

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias  
Biológicas

**LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL  
DESDE MATRICES POLIMÉRICAS BIODEGRADABLES**

Tesista: Lic. Federico Karp

Directora de Tesis: Dra. Diana Estenoz

Co-directora de Tesis: Dra. Ludmila Turino

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC)  
CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas)

Universidad Nacional del Litoral (UNL)

**-2020**



# AGRADECIMIENTOS

La flecha del tiempo parecería tener una dirección indiscutible. Los momentos se suceden y parecieran definir, siempre, un antes irrecuperable y un después siempre al porvenir. Sin embargo, algo de la naturaleza nos permite a los seres humanos explorar nuestros recuerdos, vivíroslos y vencer, por un momento, a esa inexorable dirección.

En este recorrido, de formación humana y académica, hacer un repaso de las personas que me influyeron sería remontarme a mucho antes de estos pasados 5 años. Tendría que hacer un intento de recordar a un gran número de personas. Será un camino injusto debido a la posibilidad de olvidar. No obstante, vencer la dirección del tiempo es un camino errático y siempre cambiante, espero que puedan disculparme.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores. Diana Estenoz, Julio Luna y Ludmila Turino. Siempre me impulsaron a seguir, con palabras certeras, marcándome un camino seguro. La disposición profesional constante y el cariño fueron los pilares, en los que cada día, me apoye para asistir al laboratorio y poner todo mi esfuerzo para lograr los mejores resultados posibles.

Ludmila, nunca bajó los brazos, siempre aportando sus correcciones e ideas sabiendo que me llevarían a mejorar. Con entusiasmo y perseverancia, me aconsejó y finalmente, confió en mi para cerrar este tan preciado camino que es el de producir y escribir una tesis.

Diana, siempre adelante y mostrándome las mejores opciones, formándome no sólo como científico sino también como persona. Su constante predisposición para ayudarme y aconsejarme son una de las claves del trabajo presentado.

Julio, nunca dejó de pensar en mi porvenir y siempre me aconsejó mirando un poco más allá, donde no todo el mundo tiene la capacidad de llegar, para poder elegir de forma más certera las opciones de mi futuro.

Me gustaría agradecer a Luciano Mengatto, mi director de tesina de grado. En su momento se convirtió en un amigo y hoy más que nunca lo ratifico. Siempre prestando su oído y voz, escucha y consejo.

A Ignacio Helbling, “Nacho”, quien sin pensarlo se convirtió en un compañero de trabajo codo a codo. Pero más que eso, en un gran amigo. Alguien en quien confiar y escuchar. Sé que su mirada crítica y sus consejos me ayudaron tanto en este trabajo como en decisiones para mi futuro profesional.

## AGRADECIMIENTOS

Al grupo completo de Química Fina: Vicky V., Santi V., Malen M., Pablo N., Pablo D., entre otros. Un excelente grupo de personas, fundamental para que el lugar de trabajo no sólo sea productivo sino también cálido y ameno.

A algunos que fueron parte del grupo Química Fina: Fede F., Juan P. y Naty V. Sé que, aún en la distancia, puedo contar con ellos para lo que sea, tal cual ocurrió mientras compartimos el lugar de trabajo.

Al grupo de Polímeros y “La Mesa Pergolera”, haciendo de cada almuerzo y reunión una combinación de discusiones y carcajadas excepcional.

Al grupo de INTEC, en todo su conjunto, de una u otra manera, siempre se hicieron presentes cuando necesité ayuda.

Al Laboratorio de Calidad de Medicamentos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional del Litoral, por su gentileza al donar principios activos para llevar adelante el presente trabajo de investigación.

A CONICET, por darme la oportunidad económica de formarme a un nivel tan alto como el doctoral.

Al país y sus ciudadanos, por los grandes esfuerzos realizados que permiten el acceso a una formación de alto nivel. Este invaluable aporte no se encuentra en muchos lugares del mundo.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y a la Universidad Nacional del Litoral, por abrirme sus puertas para mi formación de grado y posgrado. Poniendo siempre a disposición todos los recursos necesarios.

Al grupo del Dr. Guillermo Castro, German, Nacho, Coty, Bárbara, Nehuen, Manu, Maxi, Berni, Seba, entre otros. Me brindaron una oportunidad invaluable para mi formación y avance en este trabajo. Pero, además, se convirtieron en grandes amigos y compañeros. En conjunto con ellos, a todo el grupo de CINDEFI y la UNLP por su calidez y disponibilidad.

A mi compañera, Victoria, quién me ayudó y me apoyó constantemente en este último tramo. Dándome su aliento y sus consejos cuando las cosas parecían estancarse y no resolverse. Sonriendo y festejando conmigo cada logro y objetivo cumplido.

A mis amigos, que quizás sin darse cuenta, hacen que la vida valga la pena ser vivida. Aún en los momentos más complicados.

Finalmente, a mi familia: madre, hermanos, sobrinas, tíos y primas. A quienes están y a quienes ya no se encuentran entre nosotros. No soy quien soy sin ellos. Soy algo de cada uno. Su profundo amor y apoyo fueron los pilares para concretar este objetivo.

## **PUBLICACIONES A PARTIR DE LA TESIS**

**“PLGA nano- and microparticles for the controlled release of florfenicol: Experimental and theoretical study”**

Federico Karp, Carlos Busatto, Ludmila Turino, Julio Luna, Diana Estenoz

Journal of Applied Polymer Science

doi: 10.1002/app.47248

**“Encapsulation of florfenicol by in situ crystallization into novel alginate-Eudragit RS® blended matrix for pH modulated release”**

Federico Karp, Ludmila Turino, Diana Estenoz, Guillermo Castro, Germán Islán

Journal of Drug Delivery Science and Technology

doi: 10.1016/j.jddst.2019.101241



# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	1
PUBLICACIONES A PARTIR DE LA TESIS .....	3
ÍNDICE.....	5
ABREVIACIONES .....	7
RESUMEN.....	9
SUMMARY .....	11
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	13
LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS.....	15
BIODEGRADACIÓN .....	17
MODELADO MATEMÁTICO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DROGAS.....	19
LIBERACIÓN CONTROLADA DE ANTIBIÓTICOS .....	20
FLORFENICOL .....	26
OBJETIVOS .....	29
OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS .....	31
Objetivos específicos.....	31
CAPÍTULO 1. DISEÑO DE NANO- Y MICROPARTÍCULAS DE PLGA PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL .....	33
INTRODUCCIÓN.....	35
OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y METODOS.....	41
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	47
CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	61
ANEXO 1.1 .....	63
Ensayos preliminares para la caracterización del florfenicol .....	63
ANEXO 1.2 .....	67

Módulo de degradación de PLGA .....	67
Módulo de liberación.....	69
CAPÍTULO 2. SISTEMAS PARTICULADOS BASADOS EN BIOPOLÍMEROS Y EUDRAGIT-RS PARA LA ENCAPSULACIÓN POR CRISTALIZACIÓN <i>IN SITU</i> Y LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL.....	73
INTRODUCCIÓN.....	75
OBJETIVOS.....	81
MATERIALES Y METODOS.....	83
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	89
CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	107
CAPÍTULO 3. IMPLANTES POLIMÉRICOS DE FORMACIÓN <i>IN SITU</i> PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE FLORFENICOL.....	109
INTRODUCCIÓN.....	111
OBJETIVOS.....	115
MATERIALES Y METODOS.....	117
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	123
CONCLUSIONES PRELIMINARES.....	145
CONCLUSIONES GENERALES .....	147
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	151
BIBLIOGRAFÍA	153



# ABREVIACIONES

$\bar{M}_n$ : Peso molecular promedio en número

$\bar{M}_w$ : Peso molecular promedio en peso

Alg: Alginato/s

ATB: Antibiótico/s

CIM: Concentración de inhibición mínima

DLS: Dispersión dinámica de luz

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

EE: Eficiencia de encapsulación

Enc: Encapsulación

EuE100: Eudragit E100

EuRS: Eudragit RS

EuS100: Eudragit S100

FTIR: Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

HPLC: Cromatografía líquida de alta performance

IFIS: Implantes de formación *in situ*

IFIS-IS: Implantes de formación *in situ* por intercambio de solventes

IPD: Índice poblacional de dispersión

Ka: Constante de disociación ácida

PεC: Poli(ε-caprolactona)

PA: Principio activo

pKa: - log (Ka)

PLGA: Ácido poli(láctico-co-glicólico)

PM: Peso molecular

PVA: Alcohol poli(vinílico)

PVP: Poli(vinil-pirrolidona)

SCDDB: Sistema de clasificación y disposición de drogas biofarmacéuticas

SEM: Microscopía electrónica de barrido

SLCD: Sistema/s de liberación controlada de drogas

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

Tg: Temperatura de transición vítrea



# RESUMEN

La liberación controlada de fármacos representa una plataforma científica y tecnológica de gran interés para los campos de la salud humana y animal. Las posibilidades de optimizar el número de dosis y disminuir los efectos secundarios son algunas de las ventajas más importantes. Los sistemas para la liberación controlada de drogas permiten obtener nuevos perfiles farmacocinéticos resolviendo problemas relacionados con la vía de administración y la biodisponibilidad de los principios activos. Entre las opciones para el desarrollo de este tipo de tecnologías, la utilización de matrices poliméricas ha adquirido gran importancia. Los polímeros, en sus diversas conformaciones químicas, permiten la obtención de sistemas con variadas geometrías y características fisicoquímicas. Además, este tipo de materiales representan una oportunidad para el diseño de sistemas estímulo-respuesta, capaces de liberar el fármaco en circunstancias fisiológicas específicas.

En el presente trabajo, se investigaron diferentes sistemas poliméricos para la liberación controlada del antibiótico florfenicol. Este principio activo es un antibiótico de amplio espectro, utilizado en la industria veterinaria para combatir enfermedades infecciosas en diferentes especies. El alto número de dosis requerido y la dificultad para preparar formulaciones adecuadas convierten al florfenicol en un excelente candidato para el diseño de sistemas de liberación controlada. La utilización de polímeros para el diseño de los sistemas otorgó la versatilidad necesaria para explorar diferentes geometrías y tamaños, teniendo en cuenta distintas posibles vías de administración. Se emplearon polímeros de diferentes fuentes y con una biocompatibilidad asegurada. Aprovechando las propiedades químicas de dichos materiales, se buscó desarrollar matrices capaces de liberar el antibiótico florfenicol de forma controlada en diferentes condiciones fisicoquímicas.

Se lograron diseñar matrices poliméricas con diferentes estructuras: nanopartículas, micropartículas, macropartículas o *beads*, e implantes. Se utilizaron polímeros sintéticos como el PLGA y poli(metacrilatos) de la serie Eudragit<sup>R</sup>. También se evaluaron polímeros naturales como el alginato y la pectina. Se ensayaron diferentes técnicas de síntesis como la emulsión- evaporación de solvente, gelación iónica e inversión de fases. Los diferentes sistemas logrados presentaron variadas características en términos de encapsulación/atrapamiento del principio activo y los perfiles de liberación observados.

## RESUMEN

Los sistemas poliméricos desarrollados en la presente investigación representan nuevas y promisorias herramientas para el diseño y aplicación de nuevas terapias basadas en florfenicol.

## SUMMARY

Controlled drug release represents a scientific and technological platform of great interest in the human and animal healthcare fields. The possibilities of optimizing doses and reducing secondary effects are advantages. The systems for controlled drug release allow to obtain new pharmacokinetic profiles solving problems related to the administration ways and the biodisponibility of different active principles. Between the developed technologies of controlled drug release, the use of polymeric matrix has become an important option. Polymers exhibit a great variety of chemical structures and allow the design of systems with different geometries and physicochemical properties. Furthermore, stimuli-responsive polymeric materials are able to release the active principle in the specific conditions of the physiological media.

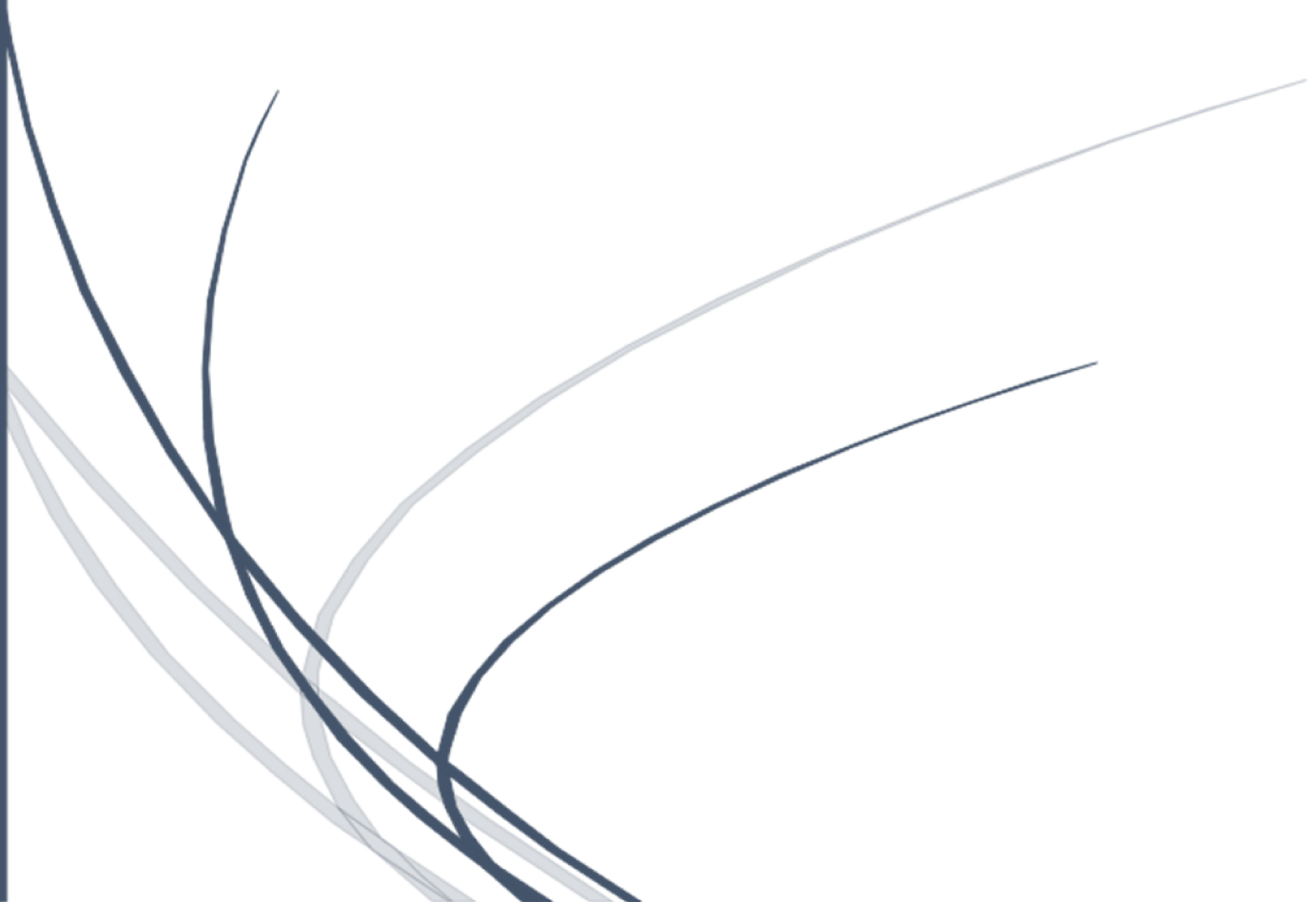
In the present work, different polymeric systems were investigated for the controlled release of the antibiotic florfenicol. This active principle is a broad spectrum antibiotic widely used in the veterinary industry against different kind of infections. The principal problems of conventional florfenicol administration are related with the high number of required doses and concentrated formulations preparation. Controlled drug release polymeric systems allowed exploring different geometries, sizes and administration pathways. Biocompatible polymers of different sources were used.

Different polymeric structures were designed: nanoparticles, microparticles, macroparticles or beads and *in situ* formed implants. Both synthetic polymers such as PLGA and Eudragit poly(methacrilates) and natural polymers like alginate and pectin were used. Different synthesis techniques were assessed such as emulsion-solvent evaporation, ionic gelation and phase-inversion. The different polymeric systems presented a variety of characteristics in terms of size, drug entrapment and drug release profiles.

The systems developed in the present work represent promising tools for new therapies design for florfenicol administration.



# INTRODUCCIÓN GENERAL







### **LIBERACIÓN CONTROLADA DE PRINCIPIOS ACTIVOS**

En las últimas décadas, se ha generado un gran interés por reemplazar las terapias convencionales basadas en la administración directa de principios activos (PA) por otras capaces de liberarlos de forma controlada, en cantidades efectivas y durante un período de tiempo determinado. Con un diseño determinado, un sistema de liberación controlada de droga (SLCD) puede liberar el PA de forma sistémica o en los sitios de acción de forma específica, con una tasa temporal adecuada.[1] Esta tecnología ha permitido mejorar las formas de administración y la eficiencia de antibióticos, vacunas, péptidos, entre otros. Las técnicas de administración más comunes, cómo los comprimidos y soluciones inyectables, presentan diversos problemas relacionados con la aplicación de formulaciones concentradas, la utilización de múltiples dosis, la invasividad, la dificultad para administrar grandes moléculas, entre otros. Además, son incapaces de ofrecer ventajas relacionados al tratamiento direccionado, a la activación controlada y a la amplia aplicabilidad para diferentes PA.[2,3] Asimismo, las investigaciones relacionadas con las tecnologías de liberación controlada no sólo se han enfocado en mejorar las rutas de administración más comunes, sino también en abrir/redescubrir nuevas vías como la nasal-pulmonar, transdermal, vaginal y ocular.[4] Los SLCD incluyen formulaciones basadas tanto en matrices degradables como no degradables. La principal diferencia entre ambas es que las primeras no requieren su remoción al final del tratamiento. En cambio, las matrices inertes pueden removerse, o no, al final de la liberación, la cual puede estar determinada por el agotamiento del PA o por la indicación e intervención de un profesional.[5]

El término “liberación de droga” refiere al proceso que involucra la migración del PA desde el seno de la matriz, hacia la superficie exterior de la misma y luego, hacia el medio de liberación. Este proceso de transporte es afectado por múltiples factores tales como: las características fisicoquímicas del PA y la matriz, las características estructurales y degradativas de la matriz, y las propiedades y condiciones del medio de liberación.[6]

En el caso de las propiedades fisicoquímicas del PA, un factor importante es su hidrofiliidad. Los fluidos biológicos en los que se busca lograr tasas de liberación controladas son de base acuosa. Los potenciales químicos que impulsan la migración desde las matrices están íntimamente relacionados con la solubilidad del PA en agua. Además, esta propiedad afecta la fuerza de interacción entre la droga y la matriz a medida que se produce el transporte, lo que determina en gran medida los tiempos de actuación de los sistemas desarrollados.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Respecto de las propiedades de la matriz, el PA se puede incorporar en diferentes tipos de matrices capaces de otorgar diferentes propiedades a los sistemas de liberación controlada.[2] Las matrices pueden variar de simples comprimidos de excipientes hasta intrincadas redes poliméricas. Con los avances en diseño e ingeniería de materiales, se introdujeron nuevas macromoléculas complejas en el desarrollo de SLCD. Tanto materiales derivados de la naturaleza (alginato, pectina, quitosano) como de origen sintético (ácido poli(láctico-co-glicólico), poli(caprolactona)), son ampliamente utilizados en este campo. El atractivo de los polímeros naturales radica principalmente en su amplia disponibilidad, su bajo costo, su potencial degradabilidad y biocompatibilidad. La principal desventaja es la dificultad de asegurar su pureza.[7,8] Por otro lado, la síntesis de polímeros brinda la posibilidad de diseñar moléculas con características preestablecidas para lograr funcionalidades específicas y determinar, entre otras propiedades, los tiempos de degradación y liberación del PA. La mayor desventaja de los polímeros sintéticos es el costo de producción.[2]

Una característica sumamente importante durante la selección de una matriz es su biodegradabilidad. En tal sentido, la capacidad de los polímeros para mantener su integridad a lo largo de un tiempo determinado en el fluido biológico es relevante en la definición de los procesos que gobiernen la liberación del PA. En el caso de matrices biodegradables, se pueden observar no solo fenómenos difusivos sino también de hinchamiento y/o erosión, generando propiedades únicas en los SLCD. Al igual que en el caso del PA, su interacción con el fluido biológico acuoso determina en gran medida la velocidad de liberación, impulsando o demorando los frentes de disolución y difusión a través del sistema.[1,6]

Los SLCD que se basan en la utilización de matrices poliméricas pueden formularse como nanoesferas, micropartículas, partículas de tamaño milimétrico para aplicación oral, parches e implantes, entre los más comunes. El tamaño y la superficie de la matriz en contacto con el medio de liberación afectan los tiempos de liberación.[9]. Por otra parte, los tamaños y geometrías de los sistemas influirán en su comportamiento en los diferentes compartimientos del organismo, permitiendo lograr el direccionamiento, activo o pasivo, de las drogas liberadas. Por ejemplo, las nanopartículas, a través del torrente sanguíneo, son capaces de acumularse en zonas con un alto grado de vascularización mientras que sistemas de tamaño milimétrico pueden circular a través del sistema digestivo sin atravesar la barrera intestinal.[10–12]

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Finalmente, el conocimiento en detalle del compartimiento biológico donde se requiere la liberación del PA es fundamental para el diseño de las tecnologías de liberación controlada. La cantidad de medio fluido, sus componentes solubles y/o en suspensión, y la vascularización son determinantes en la solubilidad y retención del PA y por ende, en el potencial fisicoquímico que determina la difusión desde las matrices poliméricas.[13,14]

### **BIODEGRADACIÓN**

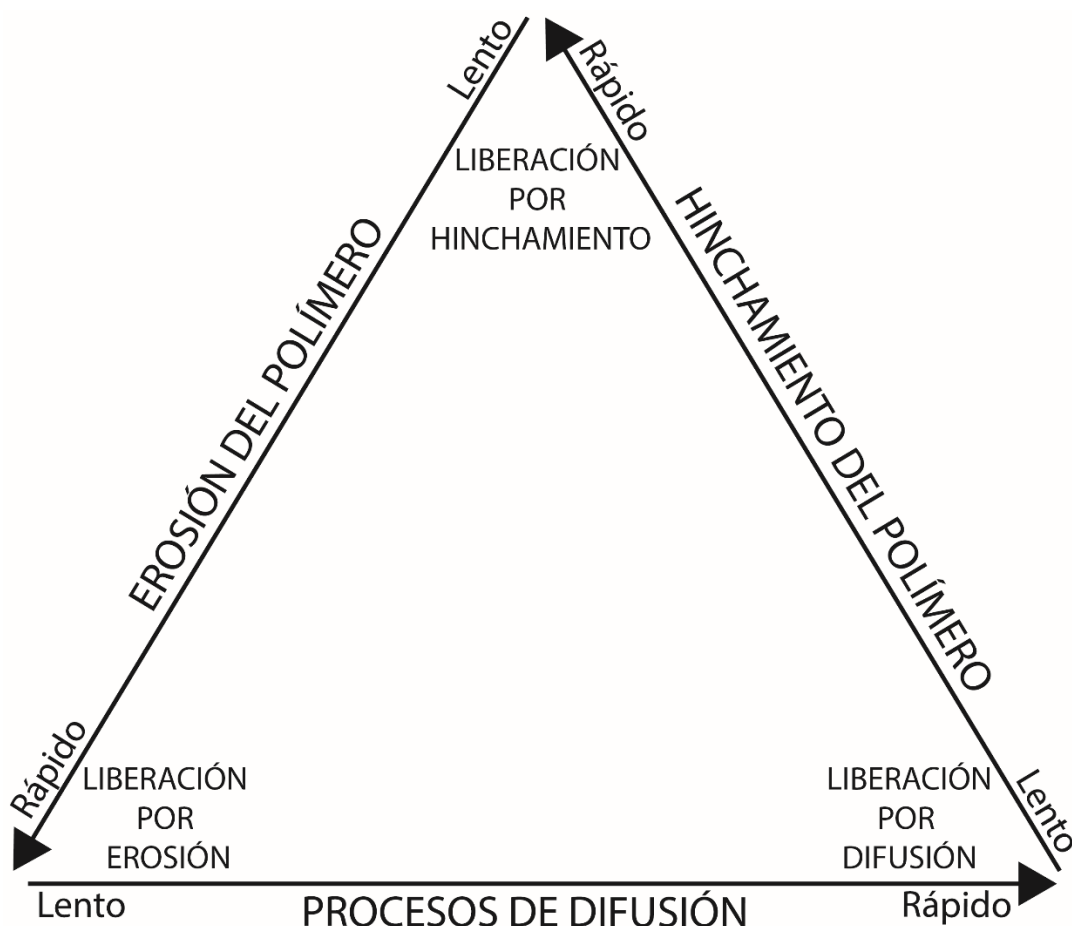
La biodegradación, en sistemas de uso médico o veterinario, implica la degradación de las cadenas poliméricas, a compuestos inocuos, capaces de ser metabolizados y excretados por el organismo. La capacidad de auto-remoción, posterior a la administración del SLCD, facilita la aceptación, el cumplimiento de las terapias y la optimización de las intervenciones profesionales.[2]

La biodegradación se basa en la ruptura de los enlaces moleculares de las cadenas poliméricas, por mecanismos presentes en diferentes medios biológicos. En general, los polímeros biodegradables poseen enlaces de tipo amida y ésteres, y su remoción puede resultar de una combinación de fenómenos químicos (ej. hidrólisis) y enzimáticos.[15,16] La biodegradabilidad del polímero utilizado define en muchos casos la erosión de la matriz polimérica, influyendo directamente en la velocidad de liberación del PA. Dos modelos son los más comunes para clasificar los sistemas según el tipo de degradación matricial: degradación superficial, que implica la degradación heterogénea de la matriz desde la superficie hacia el interior del sistema, y degradación homogénea, que abarca a aquellos sistemas cuya degradación se da progresiva y uniformemente en todo el material.[17] Para polímeros hidrolizables, el modelo de degradación que siga la matriz dependerá del balance entre la velocidad de ingreso de agua al dispositivo y de la velocidad de degradación del polímero. Además, la velocidad a la que el polímero se degrada está influenciada por su peso molecular, polidispersidad, composición química, y grado de cristalinidad. En este sentido, es de suma importancia la interacción con el medio acuoso debido a su estrecha influencia con los procesos degradativos hidrolíticos y enzimáticos. Como ejemplo, está ampliamente difundida la utilización de poliésteres sintéticos semicristalinos (ej. PLGA), donde la degradación comienza con la introducción de agua en las zonas amorfas, su posterior degradación hidrolítica y finalmente la degradación completa de las cadenas.[6] Por otro lado, pueden utilizarse polímeros de origen natural (ej. alginato, pectina), cuya alta solubilidad acuosa permite la erosión

## INTRODUCCIÓN GENERAL

matricial y la posterior degradación polimérica por vías enzimáticas endógenas, capaces de generar productos metabolizables.[18–20]

Las formas en las que el PA es liberado desde lo SLCD están estrechamente relacionadas con las cinéticas de degradación del polímero. Los mecanismos de liberación incluyen fenómenos difusivos, de hinchamiento y/o de erosión.[2] En los procesos difusivos, la droga migra a través de la matriz polimérica y de forma regulada por la diferencia de potenciales químicos asociados a los gradientes de concentraciones de PA. Durante el hinchamiento, el ingreso del medio de liberación a la matriz polimérica es afectado tanto por la porosidad como por la hidrofiliicidad/hidrofobicidad del polímero. Por otro lado, la erosión polimérica disminuye el tamaño de la matriz y aumenta la porosidad, aumentando la posibilidad de difusión de la droga. Así, la liberación del PA desde un polímero biodegradable resulta de los efectos combinados de los fenómenos descriptos, como se esquematiza en la Figura 1.



