [148] Heux L, Brugnerotto J, Desbrieres J, Versali MF, Rinaudo M. Solid State NMR for Determination of Degree of Acetylation of Chitin and Chitosan. *Biomacromolecules* . 2000;1:746-751.
- [149] Kono H, Anai H, Hashimoto H, Shimizu Y. ¹³C-detection two-dimensional NMR approaches for cellulose derivatives. *Cellulose*. 2015; 22: 2927-2942.

- [150] Lenzi F, Sannino A, Borriello A, Porro F, Capitani D, Mensitieri G. Probing the degree of crosslinking of a cellulose based superabsorbing hydrogel through traditional and NMR techniques. *Polymer*. 2003;44:1577-88.
- [151] Yan L, Qian F, S. Zhu Q. Interpolymer complex polyampholytic hydrogel of chitosan and carboxymethyl cellulose (CMC): Synthesis and ion effect. *Polymer international*. 2001; 50: 1370-1374.
- [152] Omidian H, G Rocca J, Park K. Elastic, Superporous Hydrogel Hybrids of Polyacrylamide and Sodium Alginate. *Macromolecular Bioscience*. 2006; 6- 703-710.
- [153] Ueno K, Shimoto Y, Yokoyama A, Kitagawa H, Takeno S, Sakai T, et al. Alleviation of acetylsalicylic acid-induced fetal toxicity by calcium. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1983; 39:179-188.
- [154] Moore T, Croy S, Mallapragada S, Pandit N. Experimental investigation and mathematical modeling of Pluronic® F127 gel dissolution: drug release in stirred systems. *Journal of Controlled Release*. 2000;67:191-202.
- [155] Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*. 2011;3:1377.
- [156] Ghorpade VS, Yadav AV, Dias RJ. Citric acid crosslinked β -cyclodextrin/carboxymethylcellulose hydrogel films for controlled delivery of poorly soluble drugs. *Carbohydrate Polymers*. 2017;164:339-48.
- [157] Nagarwal RC, Kant S, Singh PN, Maiti P, Pandit JK. Polymeric nanoparticulate system: A potential approach for ocular drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2009;136:2-13.
- [158] Sun L, Zhou S, Wang W, Li X, Wang J, Weng J. Preparation and characterization of porous biodegradable microspheres used for controlled protein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2009;345:173-81.
- [159] Pignatello R, Bucolo C, Ferrara P, Maltese A, Puleo A, Puglisi G. Eudragit RS100® nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;16:53-61.
- [160] Gaba P, Singh S, Gaba M, Gupta GD. Galactomannan gum coated mucoadhesive microspheres of glipizide for treatment of type 2 diabetes mellitus: In vitro and in vivo evaluation. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 2011;19:143-52.

- [161] di Cagno M, Stein PC, Skalko-Basnet N, Brandl M, Bauer-Brandl A. Solubilization of ibuprofen with β -cyclodextrin derivatives: Energetic and structural studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;55:446-51.
- [162] Thorsteinn Loftsson, Auður Magnúsdóttir, Már Másson, Sigurjónsdóttir JF. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2002;91:2307–16.
- [163] Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T. Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2008;34:94-103.
- [164] Dias MMR, Raghavan SL, Pellett MA, Hadgraft J. The effect of β -cyclodextrins on the permeation of diclofenac from supersaturated solutions. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;263:173-81.
- [165] Ribeiro LSS, Ferreira DC, Veiga FJB. Physicochemical investigation of the effects of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with β -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2003;20:253-66.
- [166] Oh I, Lee M-Y, Lee Y-B, Shin S-C, Park I. Spectroscopic characterization of ibuprofen/2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex. *International Journal of Pharmaceutics*. 1998;175:215-23.
- [167] Abd Elbary AA, Salem H, Kharshoum RM. 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Complex with Ketotifen Fumerate for Eye Drops Preparations. *International Journal of Drug Delivery*. 2011; 3:228-240.
- [168] Maswal M, Chat OA, Dar AA. Rheological characterization of multi-component hydrogel based on carboxymethyl cellulose: insight into its encapsulation capacity and release kinetics towards ibuprofen. *Colloid and Polymer Science*. 2015;293:1723-35.
- [169] Singh P, Medronho B, Alves L, da Silva GJ, Miguel MG, Lindman B. Development of carboxymethyl cellulose-chitosan hybrid micro- and macroparticles for encapsulation of probiotic bacteria. *Carbohydrate Polymers*. 2017;175:87-95.
- [170] Argüelles-Monal W, Garciga M, Peniche-Covas C. Study of the stoichiometric polyelectrolyte complex between chitosan and carboxymethyl cellulose. *Polymer Bulletin*. 1990;23:307-313.