**Figura 1** - Procesos intervinientes en un sistema polimérico para la liberación controlada de drogas.

(Figura adaptada de Winzenburg *et al.* (2004) [2])

### **MODELADO MATEMÁTICO PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE DROGAS**

Los modelos matemáticos aplicados en el campo de la liberación controlada de fármacos resultan una herramienta de gran interés debido a su capacidad predictiva y a su posible aplicación en la optimización y el control de los procesos involucrados. Además, constituyen herramientas útiles para el entendimiento de los fenómenos fisicoquímicos asociados.[21]

El estudio sobre los perfiles de disolución de un fármaco desde un sistema de liberación controlada es el paso principal para arribar a resultados satisfactorios. Las propiedades farmacocinéticas de una droga están muy ligadas a su absorción y biodisponibilidad. En este sentido, la velocidad de liberación del fármaco es un factor de gran importancia en su distribución en el organismo y los niveles sistémicos o sitio-específicos alcanzados, aspectos que deben ser controlados para lograr formulaciones seguras y efectivas. Los modelos matemáticos pueden ser capaces de estimar los perfiles de liberación y de disolución de las drogas sin la necesidad de llevar a cabo un gran número de experimentos, optimizando el tiempo y los costos de desarrollo [21,22]

Los modelos matemáticos utilizados pueden clasificarse en empíricos, semi-empíricos o teóricos. Los primeros aplican ecuaciones que permiten describir matemáticamente los resultados de las cinéticas de liberación, pero los parámetros matemáticos no tienen un significado fisicoquímico real y no aportan información detallada sobre los factores intervinientes en el proceso de liberación. Los ejemplos más comunes de este tipo de modelos son los de orden cero, primer orden, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Weibull, entre otros. Este tipo de modelos resulta útil para describir las diferentes fases de una cinética de liberación para, por ejemplo, el desarrollo de un producto comercial.[23] Por otro lado, los modelos teóricos se basan, principalmente, en balances de materias que incluyen la primera ley de Fick y permiten describir con mayor detalle los fenómenos fisicoquímicos involucrados en la liberación del PA a través de la matriz. Los modelos de tipo teórico tienen en cuenta factores como las propiedades fisicoquímicas de la droga y el polímero, el tamaño y la porosidad de la matriz polimérica, el fenómeno de hinchamiento, las propiedades del medio de liberación, entre otros.[24]

En resumen, el objetivo principal de modelar un proceso de liberación de un PA es correlacionar matemáticamente la velocidad de liberación con las características particulares del sistema tales como: propiedades fisicoquímicas del fármaco y la matriz

## INTRODUCCIÓN GENERAL

polimérica, procesos de disolución y difusión, características dimensionales y geométricas de la matriz de liberación y fenómenos de degradación.

Por otra parte, en muchos casos, los modelos matemáticos pueden ser utilizados para diferentes fármacos y matrices considerando parámetros apropiados. Esta ventaja resulta de gran interés, tanto en las industrias farmacéuticas y veterinarias como en el ámbito científico, donde se llevan a cabo múltiples desarrollos en paralelo.[25,26]

En la bibliografía existen numerosos trabajos que tratan sobre el modelado de la liberación controlada de principios activos como hormonas[27,28], proteínas[29], medicamentos anticancerígenos[30], antibióticos[31], entre otros. La predicción del comportamiento de las formulaciones desarrolladas en el presente trabajo de investigación permitirá optimizar los SLCD, comprender los mecanismos de liberación involucrados y modificar las características de los sistemas para lograr los resultados deseados.

### **LIBERACIÓN CONTROLADA DE ANTIBIÓTICOS**

La era de los antibióticos (ATB) comenzó en el año 1928 con el descubrimiento de la penicilina fúngica por Sir Alexander Fleming en el Reino Unido. De forma “accidental”, se descubrió que un hongo producía una sustancia capaz de matar cierta clase de bacterias que se encontraban en estudio. A partir de este descubrimiento, se desarrollaron nuevos principios activos capaces de combatir las principales afecciones a las cuales el mundo se encontraba sometido en los campos de la salud humana y animal.[32]

Durante los pasados 50 años, “la edad dorada” del desarrollo de antibióticos, se lograron descubrimientos de múltiples clases de antibióticos tales como sulfonamidas, penicilinas y estreptomicinas. De esta manera, se sentaron las bases moleculares y químicas para la expansión y mejora de las aplicaciones de los diferentes grupos de ATB. En las pasadas dos décadas, se desarrollaron de forma exitosa más de cincuenta clases de ATB por parte de reconocidas empresas, satisfaciendo las nuevas necesidades para atacar las diferentes patologías registradas en seres humanos y animales. Es así que, desde el año 1930, el impacto de las infecciones bacterianas ha caído de manera pronunciada.[32]

Sin embargo, luego de esta época de alto desarrollo de nuevos principios activos, la industria farmacéutica optó por la investigación sobre derivados de los antibióticos ya existentes. La disminución en la prevalencia de infecciones bacterianas y el creciente interés en las enfermedades crónicas fueron las principales causas del declive del desarrollo de nuevas moléculas antibacterianas. Utilizando herramientas provenientes de

## INTRODUCCIÓN GENERAL

la química de síntesis, se realizaron modificaciones sobre las estructuras ya existentes, otorgándole a las nuevas moléculas novedosas capacidades con mejoras relacionadas tanto en su funcionamiento como en la aplicabilidad.[33]

La resistencia bacteriana a los ATB representa uno de los mayores problemas tanto para la salud pública como para el sector productivo ganadero.[32] Las mutaciones azarosas junto con la alta tasa de reproducción de los microorganismos llevan a una rápida evolución en las capacidades para mitigar los efectos de los antibióticos. La mayoría de los antibióticos tiene una “obsolescencia inherente” debido al desarrollo de resistencia por modificaciones en la molécula diana, la pérdida de la capacidad del principio activo para penetrar las membranas bacterianas (*biofilms*) y la aparición de enzimas con capacidad de degradación. La selección de patógenos resistentes es una consecuencia normal en el curso de las terapias antibióticas.[34,35]

Los ATB son compuestos activos capaces de destruir o inhibir diferentes tipos de bacterias afectando elementos metabólicos y/o estructurales necesarios para su supervivencia. Los efectos pueden ser del tipo bactericida, cuando los ATB son capaces de matar los microorganismos, o bacteriostático, cuando los mismos son capaces de inhibir el crecimiento de la población bacteriana. Una de las principales clasificaciones se refiere a la capacidad de los ATB para atacar bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, denominados de amplio espectro, o sólo uno de estos tipos bacterianos, denominados de espectro reducido. Por otro lado, una clasificación más extensa se refiere a los efectos del ATB sobre las moléculas diana del microorganismo[13], según sean:

1. Inhibidores de la síntesis de pared celular: en este grupo se encuentran principalmente los  $\beta$ -lactámicos. Son ATB capaces de afectar la síntesis de la pared celular, únicamente a células del tipo procariota. Además, necesitan de una división celular activa para poder cumplir con su objetivo.
2. Inhibidores de la membrana celular: los principales representantes de este tipo de ATB son las polimixinas. Atacan la integridad de la membrana plasmática celular, afectando el contenido celular. Debido a su mecanismo de acción, tienen baja selectividad con respecto a células procariotas y eucariotas.
3. Inhibidores de la síntesis proteica: aquí se encuentran agrupados los aminoglucósidos, las tetraciclinas, el cloranfenicol y sus derivados, y los macrólidos. En general, atacan a las estructuras ribosómicas, inhibiendo la síntesis proteica y, por ende, la producción de los elementos esenciales para la supervivencia celular.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

4. Efectores de ácidos nucleicos: son las quinolonas. Estas moléculas tienen la capacidad de interactuar con las enzimas relacionadas con la producción de ADN/ARN, bloqueando el desarrollo y reproducción natural de los microorganismos.
5. Inhibidores de folato: en este grupo podemos encontrar las sulfonamidas. Estos ATB son capaces de afectar la síntesis de folato, metabolito esencial para el correcto desarrollo bacteriano.

Otra característica importante que presentan los ATB es su relación con la concentración plasmática y el tiempo de acción. Los ATB bactericidas, dependientes de la concentración, presentan una eficacia aumentada cuando se incrementa la dosis y, como consecuencia, la concentración plasmática. Para este tipo de ATB, se suelen utilizar altas dosis con baja frecuencia de administración. Ejemplos de ATB concentración-dependientes son los aminoglucósidos y las quinolonas. En contraste, existen los ATB tiempo-dependientes como los  $\beta$ -lactámicos. Estos principios activos no ejercen un mayor efecto bactericida cuando se aumenta la cantidad dosificada por encima de la concentración de inhibición mínima (CIM). Por ende, el parámetro farmacocinético más importante en este caso es el tiempo durante el cual se mantienen concentraciones superiores a la CIM. Este tipo de terapias consiste en dosis menores, pero con mayor frecuencia de administración. En el caso de los ATB bacteriostáticos, la efectividad es dependiente del tiempo en concentraciones superiores a la definida como efectiva.[13]

Los PA antimicrobianos utilizados en animales son esencialmente de la misma clase que los utilizados en humanos, exceptuando ciertos grupos de antibióticos que se reservan únicamente para tratamientos en personas. Los antibióticos y antiparasitarios representan, aproximadamente, el 50% de los PA terapéuticos ofrecidos en el mercado de productos veterinarios.[36] Las industrias desarrolladoras de productos para la sanidad animal y humana comparten características muy importantes: son guiadas por la investigación científica, están globalizadas, deben cumplir importantes reglamentaciones y se encuentran obligadas a producir beneficios económicos en un entorno de alta competitividad. Sin embargo, también presentan notables diferencias, dentro de las cuales la industria veterinaria presta una particular atención a los costos, los fenómenos climatológicos, la gran variedad de especies y de características fisiológicas/anatómicas, la aceptación por parte de los clientes, la seguridad del usuario y del animal, y las particularidades de las prácticas agronómicas.[36] En Argentina no existen datos sistematizados, pero a nivel mundial se estima que el 40% de todos los antibióticos



## INTRODUCCIÓN GENERAL

producidos se destinan mayoritariamente a terapias en la cría de porcinos, bovinos y aves. Además, otro significativo porcentaje se utiliza con fines no-terapéuticos.[37] Las principales aplicaciones de agentes antimicrobianos en animales son terapéuticas, metafilácticas, profilácticas y de promoción del crecimiento. La aplicación terapéutica abarca el tratamiento de animales individuales infectados, siendo utilizada en animales domésticos, vacas lecheras, terneros y caballos. Las vías de aplicación más utilizadas en este caso son la oral y por inyecciones. Las técnicas metafilácticas consisten en tratar un grupo de animales sin diferenciar entre infectados y no infectados. Este procedimiento permite evitar la propagación de una enfermedad bacteriana en grandes grupos de animales. La aplicación de los antibióticos utilizando el agua de bebida y/o el alimento es la forma más común de administración en el caso de llevar a cabo una metafilaxis. Por otro lado, la profilaxis consiste en tratar animales no infectados y busca prevenir la aparición de enfermedades infecciosas durante cierta época del año, en la cual se espera la infección por parte de un patógeno en particular. Esta metodología permite evitar el incremento de los costos de producción asociado a tratamientos de enfermedades bacterianas establecidas. Finalmente, la utilización de agentes antimicrobianos como factores de promoción del crecimiento permite incrementar la velocidad del aumento del peso de los animales, incrementando la productividad de la cría. Estas dos últimas técnicas son altamente criticadas debido a que se asocian con la gran prevalencia de resistencia bacteriana presente en los animales tanto domésticos como de producción.[38] Por otra parte, el control de la cantidad de antibióticos utilizada resulta un parámetro de gran importancia en el diseño de terapias debido a la posibilidad de generar residuos en los productos de consumo. La sobredosificación de antibióticos impide que los PA sean eliminados correctamente del organismo animal, promoviendo que pasen a través de la cadena de producción al consumidor final y generando, como consecuencias, toxicidades directas y cambios perjudiciales en la flora intestinal humana.[39]

La Tabla 1 muestra los principales antibióticos presentes en el mercado veterinario y su forma de dosificación más común.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

**Tabla 1** - Principales antibióticos de uso veterinario y sus formas más comunes de dosificación.

(Tabla adaptada de Sun *et al* (2002) [13])

Nombre	Clase	Forma de dosificación
Penincilinas	$\beta$ -lactámico	Parenteral, tabletas, dosificación oral
Carbenicilina	$\beta$ -lactámico	Parenteral, tabletas
Aminopenincilinas	$\beta$ -lactámico	Parenteral, tabletas, dosificación oral
Cloxacilina	$\beta$ -lactámico	Cápsulas, dosificación oral
Ceftiofur	Cefalosporina	Parenteral
Gentamicina	Aminoglucósido	Parenteral
Kanamicina	Aminoglucósido	Suspensión oral, tabletas
Neomicina	Aminoglucósido	Solución oral, tabletas, cápsulas, ungüentos, gotas oftálmicas
Amikacina	Aminoglucósido	Parenteral
Eritromicina	Macrólido	Parenteral, tabletas, cápsulas, suspensión oral
Tilmicosina	Macrólido	Parenteral
Marbofloxacina	Quinolona	Tabletas
Orbifloxacina	Quinolona	Tabletas
Danofloxacina	Quinolona	Parenteral
Doxi/tetra/oxitetraciclina	Tetraciclinas	Solución oral, tabletas, cápsulas, ungüentos, gotas oftálmicas
Florfenicol	Cloranfenicol	Parenteral, suspensión oral
Sulfadimetoxina	Sulfonamida	Parenteral, suspensión líquida, tabletas

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Teniendo en cuenta lo mencionado, se vuelve de gran importancia no solo el desarrollo de nuevos fármacos, sino también el desarrollo de nuevas terapias capaces de minimizar el número y cantidad de dosis administradas a los animales para disminuir las complejidades de las técnicas utilizadas, la generación de cepas de microorganismos resistentes y los residuos de PA en los productos de consumo.[38,39] La liberación controlada de drogas cumple un rol fundamental en el desarrollo de la sanidad animal. Estas tecnologías se posicionan en un lugar de relevancia para la veterinaria debido a su capacidad para [36]:

- Mejorar la aceptación y conveniencia de los consumidores.
- Mejorar las propiedades farmacocinéticas de los PA.
- Abarcar las exigencias de varias especies para un mismo PA.
- Extender el tiempo de vigencia de las patentes sobre moléculas (reposicionamiento en el mercado).
- Proveer diferenciación al producto.
- Optimizar la seguridad de los dueños/productores, consumidores y animales.

La posibilidad de incluir los principios activos en matrices con propiedades específicas en términos de liberación de los mismos e interacción celular, representa un gran interés para el diseño de nuevas terapias clínicas. El diseño de SLCD para ATB constituye una herramienta fundamental para lograr parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos eficaces y sostenidos en el tiempo, evitando el mal uso de los PA y las consecuentes problemáticas ya mencionadas. En este sentido, los principales candidatos a utilizarse en SLCD son aquellos ATB tiempo-dependientes (bactericidas y bacteriostáticos). No obstante, la posibilidad de desarrollar sistemas pulsátiles capaces de liberar grandes dosis de PA en distintas condiciones también es posible. Las tecnologías de liberación controlada de drogas permiten el reposicionamiento comercial de los principios activos a través de las mejoras en las características terapéuticas y tecnológicas. El desarrollo de nuevas moléculas antibióticas conlleva costos elevados y riesgos que las empresas farmacéuticas han comenzado a evitar. Se estima que un nuevo principio activo podría demorar de 10 a 20 años en volverse comercializable, con un costo aproximado de 2.6 billones de dólares.[40] En este sentido, la posibilidad de comercializar moléculas ya existentes pero basadas en nuevas tecnologías representa una oportunidad prometedora para las industrias farmacéuticas. Existen, en el mercado veterinario, diversos productos capaces de actuar como SLCD. Algunos de ellos generan concentraciones locales

## INTRODUCCIÓN GENERAL

sostenidas en el tiempo mientras otros buscan mantener niveles sistémicos terapéuticos de fármaco. La Tabla 2 muestra alguno de ellos.

**Tabla 2** - Formulaciones de larga acción para ATB de uso veterinario.  
(Tabla adaptada de Sun *et al* (2002) [13])

Nombre del producto	Forma de dosificación	Ingrediente activo	Excipientes funcionales
Liquamycin – LA 200	Solución concentrada	Oxitetraciclina	2-pirrolidona
Bio-Mycin 200	Solución concentrada	Oxitetraciclina	PEG400
ProCure 200	Solución concentrada	Oxitetraciclina	2-pirrolidona
NUFLOR	Solución concentrada	Florfenicol	n-metil-2-pirrolidona, propilenglicol, polietilen-glicol
Micotil	Solución concentrada	Tilmicosina	Propilen-glicol
PEN BP-48	Suspensión	Penicilina	Carboximetilcelulosa sódica
PERIOceutic / Doxirobe	Gel	Doxiciclina	NMP - PLGA
Septopal	Esferas	Gentamicina	Poli-metil-metacrilato

PEG400: poli(etilen glicol) 400; NMP:n-metil pirrolidona; PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico)

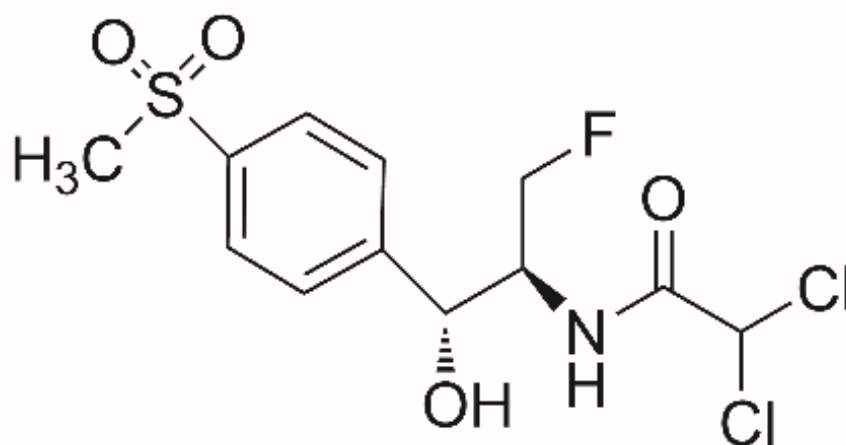
### FLORFENICOL

El florfenicol (FF) (Figura 2) es un derivado fluorinado del tiamfenicol (un átomo de flúor en reemplazo del grupo hidroxilo en el carbono tres) con el mismo mecanismo de acción que el cloranfenicol. El florfenicol no presenta riesgos de producir anemia aplásica como si ocurre con sus precursores.[41] Por otro lado, este PA es capaz de inhibir la acción de la enzima peptidil-transferasa, actuando sobre la síntesis de proteínas esenciales

## INTRODUCCIÓN GENERAL

para la supervivencia bacteriana. Es considerado un ATB bacteriostático de amplio espectro, afectando a bacilos Gram-positivos, cocos Gram-negativos y otro grupo más atípico como micoplasma.[42] Las modificaciones químicas le otorgaron una especial capacidad para evadir la resistencia mediada por la enzima acetil-transferasa. El agregado de un átomo de flúor, en lugar del hidroxilo del C3, previene la acetilación capaz de inhibir su actividad antimicrobiana.[43] Esta particularidad lo convierte en un candidato especial para tratar poblaciones de bacterias resistentes en los tratamientos veterinarios.[41]

Por otro lado, su estructura molecular lo hace altamente lipofílico. No obstante, su capacidad de ionizarse ( $pK_a=9-10$ ) le confiere una leve solubilidad en agua ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ). El FF puede ser clasificado como una droga del tipo III según el SCDDDB (Sistema de clasificación y disposición de drogas biofarmacéuticas), presentando una leve solubilidad en agua y una buena biodisponibilidad en los diferentes compartimientos del organismo.[44] Este antibiótico se usa ampliamente para combatir condiciones patológicas en peces, aves y ganado.[45] Sin embargo, la obtención de soluciones concentradas es dificultosa y requiere la adición de solventes orgánicos, que presentan una cuestionable biocompatibilidad. El FF presenta una buena penetración en tejidos y una rápida eliminación en animales.[41,46] La vida media del FF en ganado es de 2-3 h luego de su administración intravenosa. En caninos y felinos, la vida media va de 1.1-1.2 h y de 4-5 h, respectivamente.[42]



**Figura 2** – Estructura química del florfenicol.

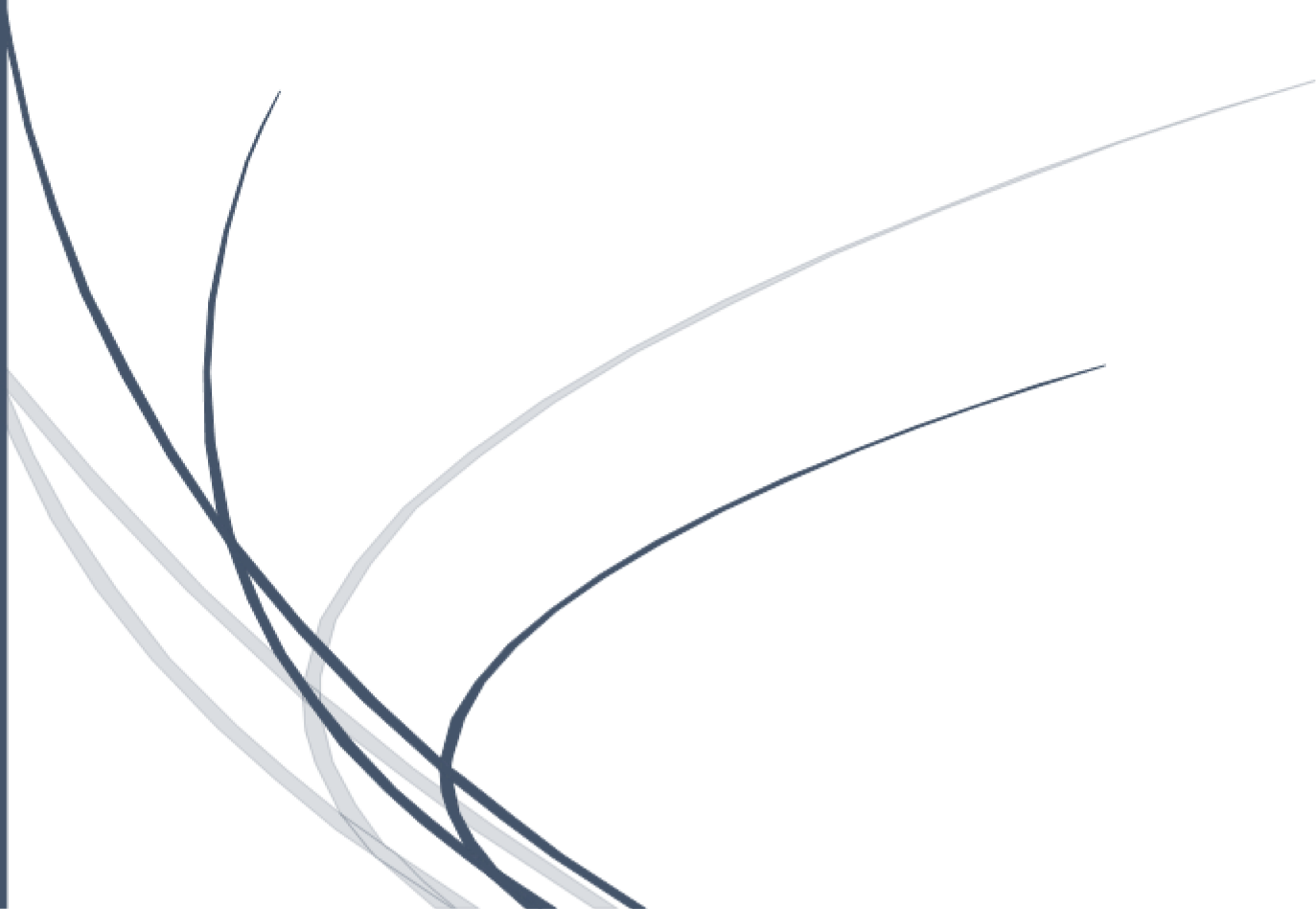
Ya que el cloranfenicol ha sido prohibido en animales para alimento en USA, el FF ha surgido como su reemplazo. Este PA ha demostrado su efectividad contra múltiples

## INTRODUCCIÓN GENERAL

patologías veterinarias tales como la enfermedad respiratoria bovina causada por *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Histophilus somni*; el flemón bovino interdigital asociado con *Fusobacterium necrophorum* y *Bacteroides melaninogenicus*; la queratoconjuntivitis infecciosa bovina debida a *Moraxella bovis* y la enfermedad respiratoria bovina causada por *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Salmonella choleraesuis* y *Streptococcus suis*. El FF se encuentra disponible en soluciones inyectables de 300 mg mL<sup>-1</sup> y para la administración en agua de bebida animal a 23 mg mL<sup>-1</sup>. También se encuentra disponible en formulaciones de alimentos en concentraciones de 500 g kg<sup>-1</sup>. Además, puede encontrarse combinado con flunixinina en vehículos como 2-pirrolidona, ácido málico y/o triacetina.[42,47–50]

Existen diversos estudios sobre la encapsulación o adsorción de FF, en los que se incluyen la utilización de nanopartículas de sílica,[51] nanoesferas impresas molecularmente y obtenidas por el método de emulsificación de membrana,[52] complejos de inclusión de ciclodextrina con micropartículas de PVP o quitosano[53] y nanopartículas sólidas lipídicas obtenidas por homogeneización en caliente y ultrasonificación.[54] Respecto a la encapsulación de FF en matrices de PLGA, Pinto *et al.* (2014) reportaron la preparación de nanopartículas de PLGA utilizando el método de emulsión y evaporación del solvente con eficiencias de encapsulación del 10% y sin estudios de liberación del principio activo. [55] También, Turino *et al.* (2018), estudiaron la incorporación de FF en nanopartículas de PLGA y PeC (Poli(ε-caprolactona)) utilizando el método de nanoprecipitación con eficiencias similares (menores al 18%).[56] Estos intentos por desarrollar sistemas de liberación controlada de FF lograron bajas eficiencias de encapsulación/atrapamiento del PA y las velocidades de liberación no pudieron ser controladas a través de un período de tiempo determinado. Debido a esto, las investigaciones sobre nuevos sistemas poliméricos para la administración de FF, de forma efectiva y eficaz, resultan de gran interés.

# OBJETIVOS







### **OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS**

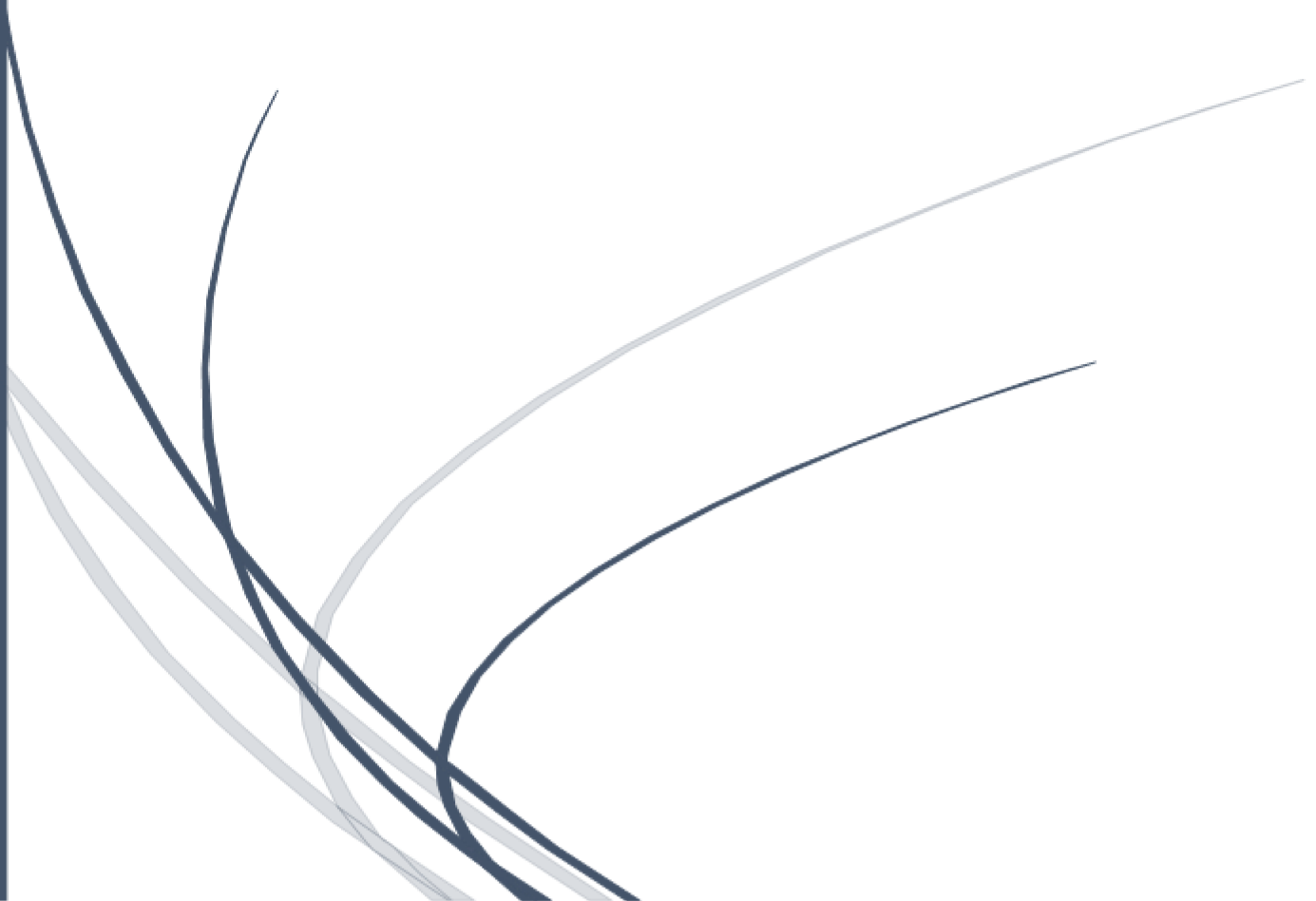
El objetivo general de esta tesis es diseñar y preparar matrices poliméricas, biocompatibles y biodegradables, en diferentes escalas y geometrías, para la liberación controlada de florfenicol.

### **Objetivos específicos**

- Sintetizar diferentes sistemas poliméricos para la vehiculización y liberación controlada de FF.
- Estudiar *in vitro* las interrelaciones entre las condiciones de síntesis, las propiedades moleculares y morfológicas, y las propiedades finales específicas: eficiencia de encapsulación y cinéticas de liberación de la droga.
- Evaluar la posibilidad de utilizar polímeros de origen sintético o natural y posibles combinaciones de los mismos para nuevas aplicaciones tecnológicas en base a sus propiedades fisicoquímicas.
- Estudiar teórica y experimentalmente la liberación *in vitro* de florfenicol contenido en la matriz polimérica.
- Caracterizar, mediante ensayos *in vitro*, el efecto antimicrobiano de las formulaciones estudiadas frente a agentes biológicos y en medios de cultivo artificiales.



**CAPÍTULO 1. DISEÑO DE NANO-  
Y MICROPARTÍCULAS DE  
PLGA PARA LA LIBERACIÓN  
CONTROLADA DE  
FLORFENICOL**





### INTRODUCCIÓN

La liberación controlada de principios activos es una herramienta ampliamente investigada para el desarrollo de nuevas terapias para humanos y animales. Por ejemplo, ciertas condiciones patológicas y tratamientos post-quirúrgicos requieren administración prolongada y/o repetida de antibióticos y otros fármacos.[13] Las tecnologías de liberación controlada permiten alcanzar niveles plasmáticos regulados y sostenidos de los principios activos, reduciendo la exposición del paciente a altas dosis, los efectos secundarios y el stress asociado al tratamiento.[2] En este sentido, las nano- y micropartículas poliméricas representan una opción prometedora para la administración de agentes farmacéuticos.[57] El tamaño y la forma de las partículas están asociados a características específicas del sistema como la cinética de liberación, la captación celular, el direccionamiento pasivo y el comportamiento farmacológico de la droga.

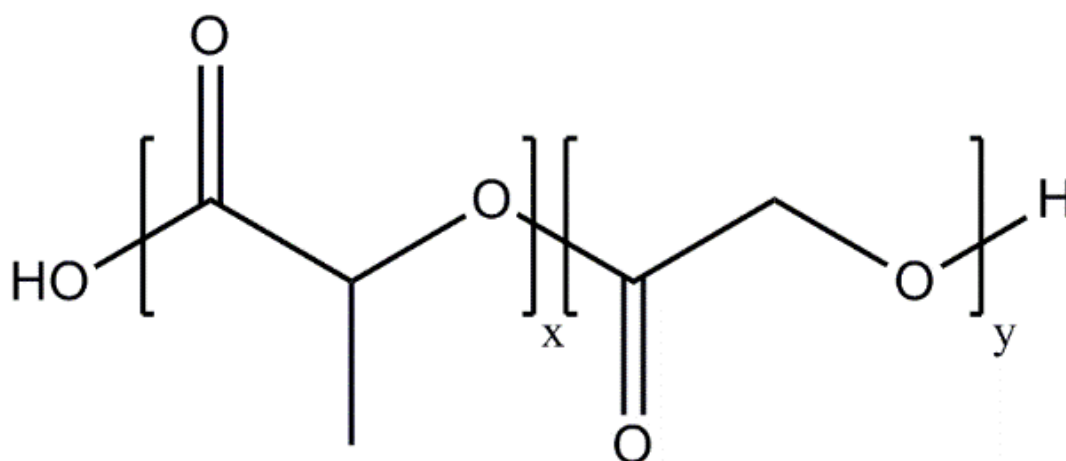
Dentro de los SLCD (sistemas de liberación controlada de drogas) más comunes, las nano- y micropartículas poliméricas pueden ser preparadas por diferentes metodologías. Los sistemas particulados pueden clasificarse en: sistemas preformados o de obtención *in situ*. Los sistemas de obtención *in situ* se sintetizan en el sitio de aplicación. El principio de su formación se basa en la inmiscibilidad de algunos polímeros en agua o medios fisiológicos. Una solución orgánica de estos polímeros, en contacto con un medio acuoso, precipitará por intercambio de solventes. La forma del producto precipitado dependerá principalmente de las características de la formulación precursora.[58,59]

Los sistemas preformados se sintetizan previamente y es una suspensión del producto (micro o nano) el que se administra directamente en el sitio de aplicación. Entre las técnicas más utilizadas, se puede encontrar el método de emulsión con posterior evaporación del solvente.[10,11,60] Es posible encontrar técnicas de emulsiones simples o complejas. En el caso de las emulsiones simples O/W (del inglés *oil/water*), el procedimiento, en una primera etapa, consiste en preparar una fase orgánica O (que contiene la droga y el polímero) y emulsificarla en una fase acuosa W (que contiene un surfactante estabilizante). En una segunda etapa, se lleva a cabo la precipitación del polímero hidrofóbico por nucleación sólido-líquida como consecuencia de la eliminación del solvente orgánico por evaporación. En el caso de emulsiones complejas, la síntesis de las partículas consiste, por ejemplo, en una primera etapa de disolución de un principio activo de marcada hidrofiliidad en una fase acuosa (fase W1), que luego es emulsionado en una fase orgánica que contiene el polímero (fase W1/O). En una etapa siguiente, se lleva a cabo una segunda emulsificación en una fase acuosa final (fase W1/O/W2). Para

## CAPITULO 1

estabilizar las diferentes emulsiones, pueden utilizarse diferentes tensioactivos en las fases acuosas. Por último, se elimina el solvente para causar la precipitación del polímero por nucleación sólido-líquida debido a su inmiscibilidad acuosa. También existen opciones de síntesis para el uso de polímeros hidrofílicos, donde las emulsiones serán del tipo W/O u O/O y las fases O podrán ser orgánicas u oleosas. [61–67]

Entre los polímeros utilizados para la síntesis de partículas, el PLGA (por sus siglas en inglés, *Poly(lactic-co-glycolic acid)*, Figura 1.1) es ampliamente investigado y utilizado debido a su excelente biocompatibilidad y biodegradabilidad.[68] La cinética de degradación del PLGA está estrechamente relacionada con la liberación del principio activo y se ve afectada por el peso molecular polimérico, los grupos químicos terminales de las cadenas poliméricas, la composición química y el grado de cristalinidad del polímero. La degradación ocurre a través de cortes hidrolíticos azarosos y las moléculas resultantes pueden ser eliminadas utilizando vías de degradación endógenas.[11] Debido a esto, las formulaciones basadas en PLGA no requieren la remoción del sitio de inyección o del organismo luego de terminado el tratamiento, ya que la metabolización completa conduce a la excreción en forma de CO<sub>2</sub> y agua.[13]



**Figura 1.1** – Estructura química del PLGA.

El tipo de principio activo, sus propiedades fisicoquímicas y la aplicación juegan un papel fundamental en la selección del tipo de polímero, hidrofílico o hidrofóbico. Además, la afinidad de la droga por el agua incidirá tanto en la metodología de síntesis de los sistemas como en las cinéticas de liberación del principio activo. Durante los diferentes

## CAPITULO 1

procedimientos de síntesis de SLCD poliméricos, la presencia de medios acuosos podrá inducir una disminución en las eficiencias de encapsulación de los principios activos debido a los posibles fenómenos difusivos que puedan presentarse. Por otro lado, la solubilidad acuosa será un factor fundamental en las cinéticas de liberación en los diferentes medios utilizados, tanto en los modelos *in vitro* como *in vivo*, debido a la posible tendencia del principio activo a difundir a través de la matriz polimérica.[3] Entre las diferentes drogas para ser encapsuladas, los antibióticos representan un grupo de interés particular debido a diferentes problemas relacionados con los niveles plasmáticos requeridos, el número de dosis y la preparación de formulaciones suficientemente concentradas. Para poder seleccionar el mejor candidato para el diseño de diferentes SLCD deben conocerse sus propiedades fisicoquímicas, las cuales permitirán predecir las posibles interacciones tanto con la matriz polimérica como con los diferentes medios de síntesis y liberación. El FF es un antibiótico derivado del tiamfenicol con el mismo mecanismo de acción que el cloranfenicol. Su estructura molecular lo hace altamente lipofílico, pero su capacidad de ionizarse ( $pK_a=9-10$ ) le confiere una leve solubilidad en agua ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ). Este antibiótico se usa ampliamente para tratamientos veterinarios.[45] Sin embargo, la obtención de soluciones concentradas es dificultosa y requiere el uso de solventes orgánicos con implicancias negativas relacionadas a la biocompatibilidad. El desarrollo de nuevos SLCD para la liberación de FF es de gran interés debido a las problemáticas relacionadas con la producción de formulaciones adecuadas y la reducida vida media. En la bibliografía pueden encontrarse diferentes intentos para lograr sistemas aceptables para la administración y liberación controlada de FF, sin embargo, las eficiencias de encapsulación y las velocidades de liberación logradas no resultaron óptimas.[51,52,56,69]

Por otro lado, el modelado matemático de los fenómenos de liberación es una herramienta indispensable tanto para entender los procesos fisicoquímicos intervinientes como así también para generar modelos de predicción que permitan diseñar sistemas a medida.

En el presente capítulo, se estudia de forma experimental y teórica el diseño de sistemas poliméricos basados en nano- y micropartículas para la liberación controlada de FF, estudiando la correlación entre las condiciones de síntesis y las propiedades finales de los sistemas. Además, se lleva a cabo una caracterización morfológica y fisicoquímica para comprender los fenómenos de liberación observados. Por otro lado, se presenta un modelo matemático para describir la liberación de progesterona desde micropartículas de PLGA con diferentes tamaños. El modelo considera tanto la disolución y difusión del principio

## CAPITULO 1

activo desde la partícula como así también la degradación auto-catalítica del polímero y permite predecir la cinética de liberación en función del tamaño de partícula, peso molecular del polímero y velocidad de degradación. Si bien existen intentos de modelizar empíricamente cinéticas de liberación de FF[31], no se han encontrado en la bibliografía modelos teóricos específicos para la liberación de este PA desde nano- y micropartículas de PLGA ni los parámetros asociados.

El trabajo realizado en este capítulo fue publicado en el *Journal of Applied Polymer Science* (Karp *et al*, *J. Appl. Polym. Sci.* 136, 2019, doi: 10.1002/app.47248).



**OBJETIVOS**

- Sintetizar nano- y micropartículas de PLGA con el antibiótico florfenicol encapsulado.
- Estudiar la relación entre las condiciones iniciales de síntesis y las propiedades específicas de los sistemas: eficiencia de encapsulación, perfiles de liberación *in vitro* y características fisicoquímicas y morfológicas.
- Desarrollar modelos matemáticos para la liberación del antibiótico y la degradación de las partículas.
- Comprobar la efectividad antimicrobiana *in vitro* de las formulaciones generadas.



### **MATERIALES Y METODOS**

#### 1. Materiales

PLGA (50:50), Peso molecular (PM): 6622 Da (Shanghai Easier Industrial Development Co., Ltd.). Florfenicol (2,2-dicloro-N-[(1R,2S)-3-fluoro-1-hidroxi-1-(4-etilsulfonilfenil) propan-2-yl] acetamida, 99.1%), adquirido en Romikin S.A (Buenos Aires, Argentina). El ANEXO 1.1 muestra los resultados de la caracterización de la materia prima de FF. Acetato de etilo (grado pro-análisis, Ciccarelli), cloroformo (grado pro-análisis, Ciccarelli), cloruro de metileno (grado pro-análisis, Ciccarelli), metanol (grado HPLC, Sintorgan) y PVA (alcohol poli(vinílico), 209 KDa, Kuraray Europe GmbH) fueron utilizados tal como se recibieron. Se utilizó agua ultrapura para todas las emulsiones, soluciones y diluciones.

#### 2. Síntesis de nanopartículas de PLGA: método emulsión-evaporación del solvente.

Las nanopartículas fueron sintetizadas por el método de emulsión O/W y evaporación del solvente. Primero, se disolvieron 0.05 g de PLGA en 1 mL de solvente orgánico (fase O) y esta solución fue emulsificada en 6 mL de una solución de PVA 2% p v<sup>-1</sup> (fase W) utilizando un ultrasonificador (CPX130PB, Cole-Palmer) con 130 W de potencia, en baño de hielo. Luego, se agregaron 5 mL de buffer fosfato 0.1M pH 7.4 (*quenching* de 1:1). El solvente orgánico remanente fue evaporado de la emulsión utilizando un rotavapor (EL130, Büchi) durante 60 min y a temperatura ambiente.

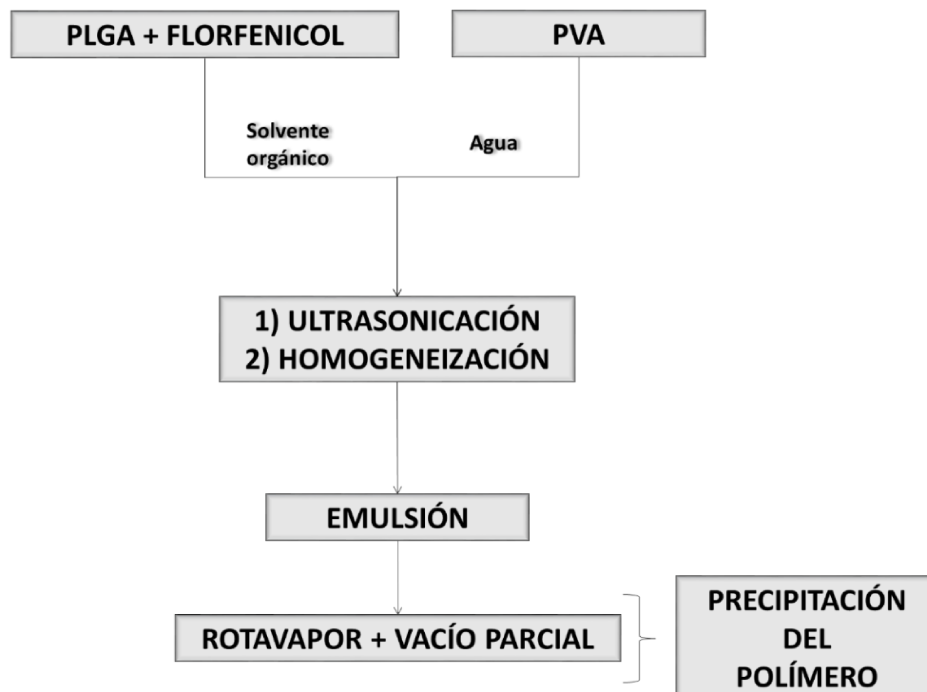
Con el objetivo de obtener partículas nanométricas con una distribución de tamaño estrecha y suspensiones estables, se analizaron dos variables durante la síntesis de nanopartículas sin droga: (i) tipo de solvente orgánico (acetato de etilo, cloroformo o cloruro de metileno) y (ii) tiempo de ultrasonificación (1, 2, 3 o 5 min). Los ensayos fueron realizados por triplicado para cada solvente.

Una vez optimizados el tiempo de sonicación y seleccionado el tipo de solvente, se estudió la encapsulación de FF disolviendo el mismo en la fase O utilizando diferentes relaciones droga-polímero: 6.12, 11.25 o 26.83% p p<sup>-1</sup>. El procedimiento de síntesis fue el mismo que el mencionado anteriormente. La conservación de las nanopartículas se llevó a cabo guardando las suspensiones a -20°C (Whirlpool, Argentina) hasta su utilización en ensayos posteriores.

3. Síntesis de micropartículas de PLGA: método emulsión-evaporación del solvente

Las micropartículas fueron preparadas utilizando el método de emulsión O/W y evaporación de solvente, el cual se basó en el procedimiento descrito por Boimvaser *et al.* (2016).[70] La fase O fue preparada disolviendo 0.15 g de PLGA y 0.017 g de FF en 3 mL de acetato de etilo. Esta solución fue goteada en 17 mL de una solución acuosa de PVA 2% p v<sup>-1</sup> bajo agitación a 4000 rpm (Homogeneizador digital Ultra-turrax T25 Ika, con accesorio de dispersión Ika S25N-18G, Cole Parmer). Luego de 5 min, se agregaron 70 mL de PVA 0.3% p v<sup>-1</sup> y se continuó con homogeneización a 4000 rpm durante 30 min. El solvente orgánico remanente fue evaporado de la emulsión en un rotavapor (EL130, Büchi) durante 120 min a temperatura ambiente. Las micropartículas se centrifugaron a 3500 rpm durante 8 min. Los sobrenadantes obtenidos se conservaron a -20°C para la posterior determinación de FF no encapsulado. Las micropartículas fueron liofilizadas con un equipo Telstar Cryodos-80 y conservadas a 5°C hasta su posterior análisis.

La Figura 1.2 muestra un esquema de los procedimientos de síntesis de los sistemas estudiados en el presente capítulo.



**Figura 1.2** – Esquema del procedimiento de síntesis de 1) nano- y 2) micropartículas de PLGA para la liberación controlada de FF utilizando el método de emulsión y evaporación del solvente.

#### 4. Encapsulación y eficiencia de encapsulación

Con el fin de evaluar la encapsulación (*Enc*) y la eficiencia de encapsulación (*EE*) del FF, se utilizaron dos metodologías: i) las suspensiones de nanopartículas obtenidas se centrifugaron durante 1.5 h a 50000 G y 20°C; y ii) las suspensiones de micropartículas se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min. Se cuantificó la masa de FF no encapsulado (*mFFne*) en los sobrenadantes utilizando la metodología de HPLC puesta a punto para FF y detallada en el ANEXO 1.1. La *Enc* y la *EE* se calcularon, de forma indirecta, según las siguientes ecuaciones:

$$Enc (\% FF/PLGA) = \frac{mFFi (g) - mFFne (g)}{mPLGA (g)} \times 100$$

$$EE (\%) = \frac{mFFi (g) - mFFne (g)}{mFFi (g)} \times 100$$

donde *mFFi* y *mPLGA* son las masas pesadas de florfenicol y PLGA al inicio de la síntesis, respectivamente.

#### 5. Perfiles de liberación de florfenicol desde nano- y micropartículas de PLGA

El ensayo de liberación de florfenicol consistió en poner en contacto las partículas con el medio adecuado (buffer fosfato 0.1M pH 7.4). En cada tiempo muestral, luego de separar las partículas del medio, se cuantificó la masa de droga liberada por HPLC. Los ensayos fueron llevados a cabo por duplicado.

##### a. Nanopartículas

En diez viales perfectamente sellados, se puso en contacto un volumen de suspensión de nanopartículas con 1.5 mL de medio de liberación y a una concentración final de droga que aseguraba el cumplimiento de las *sink conditions* durante el ensayo. Cada vial representó un punto muestral. Los recipientes fueron incubados a 37°C con agitación orbital. Transcurridas 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 4 h, un vial fue retirado de incubación y centrifugado a 50000 G durante 1.5 h. A partir del sobrenadante se cuantificó la masa acumulada de droga liberada en el tiempo.

##### b. Micropartículas

Una masa liofilizada y conocida de micropartículas se puso en contacto con 20 mL de medio de liberación en recipientes perfectamente sellados. Las suspensiones preparadas

fueron incubadas a 37°C con agitación orbital. A 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 11, 24, 48, y 72 h de iniciado el ensayo, se tomó 1 mL de medio de liberación utilizando una jeringa y un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ . Luego, se agregó 1 mL de medio de liberación fresco con el objeto de mantener las *sink conditions* y devolver las micropartículas retenidas en el filtro. El filtrado se analizó por HPLC para calcular la masa acumulada de droga liberada en el tiempo.

### 6. Modelado de perfiles de liberación de florfenicol y de la degradación de las matrices de PLGA

Se implementó un modelo matemático para predecir la liberación de FF desde partículas de PLGA desarrollado como extensión del modelo reportado en Bussato *et al.* (2017).[27] Se tuvo en cuenta la difusión del principio activo y el efecto de la degradación del polímero sobre la velocidad de liberación desde diferentes tamaños de partículas. El modelo consiste en dos módulos: módulo de degradación y módulo de liberación. El módulo de degradación está basado en un trabajo previo de degradación hidrolítica heterogénea de micropartículas de PLGA y permite estimar la evolución de la masa molecular promedio de la matriz, la pérdida de masa y los cambios morfológicos en las partículas de PLGA durante la degradación.[61] Por otro lado, el módulo de liberación describe el transporte de la droga de forma acoplada al módulo de degradación.[27] La liberación del PA ocurre mediante dos mecanismos principales: difusión en la matriz polimérica y transporte a través de la estructura porosa. A baja porosidad, la difusión es el mecanismo que domina la liberación del PA. A medida que avanza el proceso de degradación de la partícula, el transporte a través de los poros se hace más importante. Para tener en cuenta estos fenómenos, el módulo de liberación considera la transición entre los mecanismos de transporte a través de un tiempo crítico ( $t^*$ ) al cual el fenómeno de degradación polimérica comienza a dominar sobre el efecto de la difusión del PA en el control del proceso de liberación. La estimación del parámetro  $t^*$  está relacionada al peso molecular del polímero y esta validada en un trabajo previo sobre matrices de PLGA.[61]

El sistema de ecuaciones para resolver los módulos del modelo matemático se presentan en el ANEXO 1.2

### 7. Estudio de interacciones fisicoquímicas

Para evaluar posibles interacciones fisicoquímicas entre los componentes de las formulaciones, se llevaron a cabo los siguientes estudios de FTIR (espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier) y DSC (calorimetría diferencial de barrido).

Para el análisis por FTIR, las muestras (3-4 mg) fueron mezcladas y comprimidas con bromuro de potasio para obtener discos homogéneos. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-8001 PC (Shimadzu) y se estudiaron las señales en un rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

En los estudios por DSC, las muestras (4-5 mg) fueron colocadas en cápsulas herméticas de aluminio y calentadas hasta los 200°C a una velocidad de 10°C  $\text{min}^{-1}$ . Los ensayos se realizaron bajo atmósfera de nitrógeno (50  $\text{mL min}^{-1}$ ) en un equipo DSC Q2000 (TA Instruments).

### 8. Caracterización morfológica de las partículas

#### a. Nanopartículas

El tamaño medio de las nanopartículas se midió por DLS (dispersión dinámica de luz) con un equipo BI-200SM (Brookhaven). Las medidas fueron realizadas utilizando un ángulo de detección de 90°, un fotomultiplicador y una temperatura de 30°C. Con el objetivo de minimizar la influencia de ruido en la relación señal-ruido, las muestras se diluyeron apropiadamente con cloruro de sodio 10 mM. Para el análisis de tamaño y dispersión, se estudiaron las distribuciones de tamaño en número y volumen basadas en la función de autocorrelación de campo utilizando el método reportado por Clementi *et al.*(2010).[71]

Para evaluar su morfología se procedió a fijar un volumen de suspensión de nanopartículas en una grilla preparada con membrana de nitrocelulosa y se observó mediante TEM (microscopía de transmisión electrónica) en un equipo Phillips EM 201.

#### b. Micropartículas

Para evaluar el tamaño medio, las partículas fueron fotografiadas con un microscopio DM2500M (Leica) y su cámara acoplada DFC290HD (Leica). Las imágenes fueron procesadas con el programa ImageJ 1.40g (*National Institutes of Health*).

Las características morfológicas se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo PhenomWorld PRO X. Se utilizó una cinta de grafito para la fijación de la muestra y para la observación se aplicó un voltaje de 15kV.

### 9. Evaluación microbiológica de la formulación nanoparticulada

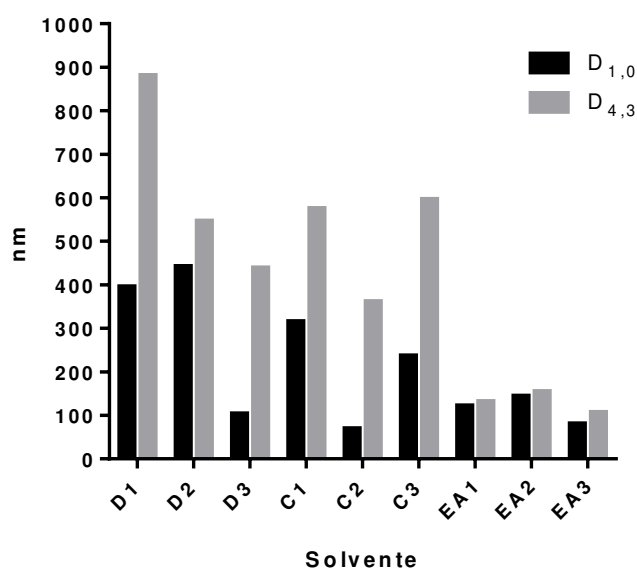
## CAPITULO 1

Debido a su tamaño, las nanopartículas pueden ser capaces de interactuar de forma distintiva con los microorganismos, mejorando la eficacia de los principios activos encapsulados.[11] Para evaluar este posible fenómeno, se investigó el efecto antimicrobiano de 50  $\mu$ L de nanopartículas sin FF, nanopartículas con FF y una solución de FF libre (equivalentes en cantidad de principio activo) utilizando un método de difusión en agar modificado, frente a las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.[72] Con este fin, se utilizaron recipientes cilíndricos (8x6x10 mm) en reemplazo de discos y fueron colocados cuidadosamente sobre una placa con medio agarizado y sembrado con bacterias (0.5 en escala de McFarland). Las muestras, diluidas en agua estéril, se introdujeron en los cilindros y se incubaron a 37°C durante 24h. Finalmente, se midieron los halos de inhibición resultantes.



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se obtuvieron nanopartículas de PLGA por el método emulsión-evaporación del solvente. Los valores promedios para los diámetros de las partículas basados en el número ( $D_{1,0}$ ) y en el volumen ( $D_{4,3}$ ), usando diferentes solventes orgánicos, se muestra en la Figura 1.3. La correlación entre  $D_{1,0}$  y  $D_{4,3}$  permite concluir respecto de tamaños y dispersión de distribuciones de los mismos.[73] Los resultados obtenidos fueron ( $49.78 \pm 29.00$ ), ( $37.92 \pm 17.91$ ) y ( $87.06 \pm 9.85$ )% para diclorometano, cloroformo y acetato de etilo, respectivamente. Únicamente el valor obtenido para acetato de etilo resultó estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ).



**Figura 1.3** - Parámetros de distribución de tamaños obtenidos luego de la preparación de partículas utilizando diferentes solventes orgánicos: diclorometano (D), cloroformo (C) y acetato de etilo (EA). Cada solvente fue analizado por triplicado.

El acetato de etilo presentó la mejor correlación, lo que indica una distribución de tamaños más homogénea. Además, presentó la menor desviación standard lo que implica una reproducibilidad mejorada. Sahana *et al.* (2008) reportaron resultados similares, concluyendo que el acetato de etilo fue el único solvente que permitía la obtención de nanopartículas por el método de emulsión-evaporación del solvente cuando se lo comparaba con cloroformo, cloruro de metileno y acetona.[74] Entre los diferentes solventes orgánicos utilizados, el acetato de etilo presenta la menor tensión interfacial, generando una mayor difusión del solvente en la zona interfacial (efecto Marangoni).[75,76] Este fenómeno permite la generación de nuevas gotas precursoras de

## CAPITULO 1

partículas a partir de otras de mayor tamaño, disminuyendo el diámetro promedio de partícula observado. Los diámetros de partícula obtenidos fueron de 115.32 y 130.83 nm para  $D_{1,0}$  y  $D_{4,3}$ , respectivamente. Debido a su tamaño, las partículas obtenidas podrían inyectarse por vía intravenosa y, además, se vería reducida la interacción con el sistema retículo-endotelial, aumentando así el tiempo de circulación sistémica. Por otro lado, en comparación con otros sistemas, las partículas de tamaño nanométrico pueden direccionarse pasivamente y acumularse posteriormente en sitios infectados e inflamados debido a una permeabilidad vascular incrementada característica de estos tejidos.[15] Así, el acetato de etilo fue seleccionado como solvente debido a que produce los menores diámetros promedio de partículas y la menor dispersión en la distribución de tamaños.