- [171] Jabeen S, Maswal M, Chat OA, Rather GM, Dar AA. Rheological behavior and Ibuprofen delivery applications of pH responsive composite alginate hydrogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2016;139:211-8.
- [172] Shelton MC, Posey-Dowty JD, Lingerfelt L, Kirk SK, Klein S, Edgar KJ. Enhanced dissolution of poorly soluble drugs from solid dispersions in carboxymethylcellulose acetate butyrate matrices. *Polysaccharide Materials: Performance by Design: American Chemical Society*. 2009; 5:93-113.
- [173] Yi J-Z, Zhang LM. Biodegradable blend films based on two polysaccharide derivatives and their use as Ibuprofen-releasing matrices. *Journal of Applied Polymer Science*. 2007; 103:3553-3559.
- [174] Loftsson T, Brewster ME. Cyclodextrins as Functional Excipients: Methods to Enhance Complexation Efficiency. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012;101:3019-32.
- [175] Mura P, Corti G, Maestrelli F, Cirri M. The influence of chitosan on cyclodextrin complexing and solubilizing abilities towards drugs. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 2007;59:307-13.
- [176] Shaw LR, Irwin WJ, Grattan TJ, Conway BR. The Effect of Selected Water-Soluble Excipients on the Dissolution of Paracetamol and Ibuprofen. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 2005;31:515-25.
- [177] Zerrouk N, Corti G, Ancillotti S, Maestrelli F, Cirri M, Mura P. Influence of cyclodextrins and chitosan, separately or in combination, on glyburide solubility and permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2006;62:241-6.
- [178] Ungaro F, De Rosa G, Miro A, Quaglia F, La Rotonda MI. Cyclodextrins in the production of large porous particles: Development of dry powders for the sustained release of insulin to the lungs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006;28:423-32.
- [179] Rodríguez-Tenreiro C, alvarez-lorenzo C, Concheiro A, J. Torres-Labandeira J. Characterization of cyclodextrincarbopol interactions by DSC and FTIR. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2004; 77:403-411.
- [180] Udrescu L, Sbârcea L, Fuliás A, Ledeti I, Vlase T, Barvinschi P, et al. Physicochemical characterization of zofenopril inclusion complex with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2015; 80:485-497.
- [181] Temtem M, Pompeu D, Jaraquemada G, Cabrita EJ, Casimiro T, Aguiar-Ricardo A. Development of PMMA membranes functionalized with hydroxypropyl- β -cyclodextrins for

- controlled drug delivery using a supercritical CO₂-assisted technology. *International Journal of Pharmaceutics*. 2009;376:110-5.
- [182] Varde NK, Pack DW. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2004;4:35-51.
- [183] Jain RA, Rhodes CT, Railkar AM, Malick AW, Shah NH. Controlled release of drugs from injectable in situ formed biodegradable PLGA microspheres: effect of various formulation variables. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2000;50:257-62.
- [184] Dhar N, Akhlaghi SP, Tam KC. Biodegradable and biocompatible polyampholyte microgels derived from chitosan, carboxymethyl cellulose and modified methyl cellulose. *Carbohydrate Polymers*. 2012;87:101-9.
- [185] Escobar Ivirico J, Zaldivar D, Agüero Luztonó L, Fernández S, Katime I. Liberación de cefazolina sodica a partir de hidrogeles de copolímeros de poli(acrilamida-co-acido metacrilico). *Revista Iberoamericana de polímeros*. 2003; 1:10.
- [186] Paavola A, Yliruusi J, Rosenberg P. Controlled release and dura mater permeability of lidocaine and ibuprofen from injectable poloxamer-based gels. *Journal of Controlled Release*. 1998;52:169-78.
- [187] Shamshad Malik N, Ahmad M, Minhas M. Cross-linked β -cyclodextrin and carboxymethyl cellulose hydrogels for controlled drug delivery of acyclovir. *PLoS One*. 2017; 12: 1-17.
- [188] Celebioglu A, Umu OCO, Tekinay T, Uyar T. Antibacterial electrospun nanofibers from triclosan/cyclodextrin inclusion complexes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;116:612-9.
- [189] (FAOSTAT) FaAOotUN. Datos estadísticos de productos por región.: <http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=339&lang=es>; 2010.
- [190] Móra S, Simon I, Elödi P. Studies on the active center of pancreatic amylase. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1974; 4:211-216.
- [191] Baran E, Mano JF, Reis RL. Starch-Chitosan hydrogels prepared by reductive alkylation cross-linking. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2004; 15:759-765.