La Tabla 1.1 muestra los resultados obtenidos para el estudio del efecto del tiempo de ultrasonificación sobre la distribución de tamaño de las nanopartículas. Puede observarse que durante los primeros 3 minutos, un incremento en el tiempo de sonicación conlleva una reducción en el tamaño. Este era el resultado esperado si se tiene en cuenta que el aumento de la energía aplicada está asociado a una disminución en el tamaño de las gotas precursoras de partículas. Luego de los 3 minutos de sonicación, puede observarse un incremento en el tamaño promedio obtenido, lo que puede deberse a la coalescencia de las gotas de la fase orgánica hasta alcanzar la estabilidad de la emulsión. El tamaño mínimo de partículas se obtuvo para 2.5 min y fue de  $117.10 \pm 6.76$  nm. Resultados similares fueron reportados por Feczko *et al.* (2011), donde el tiempo de sonicación para la obtención del tamaño mínimo de partícula fue de 2.8 min. [57] Además, el IPD (índice de polidispersidad) siempre resultó menor a 0.2, lo que es aceptable para formulaciones nanoparticuladas.[73] Así, se seleccionó como tiempo óptimo de sonicación a 2.5 min.

## CAPITULO 1

**Tabla 1.1** - Diámetro promedio de nanopartícula para diferentes tiempos de emulsificación por ultrasonificación.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Diámetro promedio (nm)</b>	<b>IPD</b>
1	203.81 ± 19.27	0.015
2	122.14 ± 12.84	0.023
3	119.73 ± 9.16	0.019
5	188.19 ± 23.11	0.120

La Tabla 1.2 muestra los resultados obtenidos para los tamaños, las cargas de droga y la estabilidad de las partículas preparadas por la técnica de emulsión-evaporación del solvente, usando sonicación u homogenización y diferentes cargas iniciales de FF. Al analizar el tamaño de las partículas obtenido, se observan diferencias substanciales entre los dos métodos de emulsificación propuestos. Cuando se aplicó la ultrasonificación, se obtuvieron partículas sub-micrométricas. Mientras que cuando se utilizó un rotor homogeneizador, las partículas obtenidas presentaron un tamaño micrométrico. La aplicación de ultrasonificación podría ser el principal factor que induce la formación de partículas más pequeñas debido a las fuerzas de cavitación aplicadas. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las EE para los diferentes tamaños logrados. El FF presenta capacidad de ionizarse ( $pK_a = 9-10$ ) y de interactuar por puentes de hidrógeno, características que le permiten solubilizarse en un medio acuoso. Además, esta condición se ve incentivada por la presencia de surfactantes como el PVA. La leve hidrofiliidad del FF podría ser el principal factor que afecta la encapsulación en las partículas de PLGA, no solo induciendo la difusión de la droga desde la fase orgánica hacia la acuosa durante la emulsificación, sino también limitando la interacción droga-polímero. La combinación de estos dos fenómenos podría estar reduciendo la concentración de FF en las gotas orgánicas, precursoras de las partículas poliméricas. También, la gran área superficial del conjunto de gotas ofrece amplias zonas interfaciales que permiten la difusión de la droga hacia la fase acuosa. Pinto *et al.*(2014)[55] reportaron bajas encapsulaciones y eficiencias utilizando el método de emulsión y evaporación del solvente para la preparación de nanopartículas de PLGA con FF, mientras que Turino *et al.*(2018)[56] obtuvieron encapsulaciones similares pero menores eficiencias cuando las

## CAPITULO 1

nanopartículas fueron preparadas por el método de nanoprecipitación. Estos resultados pueden atribuirse a las mayores concentraciones de PLGA utilizadas en el presente trabajo, lo que incrementa la disponibilidad de polímero para la encapsulación de la droga. Asimismo, mayores concentraciones de polímero podrían estar incrementando las eficiencias debido al aumento en la viscosidad de las gotas, lo que reduce la difusión de la droga hacia la fase acuosa.

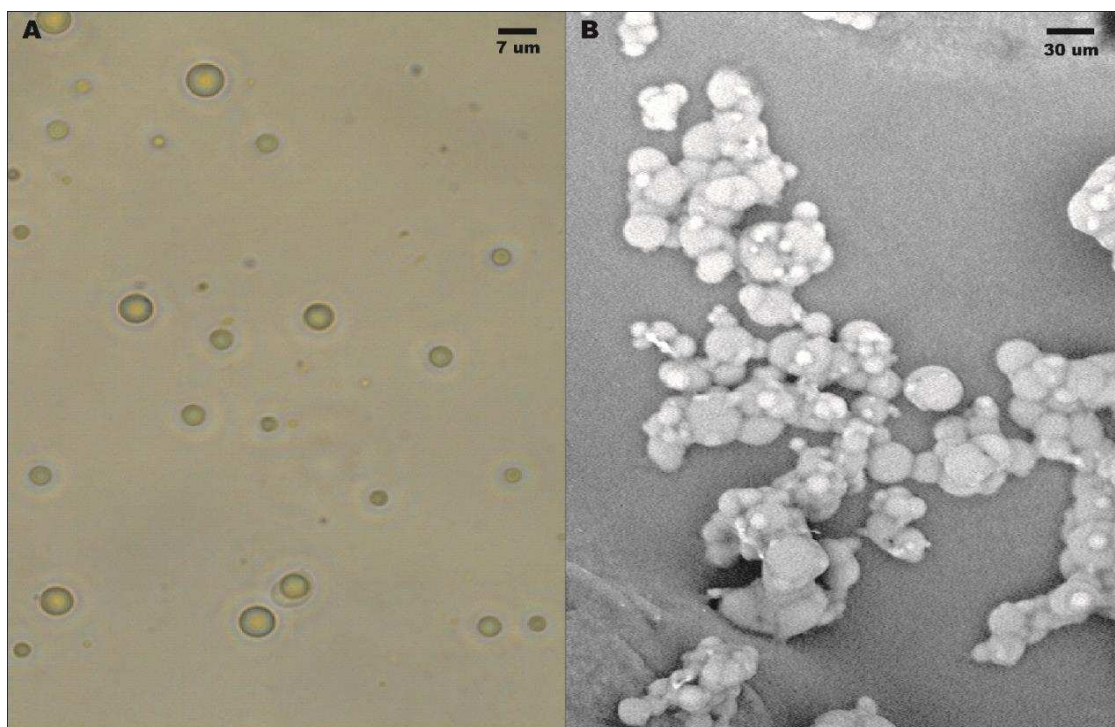
Con el objetivo de evaluar la posibilidad de conservar las suspensiones de nanopartículas, las formulaciones estudiadas fueron congeladas durante 7 días a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El diámetro promedio y el IPD fueron medidos antes y después del tiempo de conservación estudiado. Por ejemplo, para la formulación de nanopartículas con la carga inicial de FF de 6.12 % p p<sup>-1</sup> de PLGA, el diámetro e IPD medidos antes del congelamiento fueron de  $(240.46 \pm 0.51)$  y  $(0.12 \pm 0.01)$  nm, respectivamente. Luego del congelamiento, el diámetro y el IPD fueron de  $(251.62 \pm 30.70)$  nm y  $(0.13 \pm 0.01)$ , respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre las medidas antes y después de realizado el experimento ( $p > 0.05$ ). Estos resultados indicaron que las nanopartículas podían conservarse, a  $-15^{\circ}\text{C}$ , para posteriores ensayos.

**Tabla 1.2** - Diámetro promedio (DP), carga y estabilidad de las partículas obtenidas por la técnica emulsión y evaporación del solvente utilizando ultrasonificación (US) o rotor homogeneizador (RH) con diferentes cargas iniciales de FF.

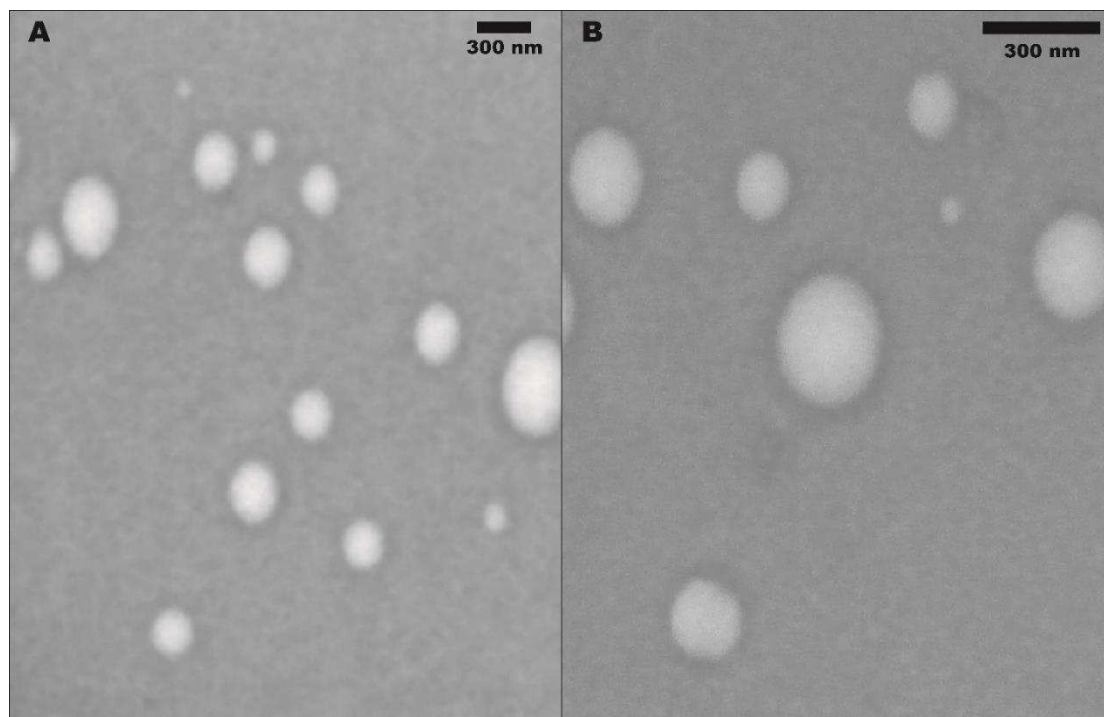
Método de emulsificación	Carga inicial de FF (% p p <sup>-1</sup> de PLGA)	DP (μm)	IPD	Enc (%p p <sup>-1</sup> of PLGA)	EE (%)	Conservación
US	6.12	$0.24 \pm 0.05$	0.127	$1.46 \pm 0.26$	$22.95 \pm 2.94$	Estable post-freezer
US	11.25	$0.20 \pm 0.4$	0.144	$2.85 \pm 0.25$	$24.29 \pm 3.02$	Estable post-freezer
US	26.83	$0.22 \pm 0.05$	0.133	$4.02 \pm 0.80$	$22.59 \pm 4.48$	Aglomerado post-freezer
RH	11.25	$2.35 \pm 0.7$	-	$2.92 \pm 0.20$	$21.50 \pm 2.73$	Liofilizado

## CAPITULO 1

Los estudios morfológicos basados en microscopía óptica y SEM se encuentran resumidos en la Figura 1.4. Como puede observarse, las micropartículas de PLGA con FF mostraron una geometría esférica (Figura 1.4 – A) y una superficie suave (Figura 1.4 – B). El tamaño de las micropartículas se determinó utilizando microscopía óptica y el diámetro medio obtenido fue de  $2.35 \mu\text{m}$  (ver Tabla 1.2). Si bien la técnica de SEM permitió estudiar la morfología, no se logró evaluar el tamaño debido a cierto grado de aglomeración de partículas. Este fenómeno puede deberse a la presencia de PVA residual, necesario para la re-suspensión de partículas.[77] La morfología de las nanopartículas de PLGA con FF fue analizada por TEM (ver Figura 1.5). Puede observarse una geometría esférica y una superficie suave. Además, se logró confirmar el diámetro medio obtenido por DLS ya que se obtuvo un resultado de  $(291.73 \pm 56.24) \text{ nm}$ .



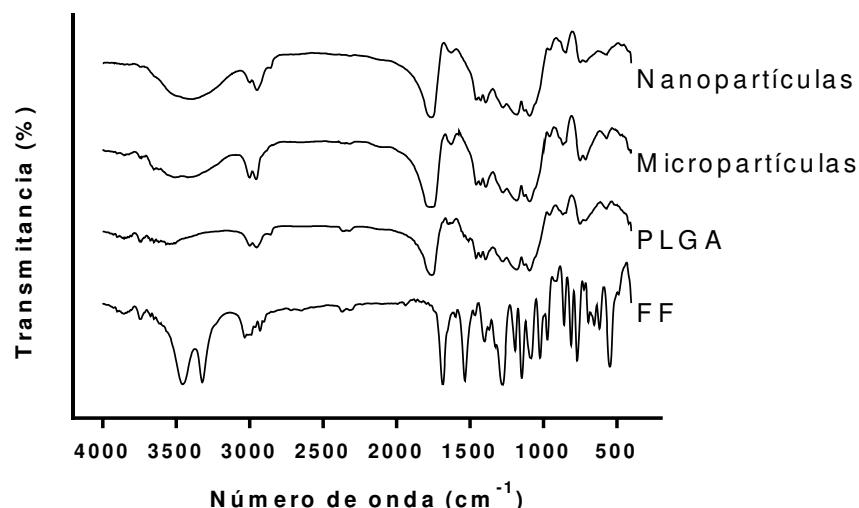
**Figura 1.4** - A) Imagen óptica (barra escala =  $7 \mu\text{m}$ ) y (B) fotografía SEM (barra escala =  $30 \mu\text{m}$ ) de micropartículas de PLGA con FF encapsulado.



**Figura 1.5** - Fotografías obtenidas mediante TEM de nanopartículas de PLGA con FF encapsulado (barra escala = 300 nm).

La Figura 1.6 muestra los resultados obtenidos en los estudios de FTIR. Para el FF, las bandas observadas a  $3450$  y  $3320\text{ cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de enlaces N-H y O-H, respectivamente. Las señales entre  $3000$  y  $2000\text{ cm}^{-1}$  se deben a vibraciones de extensión de los enlaces tipo C-H. Una de las bandas más características de FF es la que se observa a  $1680\text{ cm}^{-1}$  y corresponde a vibraciones de extensión del grupo amida. El espectro de PLGA muestra las bandas correspondientes a C-H entre  $3000$  y  $2000\text{ cm}^{-1}$  y una pronunciada banda a  $1780\text{ cm}^{-1}$  debido a las vibraciones del grupo funcional C=O. Las nano- y micropartículas mostraron espectros similares, donde los picos correspondientes a la droga se observan disminuidos o suprimidos debido a la baja carga y a la consecuente dilución atribuida a la alta concentración de polímero. También pueden observarse cambios en las intensidades a  $4000\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$  y  $2000\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  entre las partículas y el PLGA, los que pueden atribuirse a la incompleta remoción de PVA durante los lavados realizados.[78] Por otro lado, no se observaron cambios en las posiciones de los picos, lo que puede indicar la ausencia de interacciones significativas entre el principio activo y el polímero.

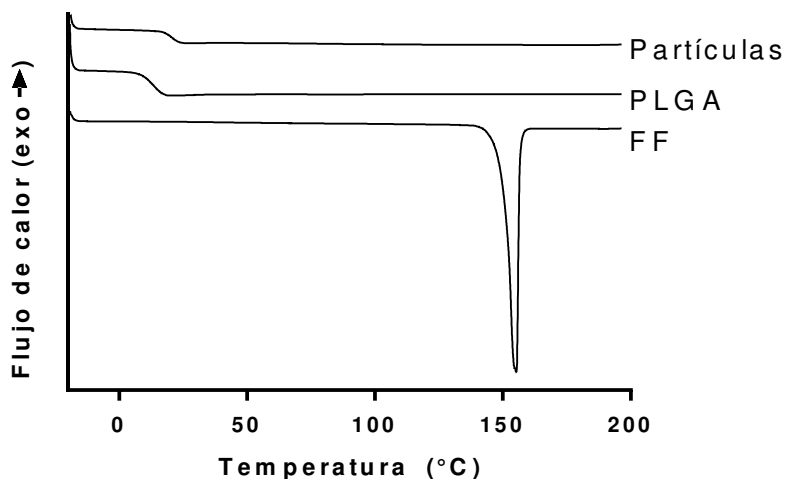
## CAPITULO 1



**Figura 1.6** - Espectros obtenidos por FTIR para FF, PLGA y las formulaciones de partículas.

Los termogramas obtenidos por DSC se muestran en la Figura 1.7. El FF nativo presentó un pico endotérmico alrededor de los 150°C que se corresponde con el punto de fusión de la fase cristalina. Para el PLGA, se observa una  $T_g$  (temperatura de transición vítrea) alrededor de los 20°C debido a la fase amorfa y no se observan picos correspondientes a temperaturas de fusión de cristales. El PLGA utilizado en el presente trabajo tiene una composición monomérica 50:50 y un bajo peso molecular, lo que impide la formación de cristales.[79] El termograma de las partículas mostró una  $T_g$  alrededor de los 20°C y no presentó picos correspondientes a un punto de fusión. El punto de fusión de la droga no fue observado, probablemente, debido a la baja carga de principio activo y la consecuente dilución debido a la alta concentración de polímeros. A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que pueden descartarse interacciones droga-polímero y que el FF, luego de la síntesis de las partículas se encuentra disuelto en la matriz polimérica en forma amorfa.

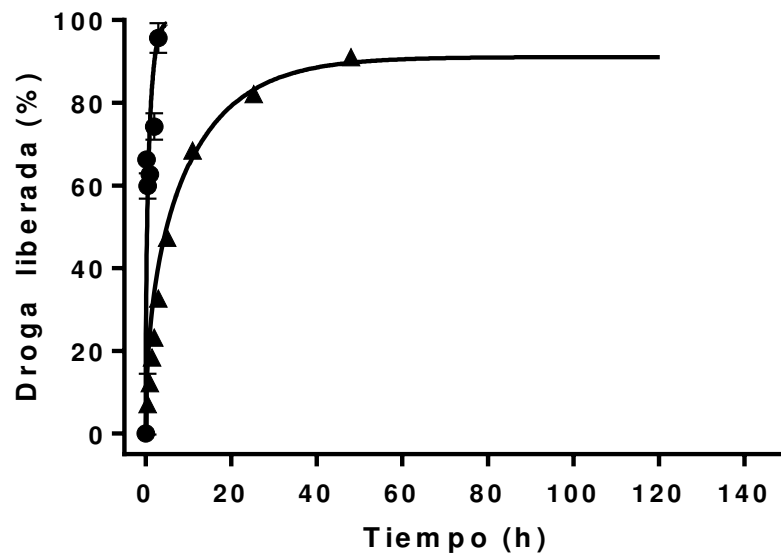
## CAPITULO 1



**Figura 1.7** - Termogramas obtenidos por DSC para FF, PLGA y partículas formuladas.

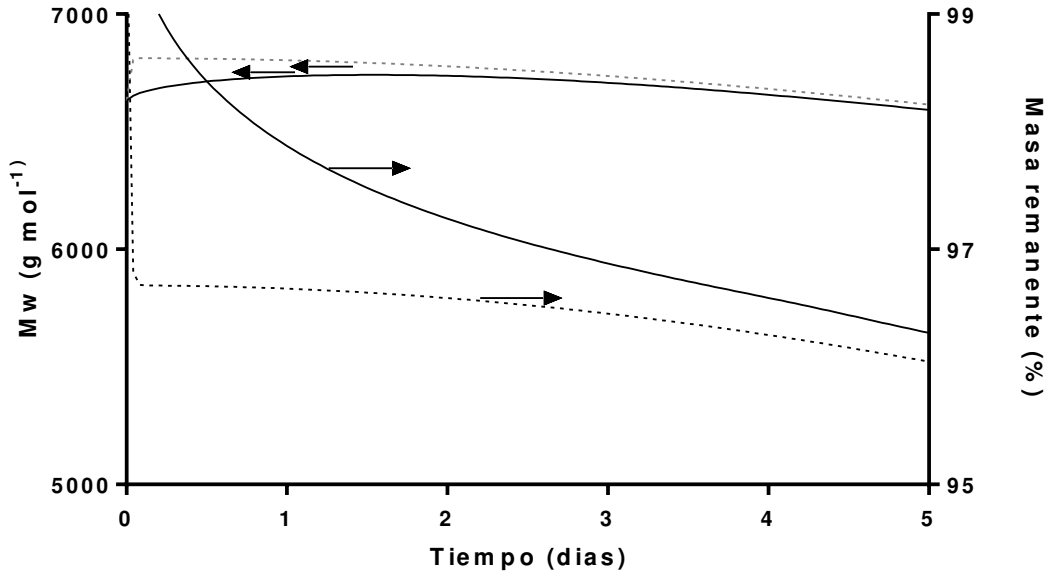
Los perfiles de liberación *in vitro* de FF, para los diferentes sistemas de partículas, se muestran en la Figura 1.8. El buffer fosfato (pH 7.4) fue usado como medio de liberación y las *sink conditions* fueron mantenidas durante todos los experimentos. Las nanopartículas mostraron una liberación completa a las 5 h de iniciado el ensayo. Los estudios de liberación de drogas como el clorhidrato de ciprofloxacina y la procaína, desde nanopartículas de PLGA, arrojaron resultados similares.[12,80] En el caso de las micropartículas, el 20-30% de la droga se liberó dentro de las primeras 5 horas. Así, el sistema presenta un perfil de liberación típico difusivo, alcanzando el 80-90% de liberación acumulada luego de las 40 h de iniciado el ensayo. En ambos sistemas, la rápida liberación observada dentro de las primeras 5 h puede estar asociada a droga encapsulada cerca de la superficie de las partículas.[12,80] Como puede apreciarse, el tamaño de las partículas afecta la velocidad de liberación de FF. Las micropartículas presentan caminos de difusión más largos como consecuencias de un mayor tamaño, demorando la liberación de FF al medio.[27,81–83] Además, las nanopartículas presentan una mayor relación superficie-volumen, acelerando el fenómeno de difusión. [12,77]





**Figura 1.8** – Resultados experimentales (símbolos) y teóricos (líneas sólidas) de las liberaciones *in vitro* de FF desde nanopartículas (●) y micropartículas (▲) de PLGA.

La Figura 1.9 muestra los resultados de simulación obtenidos para la degradación polimérica predicha por el módulo de degradación para nano- y micropartículas de PLGA. Para las simulaciones, se utilizaron los parámetros ajustados en el trabajo previo de Busatto *et al.* (2017).[61] Puede observarse que la degradación del polímero ocurre lentamente durante el tiempo de liberación debido a una baja concentración de los productos de degradación que tienen grupos ácidos terminales, asociados a una degradación autocatalítica. Además, estos productos, pueden difundir fácilmente hacia la superficie de las partículas debido a las bajas dimensiones de las mismas. La rápida pérdida inicial de masa está relacionada con la disolución de las cadenas poliméricas con bajas masas molares de la distribución inicial de pesos moleculares. La rápida difusión de oligómeros, hacia el medio de liberación, incrementa el peso molecular promedio del polímero porque excede la tasa de degradación. Luego de 5 días, más del 95% de la masa de nano- y micropartículas se encuentran presentes. Ya que la erosión de la matriz polimérica es despreciable durante el período estudiado, la difusión del principio activo es el principal fenómeno que puede explicar los perfiles de liberación obtenidos.



**Figura 1.9** - Evolución simulada del peso molecular promedio del polímero y de la pérdida de masa para nano- (líneas punteadas) y micropartículas (líneas sólidas) de PLGA.

La Figura 1.8 también muestra el resultado de las simulaciones para la liberación de FF (líneas sólidas) desde diferentes sistemas particulados predichos para el módulo de liberación. Como puede observarse, existe una excelente concordancia con los resultados experimentales obtenidos (puntos). Para la simulación correspondiente al módulo de liberación, los parámetros de ajuste utilizados se presentan en la Tabla 1.3 .

**Tabla 1.3** - Parámetros para el modelo de liberación.

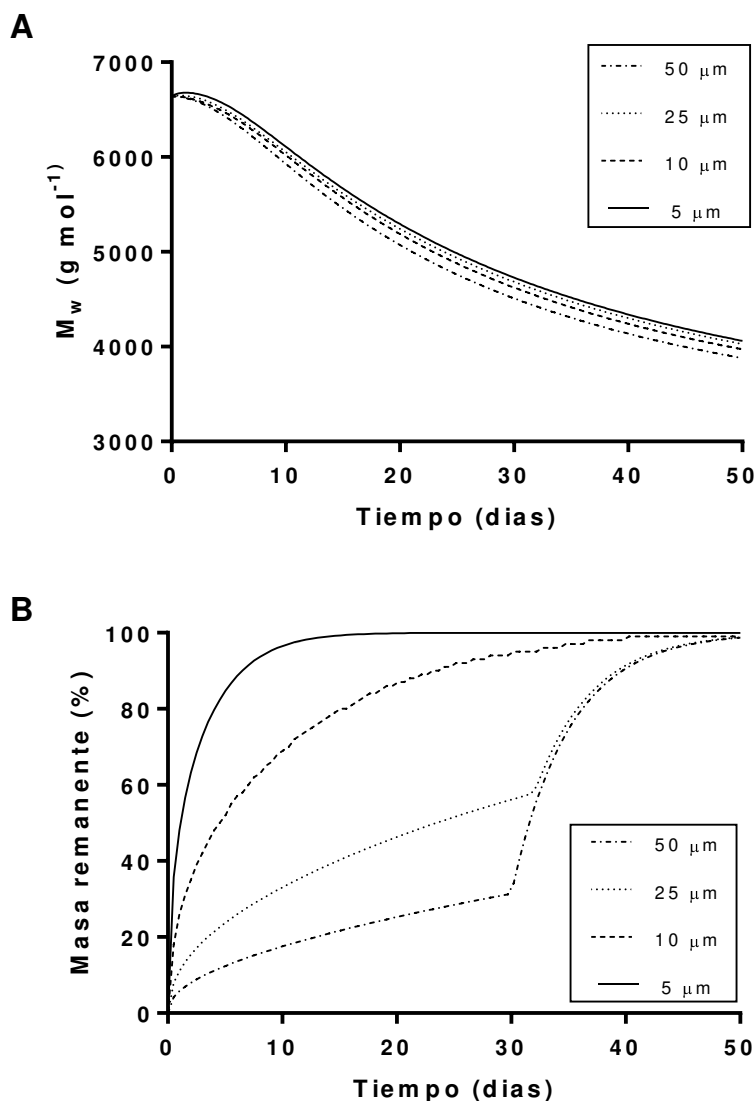
Parámetro	Valor
$D_{FF}^{\circ}$ ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	$2 \times 10^{-14}$
$k_d$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$2.3 \times 10^{-6}$
$D_{FF_b}$ ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ )	$1.0 \times 10^{-8}$
$k_D$	2.5

El valor ajustado para la difusividad efectiva inicial de la droga ( $D_{FF}^{\circ}$ ) fue de  $2 \times 10^{-14} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , valor que aproximadamente coincide con otros reportados para drogas con

## CAPITULO 1

características fisicoquímicas similares al FF (masa molar, solubilidad acuosa) en micro-esferas de PLGA y bajo condiciones similares de liberación.[84]

En la Figura 1.10 se muestran otras simulaciones teóricas. El modelo se empleó para estudiar el efecto del tamaño de partícula sobre la degradación del polímero y la liberación de FF. Puede observarse que la degradación polimérica se incrementa con el aumento del tamaño de partícula, ya que existen caminos de difusión más largos para los productos ácidos de degradación, llevando a su acumulación dentro de la matriz polimérica y aumentando el efecto degradativo autocatalítico. La velocidad de liberación de la droga disminuye a medida que aumenta el tamaño de partícula posiblemente debido al aumento en la longitud del camino difusivo. Además, el efecto de la degradación del polímero en la liberación del PA se vuelve importante para partículas mayores a 25  $\mu\text{m}$  debido a que son capaces de retener los grupos ácidos catalíticos generados, incrementándose el efecto de degradación autocatalítico. Como se reportó previamente en Busatto *et al.*(2017) [27], fue posible estimar el rango de peso molecular promedio al cual el mecanismo de transporte de materia cambia para micropartículas de PLGA. Los rangos estimados para  $\bar{M}_n$  y  $\bar{M}_w$  fueron de 3100–3200 y 4300–4700  $\text{g mol}^{-1}$ , respectivamente. Estos resultados concuerdan con los valores reportados para condiciones experimentales similares y fue utilizado para la determinación del parámetro  $t^*$ , tiempo al cual el fenómeno de degradación polimérica de la matriz domina sobre la difusión en el proceso de liberación del PA. El efecto de retención de los grupos ácidos catalíticos y el posterior incremento de la autocatálisis degradativa puede explicar la variación de  $t^*$  con el tamaño promedio de partícula.

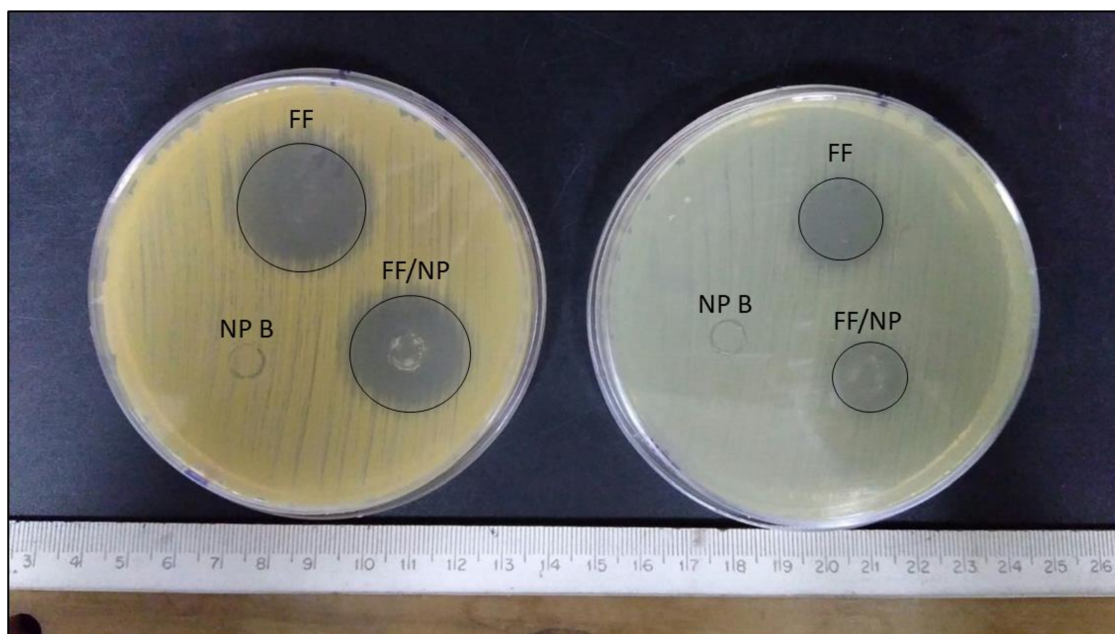


**Figura 1.10** - Efecto teórico del tamaño de partícula en la degradación del polímero y la liberación de FF desde micropartículas de PLGA: (A) Evolución del peso molecular promedio del polímero y (B) perfiles de liberación controlada de FF.

La Figura 1.11 muestra los resultados obtenidos para los ensayos microbiológicos realizados. Como era de esperar, las nanopartículas sintetizadas sin el principio activo no tienen ninguna capacidad para inhibir el crecimiento bacteriano. Por otro lado, al comparar los halos de las nanopartículas formuladas con FF y la solución de FF libre se puede apreciar una disminución en el halo de inhibición en las primeras. Esto puede atribuirse a una ausencia de liberación completa del FF encapsulado, a las 24h, en el medio agarizado. Por otro lado, esta disminución en el tamaño del halo de inhibición podría deberse, también, a que no existe una acción sinérgica entre el principio activo y

## CAPITULO 1

su encapsulamiento en nanopartículas de PLGA. Es interesante notar la mayor susceptibilidad de la cepa *Staphylococcus aureus*, en las concentraciones de trabajo, al principio activo florfenicol. Estos resultados se encuentran en concordancia con reportes que indican una mayor susceptibilidad de organismos Gram-positivos al FF.[49]



**Figura 1.11** – Ensayos microbiológicos en placa para evaluar la capacidad antimicrobiana de nanopartículas sin FF (NP B), con FF (FF/NP) y una suspensión acuosa de FF (FF). (Izq) *St. aureus*;  
(Der) *E. coli*.



### CONCLUSIONES PRELIMINARES

Luego de un análisis bibliográfico, se seleccionó el florfenicol como principio activo para el desarrollo de sistemas de liberación controlada de fármacos antimicrobianos. La dificultad para desarrollar formulaciones concentradas de FF y la necesidad de un alto número de dosis en las diferentes terapias lo vuelven un foco de gran interés para la industria farmacéutica veterinaria, especialmente en sistemas de liberación controlada. Por otro lado, los resultados que puedan obtenerse para este antibiótico pueden utilizarse como modelos para otras drogas ionizables y de bajo peso molecular que necesiten de sistemas de vehiculización y liberación controlada para sus aplicaciones.

Los ensayos preliminares permitieron establecer la calidad de la materia prima de trabajo y la solubilidad del PA en diferentes medios acuosos. Estos resultados son de gran importancia para determinar las posibles metodologías de síntesis para los diferentes sistemas de liberación controlada. Principalmente, el conocimiento de la solubilidad en diferentes medios acuosos permitirá establecer protocolos de síntesis que puedan involucrar, o no, emulsiones en agua.

Se prepararon, de forma satisfactoria, nano- y micropartículas de PLGA con FF encapsulado utilizando el método de emulsión- evaporación del solvente.

Para la síntesis de nanopartículas con una distribución homogénea de tamaños, se definió el solvente y el tiempo de ultrasonificación adecuados. Para el caso de las micropartículas, se utilizó la homogeneización como metodología de emulsificación.

Para ambos sistemas, se obtuvieron partículas esféricas y de superficie homogénea. En ninguno de los casos se observaron interacciones significativas entre el polímero y el PA. Las eficiencias de encapsulación de FF obtenidas fueron de 20-25%, independientemente del tamaño de partícula.

En el estudio de las liberaciones *in vitro*, las nanopartículas liberaron el 100% del FF dentro de las 5 h de iniciado el ensayo. Por otro lado, las micropartículas mostraron una liberación por difusión más lenta luego de una liberación inicial rápida. Ya que la erosión de la matriz polimérica es despreciable durante los tiempos de estudio, la difusión del PA sería el principal fenómeno capaz de explicar los perfiles de liberación observados. La menor tasa de liberación observada para micropartículas se puede asociar a caminos de difusión más largos en comparación con las nanopartículas.

Las simulaciones teóricas mostraron que el efecto de la degradación sobre la liberación de la droga se vuelve importante en micropartículas con tamaños mayores a los 25  $\mu\text{m}$ , debido a los extendidos tiempos de liberación y el efecto de degradación autocatalítica.

## CAPITULO 1

Los ensayos microbiológicos permitieron evidenciar tanto el encapsulamiento de FF como la ausencia de acciones sinérgicas entre el FF y la utilización de una formulación nanoparticulada.



**ANEXO 1.1****Ensayos preliminares para la caracterización del florfenicol**Determinación del rango de temperatura de fusión

Con el objetivo de conocer la calidad y la pureza de la materia prima de florfenicol a ser utilizada, se llevó a cabo la determinación del rango de fusión. Para esto, aproximadamente 15 mg de materia prima se colocaron en un tubo capilar de vidrio y se sometieron a un proceso de calentamiento progresivo en un rango de temperatura adecuado y a una velocidad de 5 °C min<sup>-1</sup>, utilizando un equipo Büchi Melting Point B-450. Por observación visual, se registró el rango de fusión.

Determinación del contenido de humedad

Para determinar el porcentaje de humedad en la materia prima, se pesó una masa de FF (*Pi*), se la colocó en un ultra freezer (Thermo Fisher, modelo 902) a -80°C y se liofilizó durante 24 h. Luego, se pesó nuevamente la masa de materia prima (*Pf*) y se calculó la cantidad porcentual de agua presente utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Humedad (\% p p}^{-1}\text{)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Cuantificación del principio activo

Para la cuantificación del FF, se realizó la puesta a punto de un método utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Shimadzu, modelo Prominence Serie 20<sup>a</sup>, con detector de arreglo de diodos, detector de fluorescencia e inyector automático. Se construyó una curva de calibrado estadísticamente apropiada.

Estudios de solubilidad

Se evaluó la solubilidad del FF en diferentes medios: agua ultrapura, buffer fosfato 0.1M pH 7.40 y buffer fosfato salino 0.1M pH 7.40. Para esto, un exceso de droga se puso en contacto con los mencionados medios, en viales perfectamente sellados, y se mantuvieron en agitación orbital, a 25°C. Al cabo de 24 h, se centrifugaron los viales y se cuantificó la droga soluble en los sobrenadantes por HPLC, lo que permitió determinar los valores de las solubilidades, a 25 °C.

## CAPITULO 1

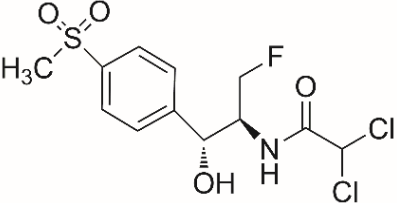
### Resultados y discusiones para la caracterización del florfenicol

La caracterización del principio activo consistió en la determinación de la calidad de la materia prima (punto de fusión y contenido de humedad) y la posterior determinación de solubilidad en diferentes medios acuosos. La caracterización correspondiente permitirá elegir las posteriores metodologías de síntesis de los SLCD y comprender los resultados obtenidos en los diferentes ensayos llevados a cabo.

El rango de fusión teórico reportado para el FF es de 152.0-156.0°C. La materia prima utilizada en el presente trabajo de investigación arrojó un resultado de 153.6-154.5°C. Como puede observarse, la droga cumple con lo reportado en la bibliografía.[85-87]

La Tabla 1.4 muestra las principales características del FF y su estructura química.

**Tabla 1.4** – Información característica del principio activo FF.

Nombre común	Nº CAS	Grupo/acción	Espectro	Estructura química
Florfenicol	73231-34-2	Fenicol / bacteriostático	Amplio	 The chemical structure of Florfenicol is shown. It consists of a central carbon atom bonded to a hydroxyl group (OH) with a dashed bond, a 4-methylsulfonylphenyl group, a fluoromethyl group (CH2F), and a 2,2-dichloroacetamido group (NHCOCHCl2).

El contenido de humedad calculado para la materia prima de FF fue del  $(1.1 \pm 0.2) \%$ , luego de un ciclo de liofilización. La humedad teórica esperada debía ser menor a 0.5%. Como puede observarse, la materia prima contenía un valor de humedad elevado. Un segundo ciclo de liofilización permitió acondicionar el reactivo para los ensayos posteriores.

Para poder realizar los ensayos de solubilidad requeridos, en primer lugar, se debió poner a punto una técnica de HPLC. La Tabla 1.5 muestra las condiciones que permitieron resolver el pico de FF y obtener una curva de calibrado en un rango de concentraciones adecuado.

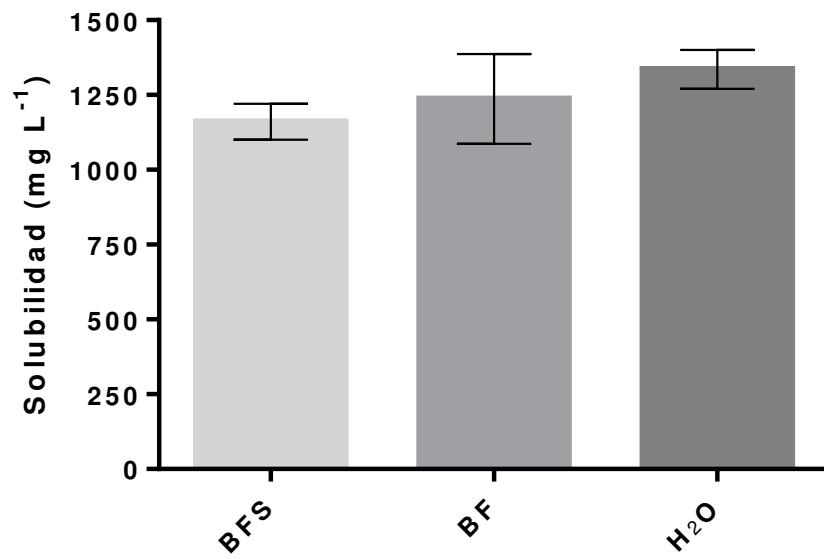
## CAPITULO 1

**Tabla 1.5** - Método de HPLC desarrollado para la cuantificación de FF.

Principio activo	Fase móvil	Relación de fases	Caudal (mL min <sup>-1</sup> )	$\lambda$ (nm)	Temperatura de columna (°C)	Columna (mm x mm x $\mu$ m)
Florfenicol	Metanol : Agua pH 2.5	50:50	0.750	224	35	C18 (4.6 x 250 x 5)

Los datos experimentales para la construcción de la curva de calibrado se ajustaron con un modelo lineal. La recta de ajuste obtenida fue del tipo  $[y = a + bx]$  (utilizando regresión lineal por medio del método de cuadrados mínimos) donde “y” representa la señal (área bajo la curva, ABC), “x” la concentración de principio activo (mg L<sup>-1</sup>), “a” la ordenada de origen y “b” la pendiente. La ordenada de origen y la pendiente fueron  $(103926.0 \pm 88110.0)$  y  $(51204.0 \pm 995.3)$ , respectivamente. El método propuesto arrojó una regresión lineal con un  $R^2 > 0.99$ . Este resultado estadístico indica que el modelo lineal explica el 99% de la variabilidad de la respuesta ABC. Por otro lado, la probabilidad de que la pendiente sea igual a 0 resultó menor a 0.0001, indicando que es significativamente diferente de 0.

El principio activo presenta, según la bibliografía, alta solubilidad en solventes orgánicos.[85–87] Para las técnicas propuestas de síntesis de partículas, es de suma importancia conocer la solubilidad en medios acuosos. La Figura 1.12 muestra las solubilidades determinadas, en mg L<sup>-1</sup>, para el FF. Como puede observarse, los valores de solubilidad se encuentran en el rango de 1200-1400 mg L<sup>-1</sup>. Este resultado es congruente con lo reportado en la bibliografía.[44]



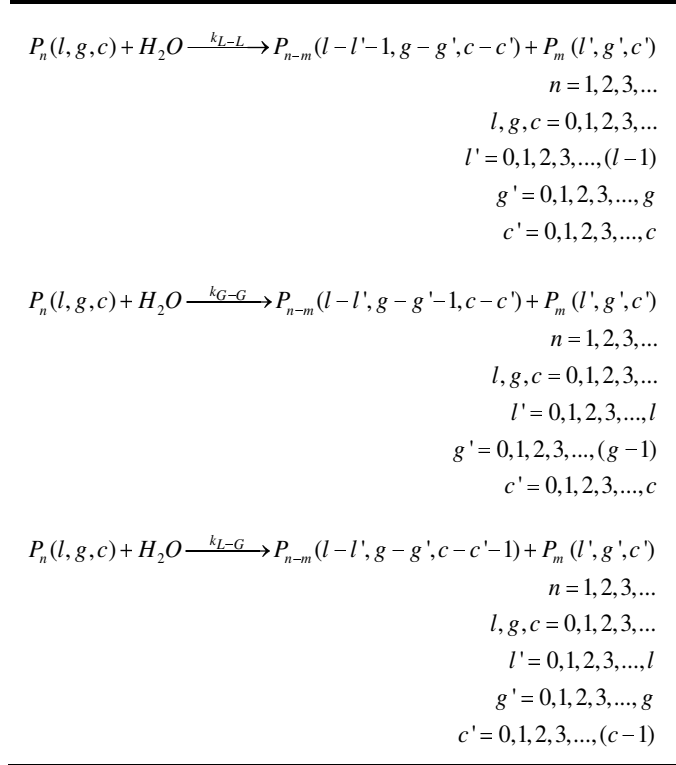
**Figura 1.12** - Solubilidades obtenidas para el florfenicol en buffer fosfato salino 0.1 M pH 7.4 (BFS), buffer fosfato 0.1 M pH 7.4 (BF) y agua (H<sub>2</sub>O).

**ANEXO 1.2**

**Módulo de degradación de PLGA**

Este módulo está basado en el mecanismo de hidrólisis presentado en el Esquema 1.

**Esquema 1.** Mecanismo de hidrólisis de micropartículas de PLGA tomado de Busatto *et al.* (2017)[61]



donde las cadenas poliméricas  $P_n(l, g, c)$  están caracterizadas por el largo de cadena  $n$  y el número de los diferentes enlaces éster  $l, g$  and  $c$ , correspondientes a los enlaces Láctico-Láctico (L-L), Glicólico-Glicólico (G-G) y Láctico-Glicólico (L-G), respectivamente; y  $k_{L-L}, k_{G-G}, k_{L-G}$  son las respectivas constantes de hidrólisis para cada tipo de enlace éster. A partir de dicho mecanismo de hidrólisis y considerando el efecto autocatalítico de los grupos ácidos terminales, se deriva el siguiente balance de masa para la especie genérica de PLGA  $P_n$ , siendo  $n$  el largo de cadena, que permite determinar la distribución de pesos moleculares del PLGA:

$$\begin{aligned}
 \frac{\partial \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n]}{\partial t} &= \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_p \frac{\partial \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n]}{\partial r} \right) - k_{L-L} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} l [P_n][H^+] - k_{G-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} g [P_n][H^+] - k_{L-G} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} c [P_n][H^+] + \\
 &+ \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} \left\{ \sum_{m=n+1}^{\infty} \left( \sum_{k=l+1}^{\infty} k_{L-L} p_k k [P_m(k, g, c)] + \sum_{h=g+1}^{\infty} k_{G-G} p_h h [P_m(l, h, c)] + \sum_{d=c+1}^{\infty} k_{L-G} p_d d [P_m(l, g, d)] \right) \right\} \\
 &n = 1, 2, 3, \dots \quad ; \quad n < n_s \quad (1)
 \end{aligned}$$

## CAPITULO 1

donde  $D_{P_n}$  es la difusividad efectiva de las cadenas poliméricas  $P_n$  y  $n_s$  es una longitud crítica de cadena que representa el máximo largo de cadena para la disolución de los oligómeros.

Para poder considerar el incremento de la difusividad efectiva durante la degradación, dicho parámetro fue relacionado con el peso molecular promedio del polímero a través de la siguiente expresión:[88]

$$D_{P_n} = D_{P_n}^0 \left[ 1 + \left( 1 - \frac{\overline{M}_w(t,r)}{M_w(t=0)} \right) (k_D - 1) \right] \quad n < n_s \quad (2)$$

donde  $\overline{M}_w$  es el peso molecular promedio,  $D_{P_n}^0$  es la difusividad efectiva inicial de las cadenas poliméricas y  $k_D$  es un parámetro de ajuste.

El balance de masas para  $[H^+]$  permite tener en cuenta la catálisis ácida durante el proceso:

$$\frac{d[H^+]}{dt} = k_{a_1} \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] - k_{a_2} [H^+]^2 \quad (3)$$

donde  $k_{a_1}$  y  $k_{a_2}$  son las constantes de disociación directa y reversa, respectivamente.

Las condiciones de contorno empleadas son las siguientes:

$$\left. \frac{\partial [P_n]}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad n < n_s \quad (4)$$

$$[P_n] \Big|_{r=R} = 0 \quad n < n_s \quad (5)$$

La segunda condición de contorno se basa en la presencia de *sink condition* en la interface micropartícula - medio acuoso

De la Eq. 1, la distribución en número del largo de cadena (DNLC) y la distribución en peso del largo de cadena (DPLC) del co-polímero pueden ser estimados como sigue:

$$x_n = \frac{\int_0^R [P_n(l, g, c)] r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] r^2 dr} \quad (6)$$

$$x_w = \frac{\int_0^R [P_n(l, g, c)] n M_{RU} r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{RU} r^2 dr} \quad (7)$$

## CAPITULO 1

donde  $M_{RU}$  es el peso molecular promedio de las unidades repetidas, definido como:  $M_{RU} = x_{L-L} M_{L-L} + x_{G-G} M_{G-G} + x_{L-G} M_{L-G}$ , siendo  $M_{L-L}$ ,  $M_{G-G}$  y  $M_{L-G}$  las masas molares correspondientes a los enlaces éster de las unidades repetidas y  $x_{L-L}$ ,  $x_{G-G}$  y  $x_{L-G}$  las fracciones molares de los enlaces éster L-L, G-G y L-G.

El peso molecular promedio de los co-polímeros puede ser estimado a través de la siguiente expresión:

$$\bar{M}_n = \frac{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{RU} r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] r^2 dr} \quad (8)$$

$$\bar{M}_w = \frac{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] (n M_{RU})^2 r^2 dr}{\int_0^R \sum_{n=1}^{\infty} \sum_{l=0}^{\infty} \sum_{g=0}^{\infty} \sum_{c=0}^{\infty} [P_n(l, g, c)] n M_{RU} r^2 dr} \quad (9)$$

### Módulo de liberación

Este módulo describe el proceso de liberación de la droga considerando la difusión de la misma a través de la matriz polimérica y la degradación polimérica. El sistema de ecuaciones se describe a continuación.

El balance de materia para el FF es:

$$\frac{\partial C_{FF}}{\partial t} = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 D_{FF} \frac{\partial C_{FF}}{\partial r} \right) \quad t < t^* \quad (10)$$

donde  $C_{FF}$  es la concentración de florfenicol disuelto en la matriz polimérica y  $D_{FF}$  es la difusividad efectiva de la droga en la matriz polimérica.

Notar que a medida que la degradación avanza, el mecanismo de transporte puede ser modificado como consecuencia de los cambios morfológicos en las micropartículas. Como consecuencia, es posible identificar un tiempo crítico ( $t^*$ ) en el cual la masa transferida en la fase polimérica ya no es el mecanismo preferencial en el proceso de liberación del principio activo.

La condición inicial de  $C_{FF}$  está determinada por la carga de droga efectiva ( $C_{FF_{eff}}$ ), considerando una dispersión uniforme de la droga en la matriz polimérica:

$$C_{FF} = C_{FF_{eff}} \quad t = 0, \quad 0 \leq r \leq R \quad (11)$$

## CAPITULO 1

Respecto de las condiciones de contorno, considerando *sink condition* en la interface micropartícula - medio acuoso, las mismas son:

$$\left. \frac{\partial C_{FF}}{\partial r} \right|_{r=0} = 0 \quad (12)$$

$$D_{FF}(r=R) \left. \frac{\partial C_{FF}}{\partial r} \right|_{r=R} = k_{FF} (C_{FF_b} - C_{FF}(r=R)) = -k_{FF} C_{FF}(r=R) \quad (13)$$

donde  $C_{FF_b}$  es la concentración de florfenicol en el medio de liberación y  $k_{FF}$  es el coeficiente de transferencia de masa de florfenicol desde la superficie de las partículas al medio de liberación. El valor de  $C_{FF_b}$  es considerado despreciable debido a la gran cantidad de medio de liberación comparado con la masa de droga liberada.

El coeficiente de transferencia de masa de florfenicol puede ser calculado del número de Sherwood (Sh), que es igual a 2 para formas esféricas bajo condiciones de estancamiento:[17]

$$Sh = 2 = \frac{k_{FF} 2R}{D_{FF_b}} \quad (14)$$

donde  $D_{FF_b}$  es el coeficiente de difusión de florfenicol en el medio de liberación y  $R$  es el radio de la partícula.

El incremento en la difusividad efectiva de la droga debido a la degradación polimérica es tenido en cuenta a través de la siguiente expresión:[88]

$$D_{FF} = D_{FF}^0 \left[ 1 + \left( 1 - \frac{\overline{M}_w(t)}{\overline{M}_w(t=0)} \right) (k_D - 1) \right] \quad (15)$$

donde  $\overline{M}_w$  es el peso molecular promedio del polímero,  $D_{FF}^0$  es la difusividad efectiva inicial del florfenicol, y  $k_D$  es un parámetro de ajuste.

Luego del tiempo crítico, el transporte de masa en la fase fluida es descrito a través de un balance de masa macroscópico en la partícula según:

$$\frac{d \langle C_{FF} \rangle}{dt} = -k_d' \frac{a_p}{V_p} (\langle C_{FF} \rangle - C_{FF_b}) = -k_d (\langle C_{FF} \rangle - C_{FF_b}) = -k_d \langle C_{FF} \rangle \quad t > t^* \quad (16)$$

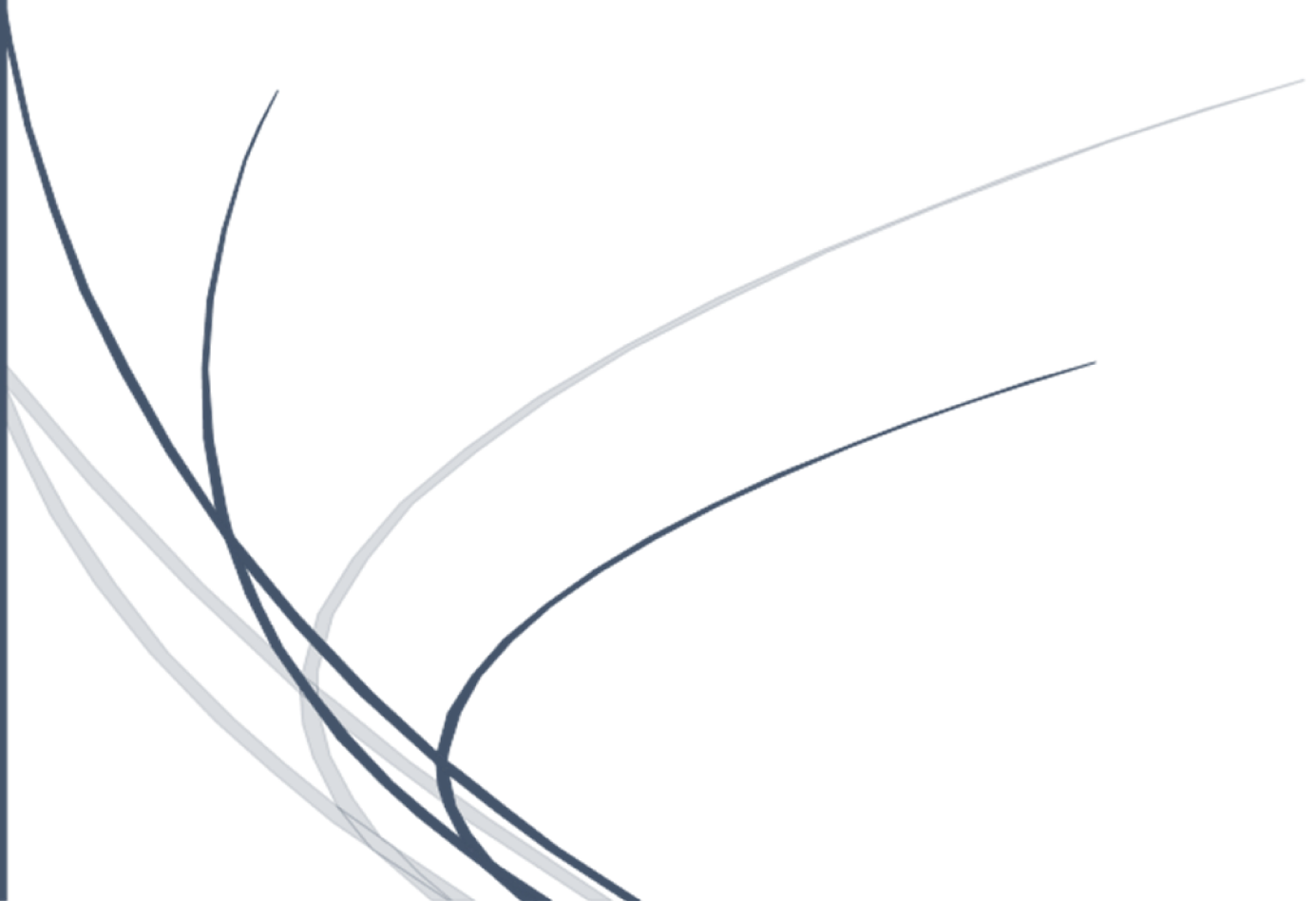


## CAPITULO 1

donde  $\langle C_{FF} \rangle$  es la concentración volumétrica promedio de florfenicol dentro de la partícula,  $k'_d$  es el coeficiente de transferencia de masa de florfenicol desde la superficie de la partícula al medio de liberación,  $a_p$  es el área de partícula y  $V_p$  es el volumen de partícula.



**CAPÍTULO 2. SISTEMAS  
PARTICULADOS BASADOS EN  
BIOPOLÍMEROS Y EUDRAGIT-  
RS PARA LA ENCAPSULACIÓN  
POR CRISTALIZACIÓN *IN  
SITU* Y LA LIBERACIÓN  
CONTROLADA DE  
FLORFENICOL**





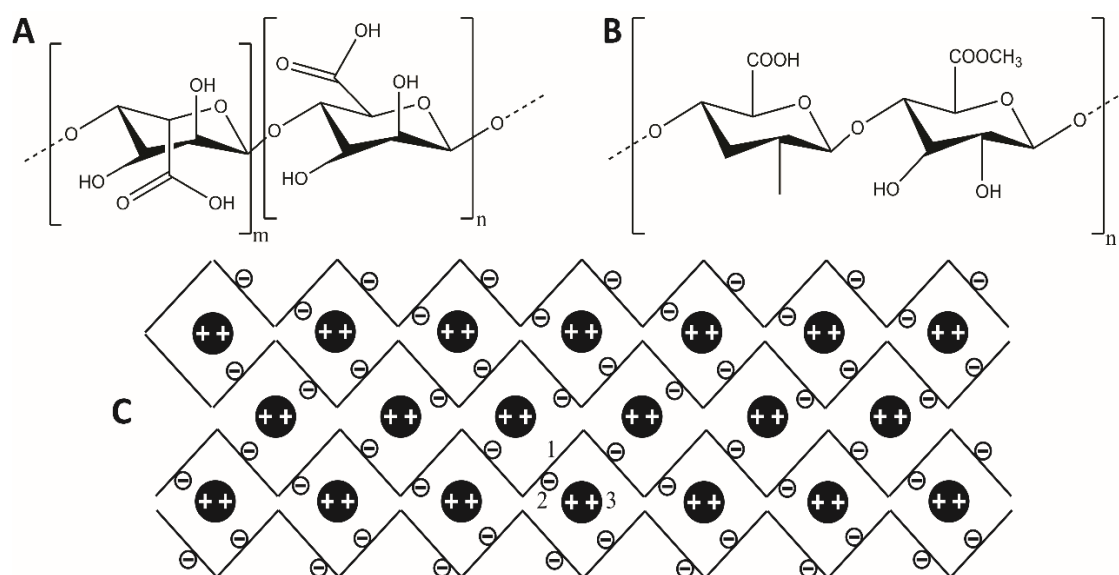
### INTRODUCCIÓN

Durante las últimas décadas, la liberación controlada de moléculas ha ganado una relevancia notoria en el diseño de nuevas estrategias para vehicular sustancias en diversos campos de investigación. Particularmente en el diseño de terapias, intentar reducir tanto el número de dosis como los efectos secundarios son los principales objetivos de este tipo de tecnologías.[2,83] La predicción de las cinéticas de liberación y el direccionamiento en el organismo son las características más importantes a alcanzar en el desarrollo de tecnologías para la liberación controlada de drogas.[6] En este sentido, los hidrogeles son uno de los sistemas más usados en este campo para ser aplicados a través de diversas técnicas terapéuticas. Los hidrogeles son materiales poliméricos con la habilidad de absorber varias veces su peso en agua mientras que mantienen su estructura 3D. Las redes poliméricas se forman mediante enlaces químicos y/o físicos que proveen la integridad característica. Por otro lado, estos materiales exhiben la capacidad de hincharse y desarrollar cambios estructurales en respuesta a diferentes condiciones ambientales (actividad acuosa, pH, fuerza iónica, presencia de enzimas, etc.), las que se pueden observar en diferentes órganos, durante estados normales y patológicos. En este sentido, las redes poliméricas capaces de responder a cambios en el pH representan un interesante objeto de estudio.[20] En general, en condiciones de pH apropiadas y debido a la presencia de grupos funcionales específicos, los hidrogeles pueden sufrir cambios fisicoquímicos y morfológicos. Por ejemplo, ciertos hidrogeles pueden ionizarse, generándose fuerzas electrostáticas repulsivas y/o atractivas. Como consecuencia, puede producirse la relajación de las cadenas poliméricas, hinchamiento y liberación de un principio activo encapsulado.[8] Además, los hidrogeles pueden ser fabricados en una variedad de formas geométricas como bloques, micropartículas, nanopartículas, esferas, recubrimientos y films.[7] La forma esférica, típicamente en el rango de 1 a 5 mm, es llamada *bead* o macroesfera y representa una opción para aplicaciones en terapias orales y de cavidades.[18,19,89,90] La vía oral es la principal y más simple forma de administrar PA (principios activos) al organismo debido a su fácil administración, mejor ajuste de dosis, mayor aceptación por parte del paciente, bajos costos de manufactura, entre otras razones.[8]

Los alginatos y pectinas (Figura 2.1 – A y B, respectivamente) son unos de los biopolímeros más populares para la producción de hidrogeles y son altamente utilizados en biomedicina debido a su estado GRAS (del inglés *Generally Regarded As Safe by FDA*), su fácil purificación a partir de algas con un mínimo procesamiento y su

## CAPÍTULO 2

disponibilidad en gran escala en el mercado. Son polisacáridos aniónicos lineales ( $pK_a \approx 2-3$ ) que consisten en bloques de ácido D-manurónico y L-gulurónico en el caso de los alginatos (Alg), y principalmente por bloques D-galacturónicos en el caso de las pectinas (Pec). Además, estas últimas, pueden estar metiladas en mayor o menor grado, generándose diferentes propiedades fisicoquímicas. La gelación de estos biopolímeros se logra en presencia de iones polivalentes, como el calcio, por entrecruzamiento entre los grupos carboxílicos, conformándose los típicos modelos estructurales *egg box* (Figura 2.1 – C) o *egg box* modificado para alginatos y pectinas, respectivamente. Debido al bajo  $pK_a$  de estos polímeros, la integridad estructural tiende a perderse a medida que se incrementa el pH debido a la ionización de los grupos funcionales y el incremento de fuerzas repulsivas.[91]

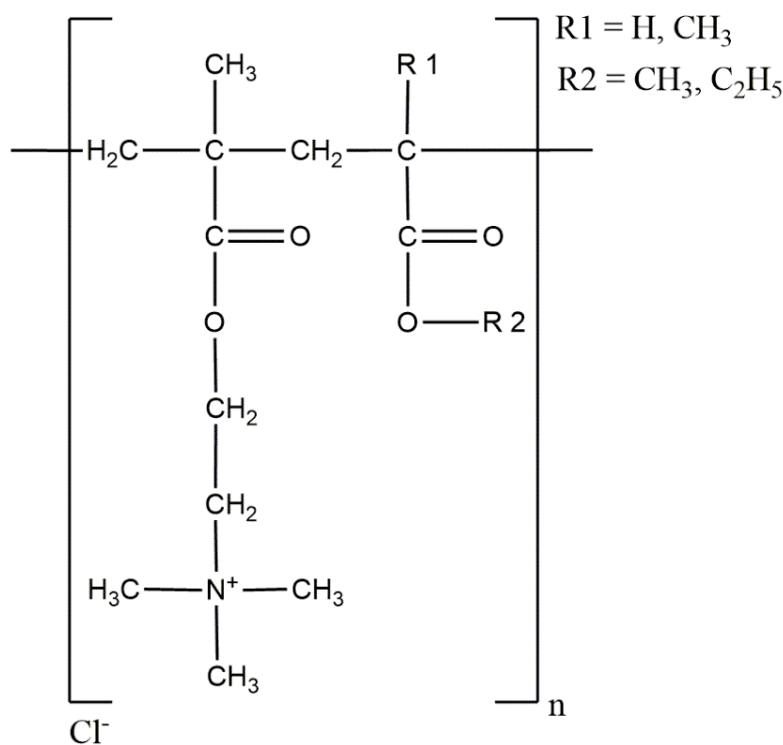


**Figura 2.1** –Estructuras químicas de los polímeros (A) alginato y (B) pectina; y (C) representación genérica del modelo *egg-box* donde las referencias numéricas corresponden a (1) cadena polimérica, (2) grupo carboxílico polimérico y (3) catión divalente.

Uno de los principales problemas de estos biopolímeros es su alta hidrofiliidad, lo que dificulta enormemente la posibilidad de controlar la liberación de los PA encapsulados en su matriz, especialmente en el caso de pequeñas moléculas ionizables.[92] En la literatura, se han explorado el recubrimiento o la combinación con otros polímeros para mejorar los mecanismos de liberación de varias moléculas y las propiedades reológicas de las matrices. Polímeros como quitosano y materiales acrílicos fueron usados con el objetivo de mantener la estructura 3D y demorar el re-hinchamiento de los

## CAPÍTULO 2

hidrogeles.[93–95] Particularmente, los polímeros del tipo Eudragit pueden ser muy buenos candidatos para el diseño de combinaciones o *blends*. Estos son polímeros sintéticos obtenidos por polimerización de los ácidos acrílico, metacrílico y/o sus ésteres. Las propiedades fisicoquímicas dependen de los tipos de monómeros y sus proporciones en el polímero. Entre ellos, el Eudragit RS (EuRS – Figura 2.2) presenta un hinchamiento no dependiente del pH, con aplicaciones en films o microesferas para la liberación prolongada de PA.[91,92] La principal propiedad del EuRS es su reducida permeabilidad a líquidos y su consecuente bajo hinchamiento en diferentes condiciones de pH.[96] Pueden encontrarse en la bibliografía diferentes intentos para el diseño de SLCD (sistemas de liberación controlada de drogas) utilizando mezclas de Eudragit con biopolímeros, tales como recubrimientos, films, micro- y nanopartículas. [92,97–99]



**Figura 2.2** – Estructura química del polímero sintético Eudragit RS.

El re-posicionamiento de antibióticos en el mercado es de gran interés en el mundo debido a la emergencia por resistencia microbiana a los antibióticos, declarada por la Organización Mundial de la Salud. Los principales problemas son el largo tiempo requerido para las investigaciones, la cantidad de dinero a invertir y el intenso labor que se necesitan para producir un nuevo antibiótico. Para poder introducir en el mercado un nuevo ATB se requiere una investigación sobre aproximadamente 10000 moléculas para

## CAPÍTULO 2

lograr que alguna tenga posibilidades de alcanzar el mercado de ventas. Este tipo de desarrollos requiere de 10 a 12 años y una inversión de 2-3 billones de dólares estadounidenses.[100] Por otro lado, muchos antibióticos presentan ciertos problemas como la alta hidrofobicidad que resulta en una baja solubilidad en condiciones fisiológicas, baja biodisponibilidad y bajos niveles plasmáticos con requerimientos de múltiple dosificación. Además, la presencia de estructuras aromáticas en los antibióticos lleva a la interacción molecular por mecanismos  $\pi$ - $\pi$  pudiendo inducir la formación de soluciones coloidales y precipitación de la droga.[101]

El florfenicol (FF) es un antibiótico sintético, de amplio espectro, utilizado en veterinaria para el tratamiento de enfermedades en ganado (bovinos y porcinos), piscicultura y animales de compañía. El FF es levemente soluble en ambientes acuosos (alrededor de  $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ) razón por la cual requiere la utilización de solventes orgánicos tóxicos para la administración por vía endovenosa y la aplicación de múltiples dosis para alcanzar la ventana terapéutica.[68,102,103] Es interesante mencionar que el FF puede cristalizar en dos formas (A y B), las que muestran perfiles de disolución similares.[104] La principal técnica industrial para manufacturar FF es la cristalización por adición de un antisolvente. Para poder determinar el solvente más indicado y optimizar el proceso de cristalización, resulta esencial conocer el comportamiento del principio activo durante el proceso de formulación. La reducción del tamaño de cristal/partícula a rangos nano- y micrométricos ha sido utilizada en la práctica para mejorar la solubilidad y la biodisponibilidad de diferentes moléculas ya que el tamaño de partícula cumple un rol importante en las velocidades de disolución de drogas de baja solubilidad acuosa.[103] También, el FF debe ser aplicado de forma muy minuciosa y establecida debido a que altas concentraciones pueden alterar órganos tales como el hígado, los riñones y los testículos como así también producir efectos inmunosupresores y anémicos, pérdida de peso y depresión de la médula ósea.[105]

Por las razones mencionadas, se ha investigado la encapsulación de FF utilizando nanopartículas de sílica, nanoesferas con impresión molecular y micropartículas biopoliméricas incluidas en ciclodextrinas, entre otros.[51–54] Sin embargo, los principales problemas encontrados en este tipo de sistemas fueron la baja eficiencia de encapsulación y la rápida liberación del PA.

El principal objetivo del presente capítulo es el desarrollo y caracterización de sistemas para la encapsulación de FF en *beads* basadas en los biopolímeros Alg y Pec y en *blends* biopolímero-EuRS para lograr una liberación controlada y sensible al pH.



## CAPÍTULO 2

Se estudian formulaciones con diferentes relaciones FF/polímero, polímero sintético/biopolímero y concentraciones de FF. Se utilizan métodos biofísicos como microscopía óptica y electrónica, FTIR, DSC y XRD para la caracterización de los sistemas esféricos elegidos. Por otro lado, se estudian las cinéticas de liberación de las diferentes formulaciones preparadas. Finalmente, se evalúa la actividad antimicrobiana del FF encapsulado frente a cepas de *E. coli* y *S. aureus* en medios de cultivo líquidos y agarizados.

Los resultados de este capítulo fueron publicados en el *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Karp *et al.*, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54, 2019, doi: 10.1016/j.jddst.2019.101241).



## CAPÍTULO 2

### OBJETIVOS

- Desarrollar partículas esféricas biopoliméricas sensibles a diferentes condiciones de pH, basadas en alginato o pectina, para la encapsulación y liberación controlada *in vitro* de FF.
- Estudiar los efectos de las condiciones de síntesis sobre la eficiencia de encapsulación y la morfología de las matrices biopoliméricas.
- Evaluar las cinéticas de liberación del PA en diferentes condiciones de pH y relacionar los fenómenos observados con las condiciones de síntesis.
- Investigar la posibilidad de utilizar mezclas poliméricas para obtener nuevas cinéticas de liberación en diferentes condiciones de pH.
- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de las formulaciones obtenidas frente a diferentes cepas bacterianas.



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Materiales

Florfenicol (2,2-dicloro-N-[(1R,2S)-3-fluoro-1-hidroxi-1-(4-etilsulfonilfenil) propan-2-yl] acetamida, 99.1%), adquirido en Romikin S.A (Buenos Aires, Argentina). Los biopolímeros alginato y pectina (grado de metilación aproximado de 37%) fueron donados por Monsanto (Buenos Aires, Argentina). El cloruro de calcio di-hidratado se adquirió en Research AG S.A (Buenos Aires, Argentina). El polímero Eudragit<sup>R</sup> RS30D (Industrias Evonik, Alemania) se adquirió en Etilfarma S.A (Buenos Aires, Argentina). *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fueron las cepas usadas en los ensayos microbiológicos. Para todos los experimentos, se utilizó agua ultrapura (Millipore, Ma, USA). Todos los reactivos y solventes fueron de grado analítico y se utilizaron como se recibieron.

### 2. Cuantificación de FF

La cuantificación de FF en todas las soluciones estudiadas se realizó mediante HPLC, técnica ya descrita en el Capítulo 1/Anexo 1.1, utilizando un equipo HPLC (Prominence Serie 20A, Shimadzu) con detección UV por arreglo de diodos (SPD-M20Avp), equipado con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm; 5 µm), bombas LC-20AT y un horno CTO-10Asvp. La temperatura de columna y la longitud de onda de detección se establecieron en 35°C y 224 nm, respectivamente. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol:agua (50:50 v v<sup>-1</sup>) pH 2.5, con un caudal de 0.75 mL min<sup>-1</sup>. Se realizó una curva de calibrado para FF en fase móvil en el rango de 10-100 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.998).

### 3. Preparación de beads FF/Alginato, FF/Pectina y FF/Alginato-EuRS

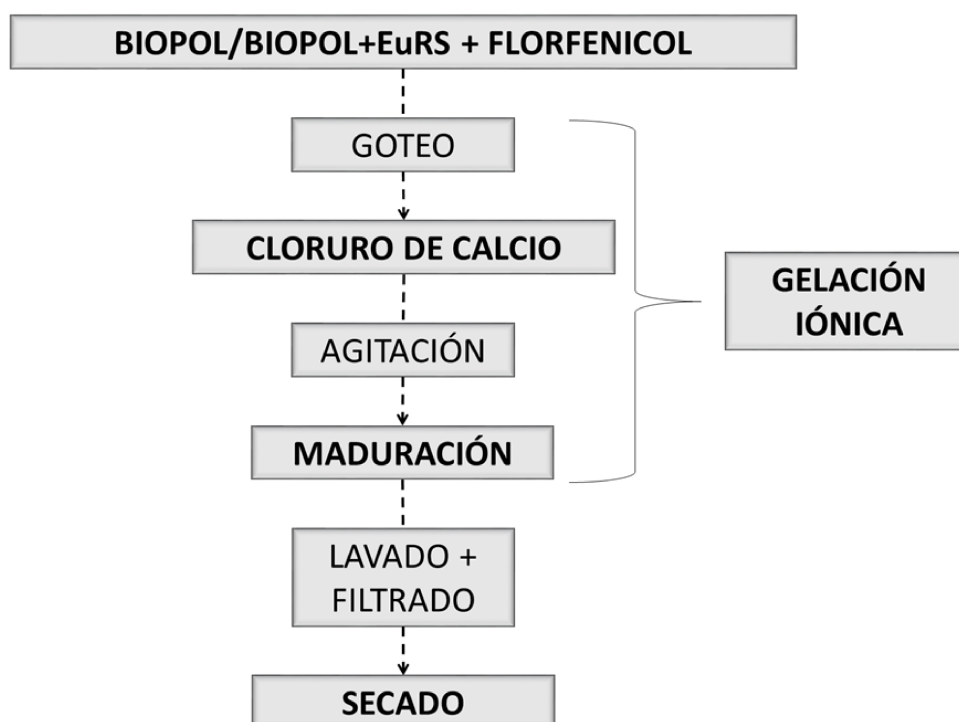
#### a. FF/Alginato – FF/Pectina

El efecto del pH en la encapsulación de la droga en las esferas se evaluó disolviendo de 800 a 3900 µg mL<sup>-1</sup> de FF en 10 mL de buffer fosfato 20 mM (pH= 7.4) o buffer acetato 20 mM (pH 4.0) conteniendo (2.0% p v<sup>-1</sup>) de biopolímero y agitado durante toda la noche. Luego, las soluciones de FF/biopolímero se gotearon en una solución 500 mM de CaCl<sub>2</sub>, en baño de hielo y con agitación magnética suave, durante 5 a 20 minutos. Las *beads* resultantes se filtraron, se secaron a 37°C durante 24 h y se almacenaron a 4°C hasta análisis posteriores. Las soluciones filtradas fueron mantenidas a 4°C hasta la cuantificación de FF no encapsulado.

b. FF/Alginato-EuRS

Se prepararon soluciones conteniendo  $1300 \mu\text{g mL}^{-1}$  de FF, 2.0% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de Alg y 5-15% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de Eudragit RS que se gotearon en una solución 500 mM de  $\text{CaCl}_2$ , en baño de hielo y con agitación magnética suave, durante 10 minutos. Las esferas resultantes y las soluciones filtradas fueron tratadas como se mencionó previamente.

La Figura 2.3 muestra un esquema del procedimiento de la síntesis de las esferas biopoliméricas y *blend*.



**Figura 2.3** – Esquema del procedimiento de síntesis de las esferas poliméricas a partir de las diferentes formulaciones estudiadas.

## CAPÍTULO 2

### 4. Eficiencia de encapsulación

Con el objeto de evaluar la eficiencia de encapsulación (*EE*), las soluciones filtradas obtenidas durante la síntesis de esferas fueron analizadas por HPLC utilizando la metodología mencionada anteriormente. Se cuantificó la masa de FF no encapsulado (*mFFne*) y la *EE* se calculó, de forma indirecta y similar a la indicada en el Capítulo 1, según la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{mFFi (g) - mFFne (g)}{mFFi (g)} \times 100$$

donde *mFFi* es la masa de florfenicol pesada al inicio de la síntesis.

### 5. Caracterización estructural y morfológica

El diámetro promedio de las esferas se obtuvo utilizando un microscopio DM2500M (Leica) con una cámara DFC290HD (Leica) acoplada. Las imágenes se analizaron utilizando el software ImageJ (1.40g, *National Institutes of Health*).

El análisis morfológico se realizó mediante SEM (microscopía electrónica de barrido) con un microscopio modelo Philips SEM 505 (Rochester, USA) y un programa digitalizador de imágenes (*Soft Imaging System ADDA II*). Con el propósito de comparar las superficies y las morfologías internas, las *beads* se congelaron, se cortaron transversalmente y se recubrieron con una capa de oro de 15-20 nm de espesor usando un metalizador Balzers SCD 030. Las imágenes obtenidas se analizaron utilizando el software ImageJ (1.40g, *National Institutes of Health*).

### 6. Estudio de interacciones fisicoquímicas

#### a. Difracción de Rayos-X

Con el objeto de conocer el estado físico de los componentes en las diferentes formulaciones, las muestras (0.1-0.2 g) se comprimieron y analizaron utilizando un difractor de rayos X *Empyrean Panalytical*. Se incidió la radiación filtrada sobre la muestra a 40 kW y 45 mA, en el rango de 5-40°, a una velocidad de 1 grado min<sup>-1</sup>.

#### b. FTIR (Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier)

Para este ensayo, las muestras (3-4 mg) se mezclaron y comprimieron junto con bromuro de potasio para obtener discos homogéneos. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-8001 PC (Shimadzu) y se estudiaron las señales en un rango de 4000-400 cm<sup>-1</sup>.

## CAPÍTULO 2

### c. DSC (Calorimetría diferencial de barrido)

Los termogramas se obtuvieron utilizando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q2000 (TA Instruments, Tx, USA). En cápsulas de aluminio herméticamente cerradas se colocaron las muestras (4-5 mg) y se calentaron a una velocidad de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , bajo atmósfera de nitrógeno (flujo de  $50\text{ mL min}^{-1}$ ). El flujo de calor se midió en un rango de temperatura de  $0\text{-}300^{\circ}\text{C}$ .

### 7. Estudios de perfiles de liberación

Para evaluar la existencia de un control, sensible al pH, sobre la liberación del antibiótico desde las esferas biopoliméricas, una masa equivalente a  $200\text{ }\mu\text{g}$  de FF se puso en contacto con  $5\text{ mL}$  de medio Clark & Lubs  $25\text{ mM}$  pH 1.2 (simula pH gástrico) y con  $5\text{ mL}$  de medio TRIS  $10\text{ mM}$  pH 7.4 (simula pH intestinal sin fosfatos), de forma independiente. Además, se realizó un estudio de liberación en buffer fosfato  $0.01\text{M}$  pH 7.4 (medio quelante de iones  $\text{Ca}^{+2}$ ). Todos los ensayos se realizaron a  $37^{\circ}\text{C}$  y en agitación orbital a  $100\text{ rpm}$ . Luego de  $15, 30, 60, 90$  y  $120\text{ min}$  de iniciado el ensayo, se tomó  $1\text{ mL}$  de medio, con reposición de medio fresco, y se cuantificó la masa acumulada de antibiótico liberado utilizando la técnica mencionada anteriormente.

### 8. Modelado matemático

Las cinéticas de liberación de FF fueron modeladas con ecuaciones del tipo orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.[23,25] La congruencia entre los datos y los modelos fueron aceptadas como adecuadas cuando  $R^2 > 0.9$ .

### 9. Estudios microbiológicos

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sistemas desarrollados se llevaron a cabo estudios de antibiogramas en placa y de inhibición en medio líquido.

Para los estudios realizados en placa, se sembraron cultivos de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (DO = 0.5) en medio Mueller Hinton agarizado en placas de Petri. Luego se colocaron esferas de las diferentes formulaciones de interés sobre la superficie y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  (metodología de difusión desde discos modificada). Al cabo de  $24\text{ h}$  se midieron los halos de inhibición utilizando el software informático ImageJ 1.40g (National Institutes of Health).

En el caso de los ensayos de inhibición en medio líquido, los inóculos se obtuvieron tras cultivar las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 6538 en caldo nutritivo, a  $37^{\circ}\text{C}$



## CAPÍTULO 2

y 100 rpm durante 12 h. Luego, se agregaron 0.750 mL de inóculo a 30 mL de caldo nutritivo fresco y se incubaron a 37°C y 100 rpm hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (2-3 h). Finalmente, se agregó una solución acuosa del fármaco o una masa de esferas formuladas (manteniendo la equivalencia en cantidad de principio activo). Desde 1 hasta 8 h, y cada 30 min, se colocaron 0.150 mL de medio en una microplaca para realizar la medición de densidad óptica a 600 nm. Se realizaron controles de crecimiento bacteriano sin formulaciones. Los ensayos se realizaron por triplicado.

### 10. Análisis estadístico de los resultados

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las comparaciones estadísticas entre medias se realizaron mediante un test ANOVA. Una probabilidad  $p < 0.05$  fue considerada como significativa.



**RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Se estudió la síntesis de esferas y la encapsulación de 800, 1300 (aproximadamente la solubilidad acuosa del FF) y 3900  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de FF en 2.0% a 4.0% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de biopolímero. No se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $p \geq 0.05$ ) en la EE de FF entre las diferentes muestras. La relajación de las cadenas poliméricas en hidrogeles biopoliméricos se reportó aproximadamente independiente de la concentración del polímero.[106] Basados en estas consideraciones, se estableció la concentración de 2.0% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de biopolímero para los siguientes ensayos.

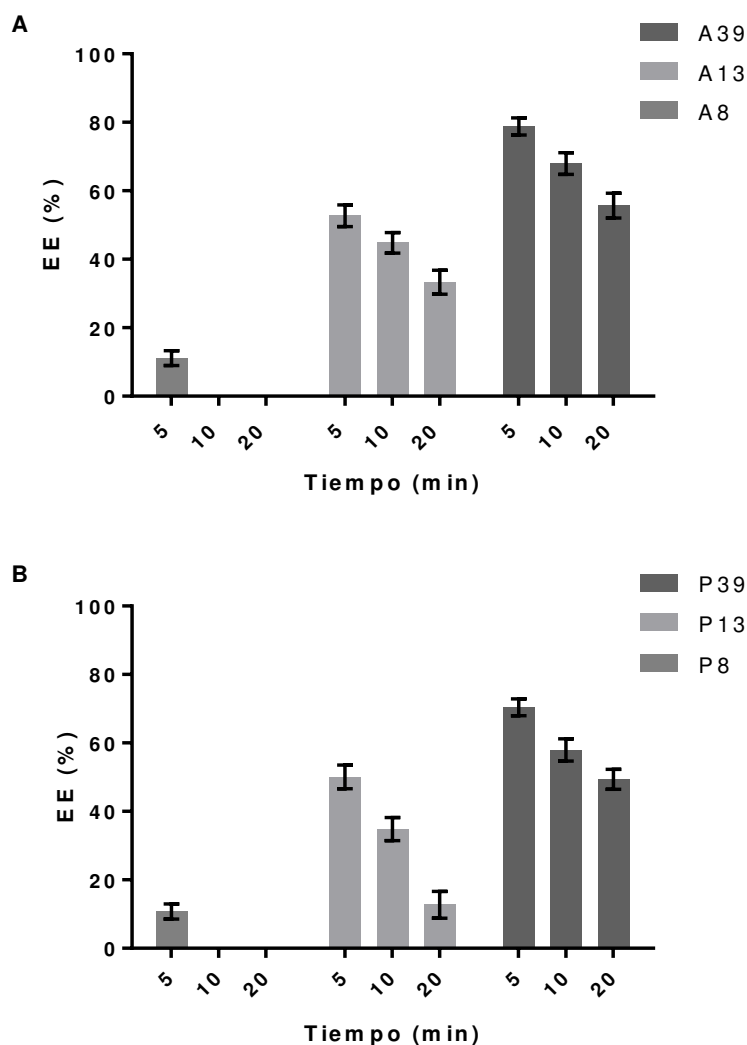
Por otro lado, se analizó la síntesis de esferas y la EE de FF a pH 4.0 y 7.4. La EE de FF en 2.0% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de Alg fue de  $43.0 \pm 4.3\%$  y de  $49.6 \pm 3.0\%$  a pH 4.0 y 7.4, respectivamente. Por otro lado, la EE de FF en 2.0% ( $\text{p v}^{-1}$ ) de Pec fue de  $59.0 \pm 4.3\%$  y de  $56.5 \pm 3.0\%$  a pH 4.0 y 7.4, respectivamente. Ya que no se encontraron diferencias significativas entre las dos condiciones estudiadas ( $p \geq 0.05$ ), el buffer fosfato a pH 7.4 fue elegido como diluyente de los biopolímeros y el antibiótico para los siguientes experimentos. Además, el FF presenta una mayor estabilidad a pH 7.4 en comparación con condiciones ácidas y los buffer fosfato, con un pH cercano a la neutralidad, aportan generalmente condiciones más compatibles con los medios biológicos.[107]

En la Figura 2.4, puede analizarse el efecto de la concentración inicial de FF y el tiempo de maduración de las esferas en  $\text{CaCl}_2$  0.5 M sobre la EE del ATB. Al incrementar la concentración de FF se obtienen EE mayores en las esferas biopoliméricas, tanto de Alg como Pec, fenómeno que podría ser atribuido al efecto de apilamiento  $\pi - \pi$  mencionado previamente.[101] La baja solubilidad acuosa del FF puede producir la precipitación del PA dentro de las esferas cuando se lo utiliza en altas concentraciones, incrementando la EE.[48]

En cuanto al efecto del tiempo de maduración de las esferas, por ejemplo, para la formulación A13, utilizar 20 min de maduración permite obtener una EE de  $33.3 \pm 3.5\%$  mientras que utilizar 5 min logra una EE de  $52.7 \pm 3.2\%$ . Este comportamiento puede observarse en todas las formulaciones estudiadas y puede asociarse a la difusión del FF debido a su bajo peso molecular y a la ausencia de interacciones con la matriz polimérica. Estos resultados resultan congruentes con otros reportados, donde la presencia de biopolímeros que puedan establecer interacciones con los principios activos juega un papel crucial en la retención de los mismos en la matriz, afectando las EE y las cinéticas de liberación.[89,90] El diámetro de poro de esferas de calcio-alginato o calcio-pectina suele estar en el rango de 16.6 nm a 76.8 nm, mientras que el volumen molecular del FF,

## CAPÍTULO 2

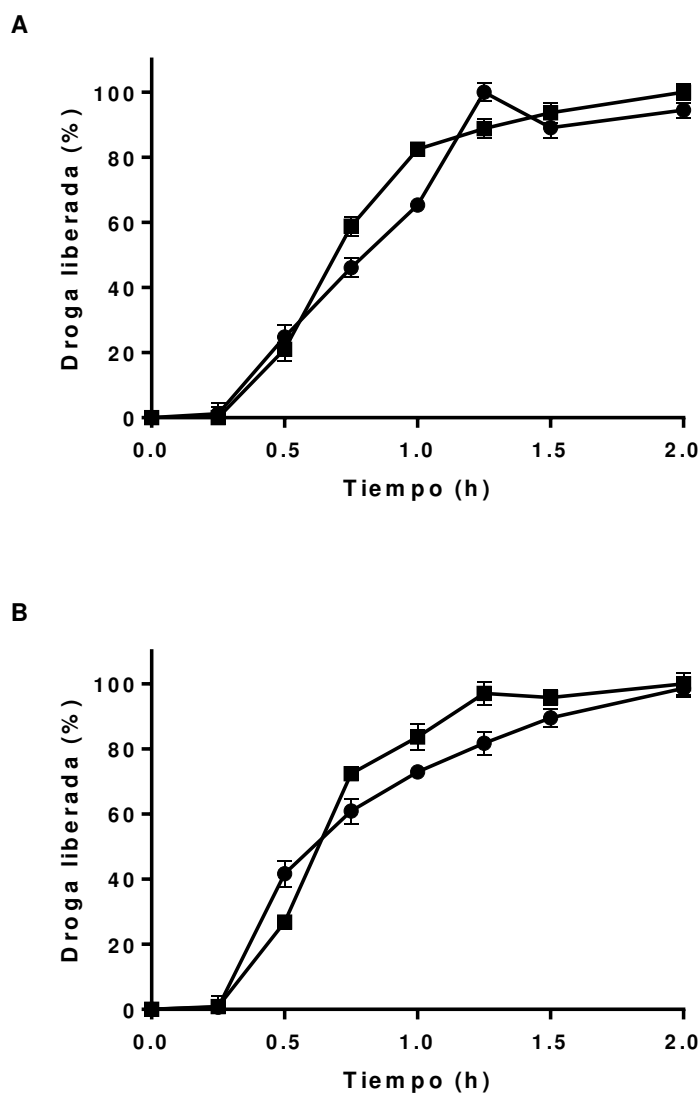
considerado como una esfera, es de aproximadamente  $0.41 \text{ nm}^3$ , lo que es al menos más de diez mil veces más pequeños que el diámetro de poro mencionado. Esto indica fuertemente que el FF difunde libremente a través de la matriz en ausencia de interacciones y en mayor cantidad al aumentar el tiempo de maduración de las esferas.[108]



**Figura 2.4** - Eficiencias de encapsulación para diferentes concentraciones iniciales de FF (3900, 1300 y  $800 \text{ mg L}^{-1}$ ) y diferentes tiempos de maduración (5, 10 y 20 min) para *beads* sintetizadas con (A) alginato y (B) pectina al  $2\% \text{ p v}^{-1}$ .

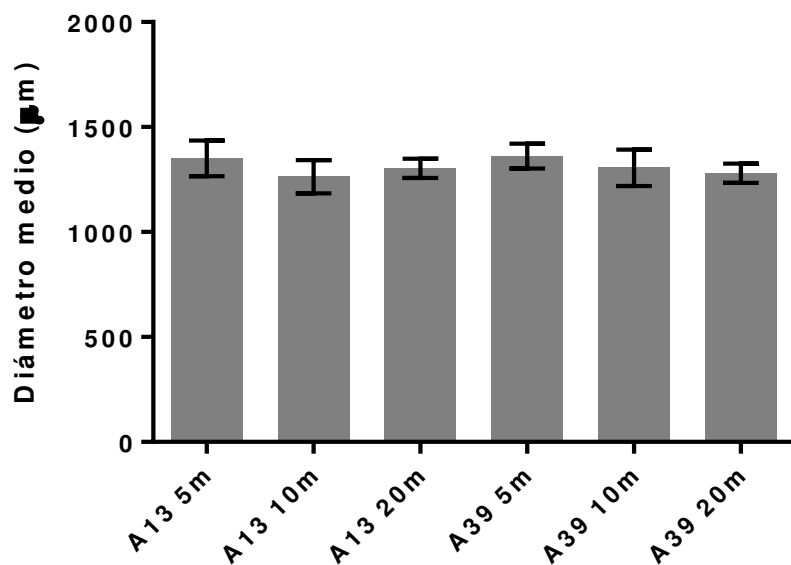
La Figura 2.5 muestra los resultados para los ensayos de liberación *in vitro* de FF, desde las formulaciones preparadas con pectina. Como puede observarse, no habría diferencias importantes entre los perfiles de liberación del principio activo en diferentes condiciones de pH. Debido a esto, las formulaciones basadas en pectina se descartaron para los análisis posteriores.

## CAPÍTULO 2

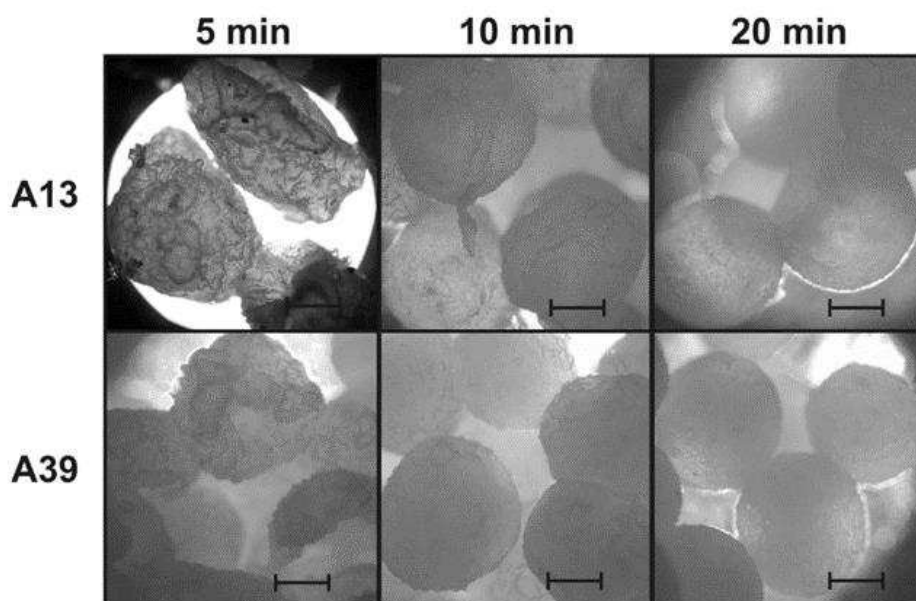


**Figura 2.5** - Perfiles de liberación de FF obtenidos para las formulaciones de pectina al 2% (p v<sup>-1</sup>) con 1300 (■) y 3900 (●) mg L<sup>-1</sup> de FF y 10 min de maduración, en (A) buffer Clark & Lubs pH 1.2 y (B) buffer TRIS pH 7.4.

Continuando con los análisis sobre las formulaciones basadas en alginato, es interesante notar que, a pesar de las diferentes cantidades de FF encapsulado en las esferas, no existen diferencias significativas ( $p \geq 0.05$ ) en el tamaño de las *beads*, con un diámetro promedio de 1200  $\mu\text{m}$  (Figura 2.6) y con una esfericidad incrementada a medida que se aumenta el tiempo de maduración (Figura 2.7). Basado en los resultados obtenidos, las formulaciones A13 y A39, con 10 min de maduración, fueron seleccionadas para los siguientes estudios.



**Figura 2.6** - Diámetros medios de esferas con diferentes concentraciones iniciales de FF (A13, 1300 mg L<sup>-1</sup>; A39, 3900 mg L<sup>-1</sup>) y diferentes tiempos de maduración (5, 10 y 20 min).



**Figura 2.7** - Microfotografías de *beads* formuladas con alginato utilizando diferentes concentraciones iniciales de FF (A13, 1300 mg L<sup>-1</sup> y A39, 3900 mg L<sup>-1</sup>) y diferentes tiempos de maduración (5, 10 y 20 min). Barra de escala = 500 µm.

Los perfiles de liberación de FF desde las formulaciones A13 y A39, a pH 1.2 y 7.4, se muestran en la Figura 2.8. Todos los perfiles mostraron una demora al inicio de la liberación posiblemente debida a los tiempos requeridos para la hidratación de las esferas de Alg. Además, se observó un hinchamiento y una desestructuración total de las esferas,

## CAPÍTULO 2

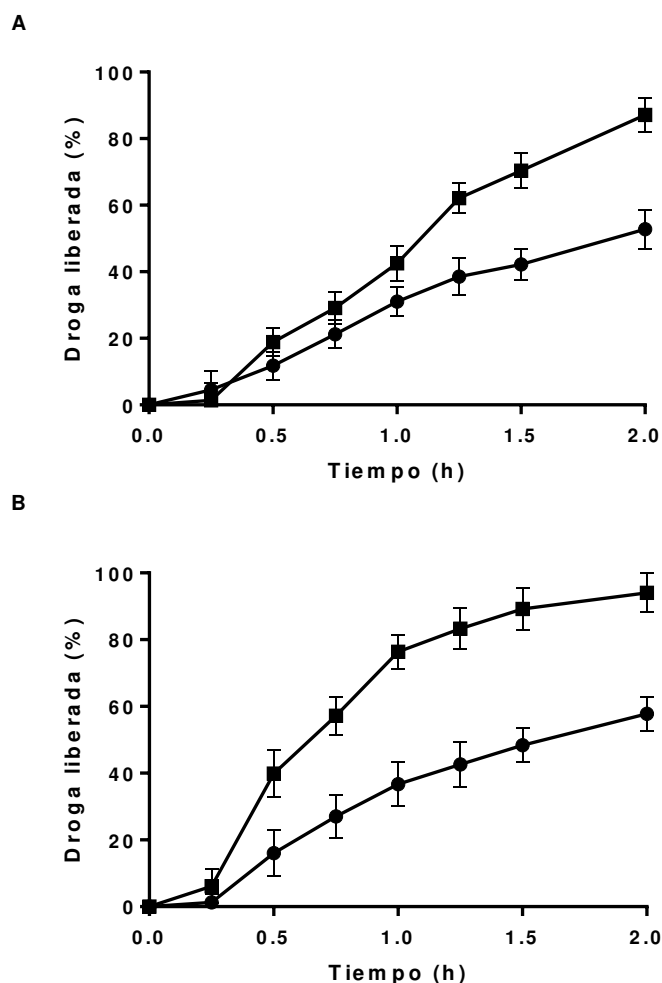
en todas las concentraciones de FF estudiadas, en buffer fosfato pH 7.4 (no se muestran los resultados). Este hinchamiento demoró menos de 5 minutos y puede explicarse por la presencia de grupos fosfato quelantes de iones calcio, capaces de desestabilizar la red polimérica.

Para los perfiles de la Figura 2.8, la velocidad de liberación de FF resultó inversamente proporcional a la concentración de PA cuando éste se aumentó de 29.0 (A13) a 132.5 (A39) mg por gramo de Alg. Basados en la solubilidad del FF en medios acuosos ( $1300 \text{ mg L}^{-1}$ ), es posible considerar que la formulación A39 puede tener mayor proporción de droga precipitada dentro de las esferas, retardando la liberación del principio activo. En otras palabras, la droga precipitada debe disolverse previamente para luego difundir a través de la matriz de Alg.[109]

Si se realiza una simple inspección visual, la liberación de FF presenta un perfil del tipo lineal a pH ácido y uno hiperbólico a pH 7.4. El aumento de pH (ej. fisiológico) causa la ionización de los grupos gulurónicos del Alg ( $\text{pK}_a = 2-3$ ) generando iones guluronatos. La presencia de estos últimos aumenta la relajación de las cadenas poliméricas debido al aumento de las fuerzas repulsivas, aumentando la flexibilidad del polímero e incrementando el tamaño de los poros.[110] Como consecuencia de estos fenómenos, la liberación de FF se verá factiblemente aumentada por el aumento del pH.

Los perfiles de liberación de FF desde la formulación A39 a pH 1.2 y 7.4 (Tris-HCl) fueron similares, mostrando un comportamiento independiente del pH, posiblemente debido a que la disolución de los cristales de FF sería el paso limitante/fenómeno predominante en el control de la liberación del PA. Por otro lado, la formulación A13 mostró un comportamiento dependiente del valor de pH para la liberación de FF. Más del 60% del PA fue liberado cuando se aumentó el pH del medio de liberación, luego de 1 h de iniciado el ensayo. Debido al comportamiento pH-dependiente observado, la formulación A13 fue seleccionada para los posteriores ensayos. Ya que más del 90% del FF fue liberado en menos de 2 h, se propuso utilizar mezclas poliméricas para obtener una liberación de FF más controlada.[111]

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.8** – Perfiles de liberación de FF obtenidos para las formulaciones A13 (■) y A39 (●), con 10 min de maduración, en (A) buffer Clark & Lubs pH 1.2 y (B) buffer TRIS pH 7.4.

El polímero hidrofóbico Eudragit<sup>R</sup> RS (EuRS) resulta ser un buen candidato para preparar mezclas con Alg debido a sus propiedades fisicoquímicas: baja hidratación, grupos aminos polares capaces de interactuar con los residuos carboxilatos de los manuronatos y guluronatos del Alg, y los grupos éster polarizables capaces de establecer puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos del Alg. Además, el EuRS podría interactuar con el FF reduciendo el efecto de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  de la droga.

La composición, EE y tamaños promedio obtenidos para las formulaciones basadas en Alg y en la mezcla EuRS-Alg, se muestran en la Tabla 2.1. Como puede observarse, se produjo un incremento medio del 50% en el diámetro de las esferas, atribuible a las interacciones entre el Alg y el EuRS y a las diferencias en sus afinidades acuosas, con la consecuente distorsión del modelo compacto *egg-box* y el efecto sobre la estructura interna de las esferas.[91]



## CAPÍTULO 2

Un análisis comparativo permite apreciar que el *blend* con 5% (p v<sup>-1</sup>) de EuRS logró EE menores que las *beads* de Alg. Mientras que con las formulaciones con 15% o 20% de EuRS se obtuvieron EE similares o mayores que solamente con Alg, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados previamente para la encapsulación de felodipina en mezclas Alg-EuRS.[91] La felodipina, un bloqueador de canales de calcio, presenta similares características fisicoquímicas que el FF. La baja EE obtenida para la mezcla con 5% de EuRS puede ser entendida si se tiene en cuenta la distorsión en la estructura *egg-box*, que podría generar una matriz polimérica más laxa y permitiría la captación acuosa con la consecuente difusión de la droga al medio. No obstante, cuando la proporción de EuRS aumenta, este polímero podría crear una barrera física que dificulta el ingreso del agua circundante además de interactuar con el FF, evitando su difusión fuera de la matriz mezcla.

**Tabla 2.1** – Resultados de tamaños de *beads* y eficiencias de encapsulación obtenidos para las diferentes formulaciones obtenidas a pH 7.4 y con 10 min de maduración. Las formulaciones cuyo ID comienzan con A y AEu corresponden a alginato y mezclas Alg-Eudragit, respectivamente.

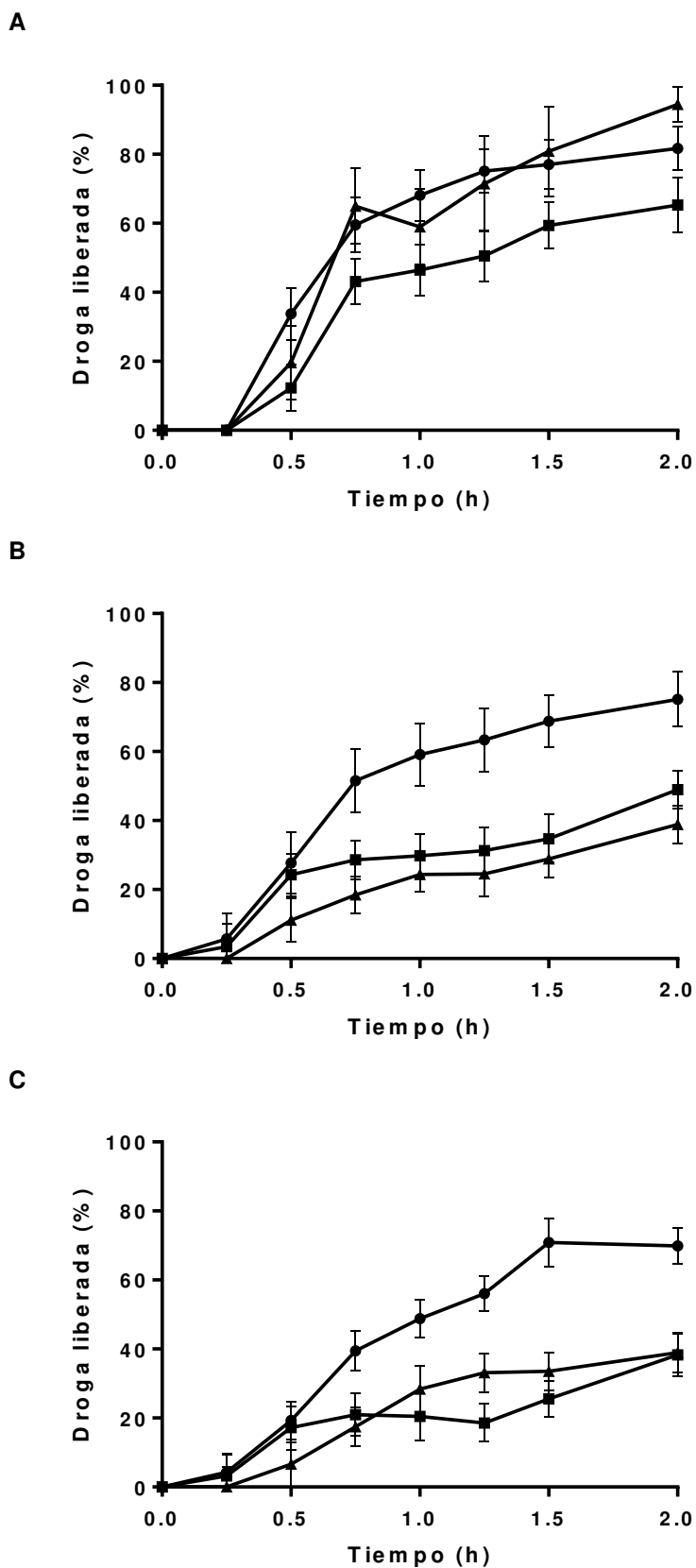
ID Formulación	Concentración de biopolímero (% p v <sup>-1</sup> )	Concentración inicial de FF (µg mL <sup>-1</sup> )	Concentración de EudragitRS (% p v <sup>-1</sup> )	Eficiencia de encapsulación (%)	Tamaño promedio (mm)
A8	2	800	-	-	1.35 ± 0.08
A13	2	1300	-	44.82 ± 3.00	1.26 ± 0.08
A39	2	3900	-	67.97 ± 3.15	1.30 ± 0.09
AEu5	2	1300	5	21.91 ± 3.53	1.46 ± 0.06
AEu15	2	1300	15	47.77 ± 2.15	2.34 ± 0.12
AEu20	2	1300	20	55.87 ± 3.60	2.41 ± 0.09

La Figura 2.9 muestra las liberaciones de FF desde las distintas matrices *blend*, preparadas con diferentes proporciones de EuRS y utilizando como base la formulación A13. En el caso del medio ácido, se liberó de 45% a 75% en 1 h y de 60% a 90% en 2 h,

## CAPÍTULO 2

dependiendo del contenido de EuRS (Figura 2.9 – A). Sin embargo, la liberación de FF desde las matrices mezclas tanto en Tris-HCl como en buffer fosfato, ambos con un pH de 7.4, resultó ser más lenta en los casos con 15 y 20% de EuRS, liberándose alrededor de un 40-45% a las 2 h de iniciado el ensayo (Figura 2.9 – B,C). Al comparar estos resultados con las esferas de Alg, se puede observar que se ha invertido el comportamiento de liberación para diferentes condiciones de pH. Otro resultado interesante, fue la capacidad de las formulaciones para resistir el efecto quelante de los iones fosfato sobre los iones calcio (Figura 2.9 – C). A diferencia de las esferas de Alg, la estructura de las matrices poliméricas fue conservada, lográndose una liberación controlada de FF. En trabajos previos se reportó la encapsulación de teofilina en matrices de pectina-quitosán-EuRS con similares resultados. Teniendo en cuenta las similitudes en las propiedades fisicoquímicas entre el FF y la teofilina, los resultados son comparables.[92]

## CAPÍTULO 2



**Figura 2.9** – Perfiles de liberación de FF desde las diferentes formulaciones con distintas proporciones de EuRS en (A) buffer Clark & Lubs pH 1.2, (B) buffer TRIS pH 7.4 y (C) buffer fosfato pH 7.4.  
 AEu5 (●), AEu15 (■), AEu20(▲).

## CAPÍTULO 2

La Tabla 2.2 muestra los resultados para los diferentes modelos matemáticos aplicados a los perfiles de liberación obtenidos en las distintas condiciones buffer y de pH. Los resultados muestran que la mayoría de las curvas siguen un modelo de primer orden. Esto indicaría que la evolución de la concentración de la droga a través del tiempo está relacionada con la disolución de partículas de principio activo debido a la interacción superficial con un medio líquido.[26] No obstante, la formulación AEu15 presentó el mejor ajuste con el modelo Korsmeyer-Peppas, con el parámetro  $n > 0.5$ , indicando una posible difusión no-Fickiana (transporte anómalo), donde la liberación de FF depende de procesos de relajación polimérica y difusión combinados.

**Tabla 2.2** - Modelos matemáticos con mejor ajuste para las diferentes cinéticas de liberación estudiadas.

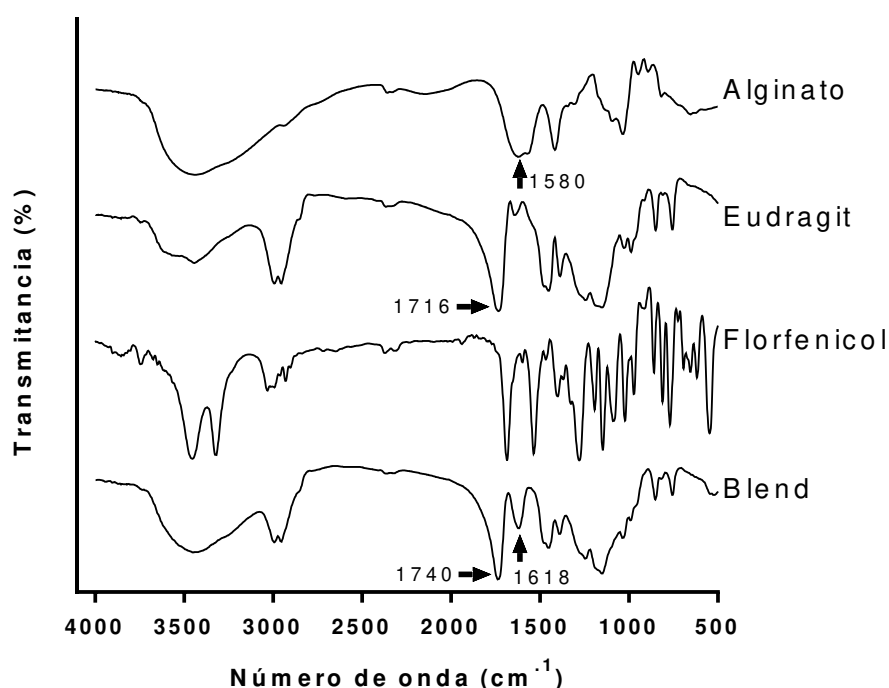
<b>ID</b> <b>Formulación</b>	<b>Buffer*1</b>	<b>Modelo con mejor ajuste</b>	<b>Ecuación*3</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
A13	Clark&Lubs 1.2	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.66 \times t(h)}) - 1)$	0.95
A13	TRIS 7.4	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{1.19 \times t(h)}) - 1)$	0.96
A39	Clark&Lubs 1.2	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.36 \times t(h)}) - 1)$	0.98
A39	TRIS 7.4	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.43 \times t(h)}) - 1)$	0.98
AEu5	Clark&Lubs 1.2	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.98 \times t(h)}) - 1)$	0.94
AEu5	TRIS 7.4	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.78 \times t(h)}) - 1)$	0.98
AEu5	Fosfato 7.4	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.64 \times t(h)}) - 1)$	0.96
AEu15	Clark&Lubs 1.2	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.56 \times t(h)}) - 1)$	0.93
AEu15	TRIS 7.4	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.32 \times t(h)}) - 1)$	0.92
AEu15	Fosfato 7.4	Korsm-Peppas*2	$DL (\%) = 0.28 \times (t(h)^{0.83})$	0.96

\*1 tipo de buffer y valor de pH; \*2 modelo Korsmeyer-Peppas; \*3 DL (%) = Droga liberada

La Figura 2.10 muestra los espectros obtenidos, por FTIR, para la formulación mezcla AEu15 y los diferentes componentes puros. Las bandas de FF no se observan posiblemente debido a la baja cantidad relativa de droga presente en la formulación. Además, la presencia de FF sólido puede interferir en su detección mediante la presente técnica.[89] El espectro de Alg muestra la característica banda asimétrica R-COO<sup>-</sup> (1600

## CAPÍTULO 2

$\text{cm}^{-1}$ ) que también puede observarse en la formulación. La señal del grupo carbonilo a  $1716 \text{ cm}^{-1}$ , representativo del EuRS, fue detectada también en el espectro de AEu15. Sin embargo, se observaron cambios en las posiciones de los picos en el espectro de la formulación *blend*. Las bandas características de Alginato y EuRS mostraron un leve corrimiento hacia  $1618$  y  $1740 \text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Este resultado podría indicar la presencia de interacciones débiles entre los polímeros, confirmando la naturaleza *blend* de la matriz que podría explicar los cambios observados en las *beads* cuando el EuRS es introducido.

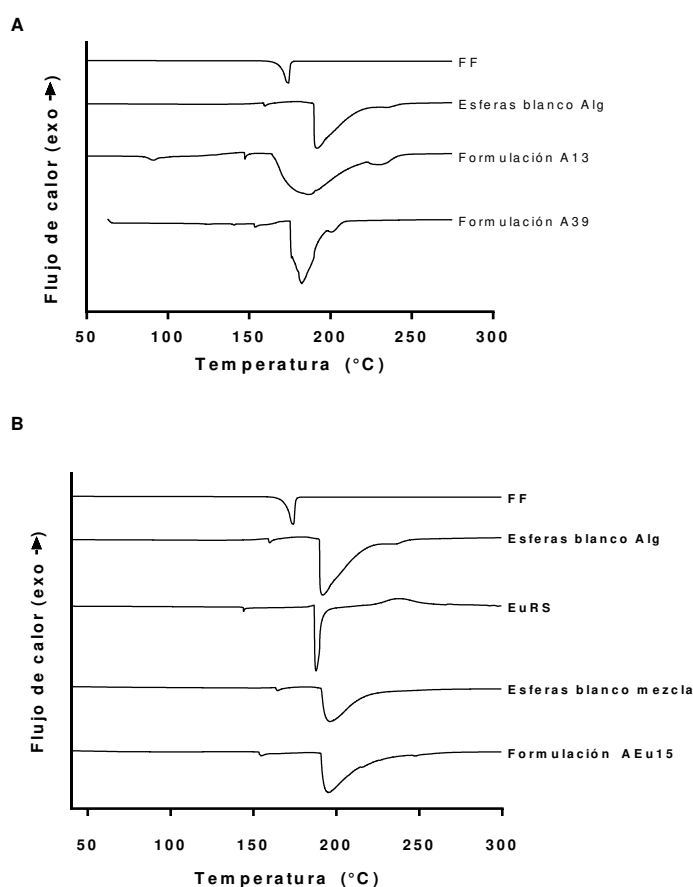


**Figura 2.10** - Espectros de FTIR para la formulación AEu15 (*blend*) y los diferentes componentes puros (las flechas indican las bandas representativas).

La Figura 2.11 muestra los resultados de DSC obtenidos para las diferentes formulaciones estudiadas. En la Figura 2.11-A, el pico endotérmico característico de la fusión de FF puede ser observado a  $160^\circ\text{C}$ , aproximadamente.[112,113] Además, se puede observar el pico de descomposición del Alg a  $190^\circ\text{C}$ .[113] Las diferencias observadas entre las esferas blanco y formuladas pueden ser atribuidas al solapamiento con el pico de fusión de FF. También, el ensanchamiento que puede apreciarse para la formulación A13, puede ser explicado por una mayor dispersión del FF en la matriz polimérica debido a una menor solidificación del mismo. Por otro lado, la curva de la formulación A39 mostró un pico de descomposición de Alg más estrecho y la presencia del pico de fusión de FF. Este

## CAPÍTULO 2

resultado puede deberse a una mayor proporción de cristales de FF. La Figura 2.11-B muestra los estudios por DSC para las formulaciones *blend*. Los picos observados para las mezclas poliméricas se posicionan alrededor de 195°C mientras que el pico de descomposición de Alg se encuentra cercano a los 192°C. Los cambios percibidos pueden atribuirse a las débiles interacciones entre Alg y EuRS, en concordancia con resultados previos mencionados. Además, es importante destacar que no se observan picos de fusión de FF lo que sugiere una disminución en la presencia de cristales de FF debido a la presencia del EuRS.[113]

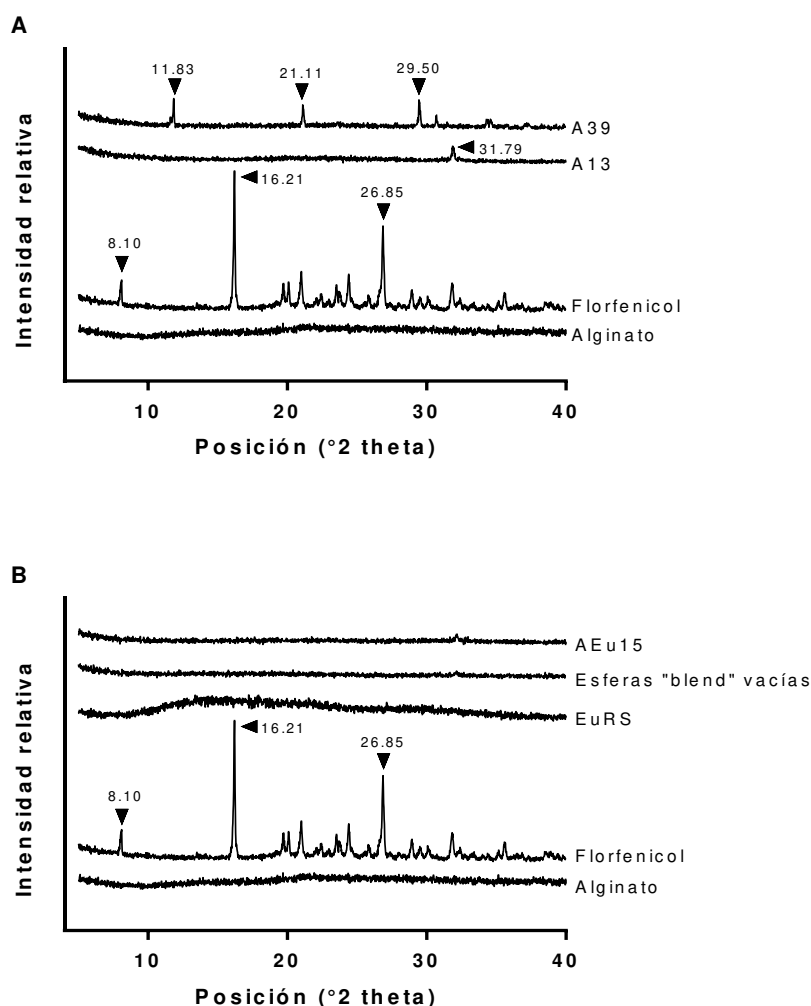


**Figura 2.11** – Resultados obtenidos por DSC para (A) *beads* de Alg y (B) *beads* de Alg-EuRS. Se incluyen los estudios para los componentes puros.

La Figura 2.12 muestra los resultados obtenidos para los estudios de difracción de rayos X. La Figura 2.12– A muestra los difractogramas para los componentes de las esferas de Alg puro. FF mostró tres picos característicos posicionados a 8.10, 16.21 y 26.85°.[112] Por otro lado, debido a sus marcadas características amorfas, no se observaron picos en los resultados para Alg. La formulación A39 mostró una mayor cantidad de picos (11.83,

## CAPÍTULO 2

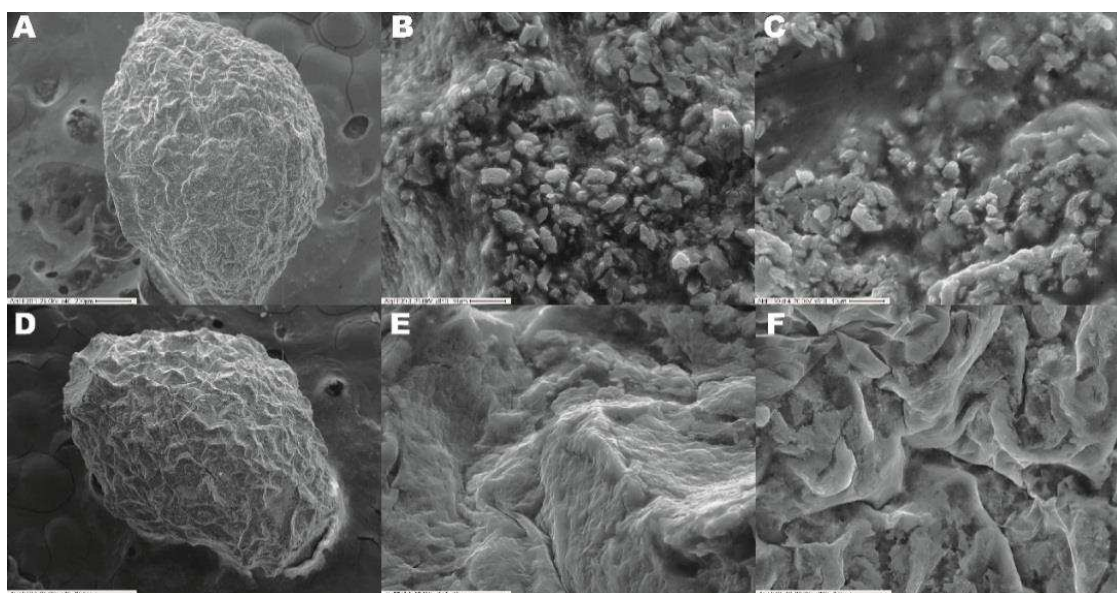
21,11 y 29.50°) en comparación con A13 (31.79°), indicando una mayor presencia de cristales de FF en la primera. Este resultado concuerda con la liberación retardada de FF desde las *beads* de la formulación A39. Es interesante destacar que el FF presenta dos polimorfismos, A y B, cuando ocurren los procesos de cristalización. El FF utilizado en el presente trabajo es, posiblemente, una mezcla de ambos.[112] Sin embargo, la formulación A39 muestra un patrón de cristalización nuevo cuando se realiza la síntesis de *beads*, posiblemente debido a la presencia de Alg. Por otro lado, no se observaron cristales de FF en las formulaciones con Alg-EuRS (Figura 2.12- B), apoyando la idea de que el control de la liberación de FF está asociado principalmente a las propiedades de las matrices mezcla.



**Figura 2.12** - Difractogramas obtenidos por difracción de RX para esferas formuladas con (A) Alg y (B) Alg-EuRS. Se incluyen los estudios para los componentes puros.

## CAPÍTULO 2

En la Figura 2.13 pueden observarse las imágenes de SEM para las formulaciones A39 y A13. Se puede apreciar una morfología esférica distorsionada y cierto grado de rugosidad en ambas formulaciones. Sin embargo, solamente la formulación A39 presenta presencia identificable de “nano-cristales” de FF, en concordancia con los resultados presentados previamente. Además, las estructuras en forma de placa de los cristales indicarían que se encuentra una mayor proporción de la forma A de los posibles polimorfismos de FF.[112] La Figura 2.14 muestra las imágenes de SEM obtenidas para las formulaciones AEu5 y AEu15. La forma esférica fue mejorada con respecto a las matrices sin EuRS. Además, en un análisis sobre variación de intensidades de grises sobre la superficie se pudo observar una menor desviación estándar en esferas de la formulación AEu15, indicando superficies menos rugosas (Tabla 2.3).[89] Esta característica puede estar asociada a una liberación de FF más controlada, tal como se observó en los diferentes estudios realizados. La mejora lograda en la matriz y el consecuente control sobre la liberación de FF representa una ventaja sobre formulaciones basadas únicamente en biopolímeros como alginato-alginato o alginato-pectina, donde la elevada porosidad e hidrofiliicidad de la matriz induce una rápida y descontrolada liberación de moléculas de bajo peso molecular.[111,114]

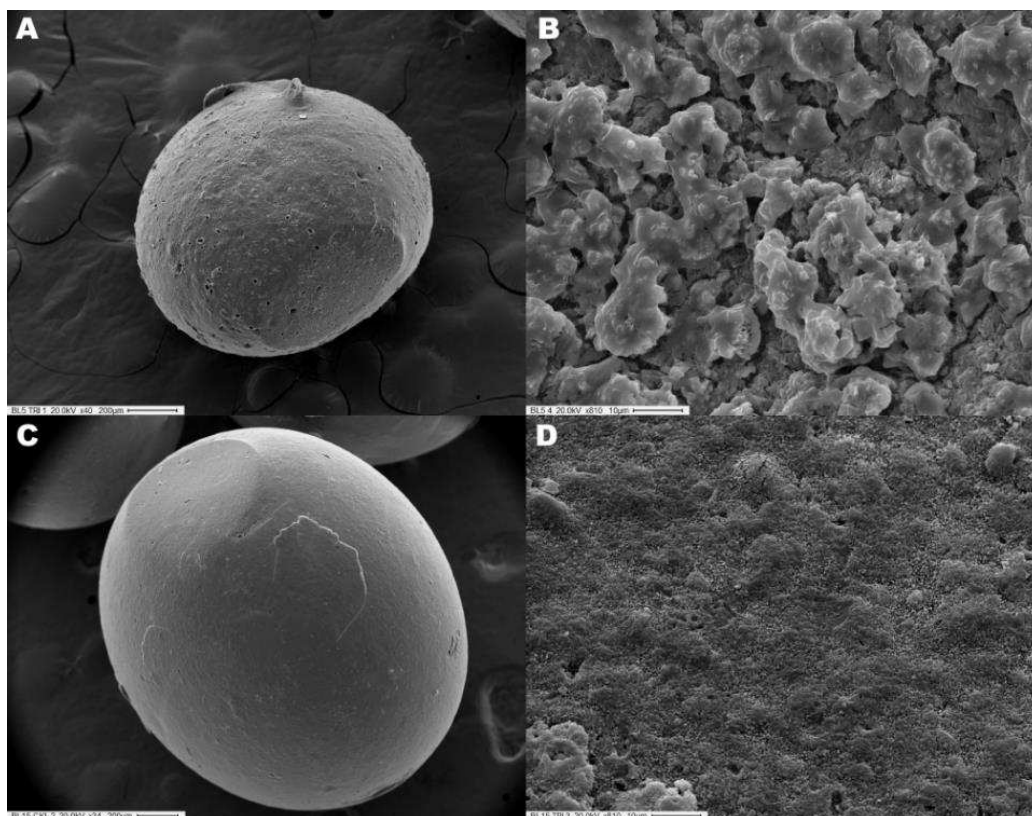


**Figura 2.13** – Imágenes obtenidas por SEM para: (A) A39 *bead*, (B) superficie A39, (C) corte A39, (D) A13 *bead*, (E) superficie A13 y (F) corte A13.

(Barra escala *bead* = 250  $\mu\text{m}$ ; barra escala superficie = 50  $\mu\text{m}$ ; barra escala corte = 10  $\mu\text{m}$ )



## CAPÍTULO 2



**Figura 2.14** – Imágenes de SEM obtenidas para: (A) AEu5 *bead*, (B) superficie AEu5, (C) AEu15 *bead* y (D) superficie AEu15.

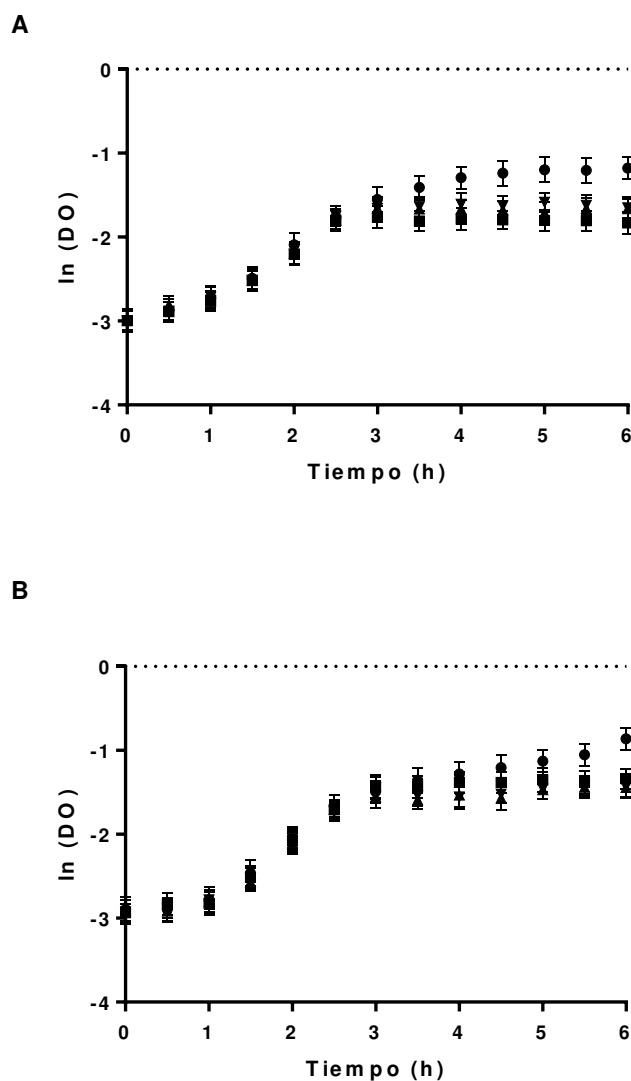
(Barra escala *bead* = 200 μm; barra escala superficie = 10 μm)

**Tabla 2.3** - Análisis de superficies por imágenes para las formulaciones A39, A13, AEu5 y AEu15 utilizando el software ImageJ.

Formulación	Media	Desviación estándar	Histograma
A39	80.42	35.14	
A13	84.76	32.54	
AEu5	77.80	32.77	
AEu15	77.53	18.93	

## CAPÍTULO 2

La Figura 2.15 muestra los efectos inhibitorios de las formulaciones seleccionadas sobre el crecimiento bacteriano en medio líquido. Se puede observar un efecto de inhibición del crecimiento similar tanto para *S. aureus* (Figura 2.15 – A) como para *E. coli* (Figura 2.15 – B). Este comportamiento puede deberse al amplio espectro de acción del FF.[47,115] Si bien no logran observarse efectos sinérgicos entre el FF y los polímeros utilizados, es importante destacar que el PA fue liberado de forma biológicamente activa luego de todo el procedimiento de síntesis.



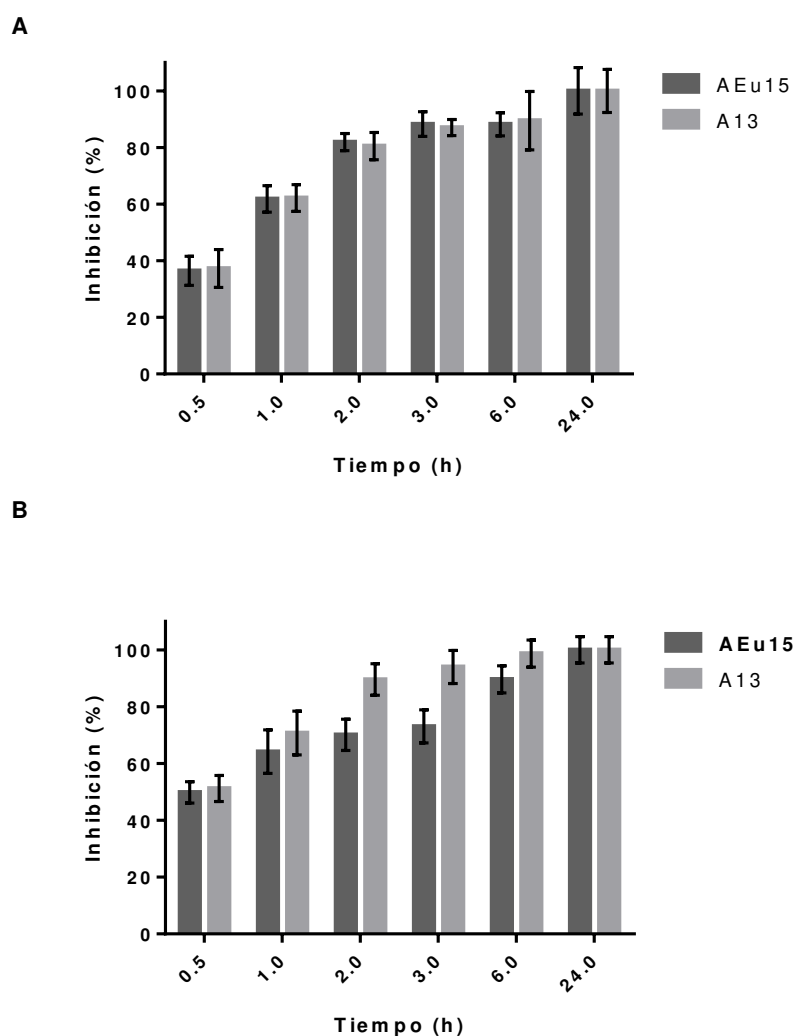
**Figura 2.15** – Efectos de las formulaciones seleccionadas sobre la inhibición del crecimiento bacteriano en medio líquido para las cepas (A) *S. aureus* y (B) *E. coli*.

(●) Control, (■) Florfenicol, (▲) formulación A13 y (▼) formulación AEU15.

Los resultados obtenidos para el estudio de los efectos antimicrobianos en medios agarizados se muestran en la Figura 2.16. En el caso de los ensayos realizados con la cepa

## CAPÍTULO 2

*S. aureus* (Figura 2.16 – B), se puede observar que la progresión de la inhibición no presentó diferencias sustanciales cuando se utilizaron formulaciones de Alg puro y *blends*. Por otro lado, *E. coli* presentó una demora en la inhibición en los ensayos con la formulación *blend*, pudiendo asociarse este fenómeno a una liberación más controlada de FF (Figura 2.16 – A). Estos resultados se encuentran en concordancia con reportes que indican una mayor susceptibilidad de organismos Gram-positivos al FF.[49] No obstante, ambas formulaciones son capaces de generar la misma inhibición a las 24hs de iniciado el ensayo, liberando el FF en forma activa.



**Figura 2.16** – Actividad antimicrobiana en placas agarizadas para (A) *S. aureus* y (B) *E. coli*.



### CONCLUSIONES PRELIMINARES

Se desarrollaron esferas biopoliméricas para la liberación controlada de FF. El uso de formulaciones de liberación controlada mejora ciertos aspectos de los tratamientos disminuyendo el número de dosis y los efectos adversos relacionados con las características fisicoquímicas del PA.

Se investigaron tres tipos de matrices: Pec pura, Alg puro y mezclas Alg-EuRS. La gelación iónica fue utilizada como método de síntesis. Se lograron esferas con formas y tamaños adecuados para los tratamientos de aplicación oral. Además, debido a los diámetros medios logrados, se logra evitar el pasaje de las *beads* hacia las diferentes vías de circulación del organismo. Utilizando la cristalización *in situ*, las eficiencias de encapsulación de FF resultaron superiores a las reportadas por otras metodologías.

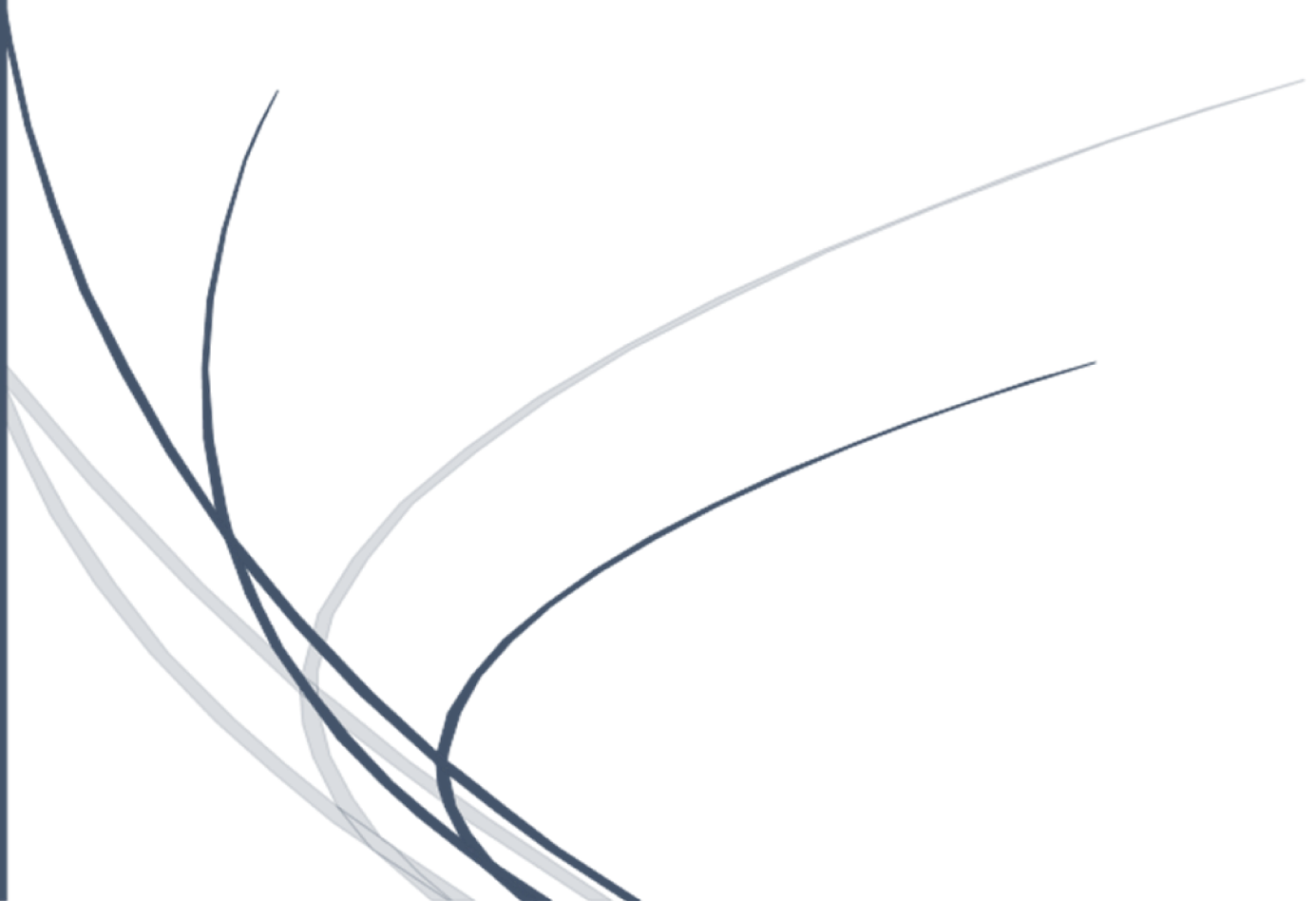
Se lograron diferentes características de los sistemas cuando se utilizaron diferentes proporciones de droga/polímero y tiempos de maduración. El aumento de la cantidad de FF en las matrices resultó en una liberación más lenta. No obstante, altas relaciones de FF/polímero impidieron una liberación pH-sensible.

Sólo la formulación A13 presentó un comportamiento significativamente diferente cuando se cambió el pH del medio de liberación. Por otra parte, en el caso de las matrices mezclas Alg-EuRS, se observó un comportamiento invertido en cuanto a la pH-sensibilidad: se lograron liberaciones más lentas de FF al aumentar el valor de pH del medio. Estas formulaciones pueden resultar prometedoras para la liberación de FF a través del sistema digestivo, donde el pH tiende a aumentar.

Se realizaron estudios microbiológicos de diferentes formulaciones seleccionadas, confirmándose la actividad biológica del FF y la ausencia de cambios fisicoquímicos significativos durante el proceso de síntesis.



**CAPÍTULO 3. IMPLANTES  
POLIMÉRICOS DE  
FORMACIÓN *IN SITU* PARA LA  
LIBERACIÓN CONTROLADA  
DE FLORFENICOL**







### INTRODUCCIÓN

En general, el principal objetivo de los sistemas para liberación controlada de drogas es desarrollar sistemas capaces de alcanzar y mantener los niveles de PA dentro del rango terapéutico, durante un tiempo determinado y en un determinado sitio del organismo. Entre las múltiples posibilidades que existen para el diseño de SLCD, aquellos que se basan en polímeros biodegradables-biocompatibles se han vuelto foco de un gran interés, debido a su versatilidad y aplicabilidad. La utilización de polímeros que pueden aplicarse sin problemas de toxicidad ni necesidad de remoción debido a su biodegradabilidad hacen de este tipo de sistemas unos excelentes candidatos para un gran grupo de PA de alta importancia. En este sentido, los estudios apuntan a descubrir las condiciones de síntesis y preparación que permitan obtener dispositivos cuyas características puedan diseñarse para lograr cinéticas de liberación de fármacos controladas y predecibles.[2,6,83]

Los SLCD poliméricos pueden ser diseñados en múltiples geometrías y tamaños, dependiendo de los sitios/cavidades de aplicación en los que se requieran, por ejemplo: nano- y micropartículas, parches, *beads*, microagujas, cápsulas, implantes, entre otros.[1,2,5] Según de cual se trate, pueden administrarse utilizándose diferentes tipos de aplicación: intravenosa, cutánea, sub-cutánea, intramuscular u oral, entre las más comunes. Dependiendo de la técnica de síntesis, los mismos pueden ser pre-fabricados (*ex situ*) o fabricados directamente en el sitio de aplicación (*in situ*). Las posibilidades de fabricación estarán dadas tanto por la vía de administración elegida como por las características fisicoquímicas del polímero y el fármaco de interés.

Los implantes poliméricos de formación *in situ* (IFIS) han adquirido una gran popularidad en los últimos años para una amplia gama de aplicaciones biomédicas como reparación de tejidos, *scaffolds*, encapsulación celular y liberación controlada de drogas.[116] Este tipo de SLCD ha demostrado una serie de características de suma importancia: liberación sitio-específica, fácil aplicación, tiempos prolongados de liberación, reducción de efectos secundarios asociados a administraciones sistémicas y mayor aceptación por parte del paciente. La utilización de esta tecnología permite la inyección o disposición de un material de relativa baja viscosidad, que solidifica para formar un depósito polimérico sólido o semi-sólido capaz de controlar la liberación de uno o varios fármacos y proveyendo terapias de larga duración. Según el estímulo que utilicen para la formación *in situ* pueden clasificarse como implantes obtenidos por: separación de fases (termoresponsivos, pH-dependientes o por intercambio de solventes), entrecruzamiento

### CAPÍTULO 3

(iniciados foto, física o químicamente) y solidificación de organogeles (cambio de solubilidad).[58]

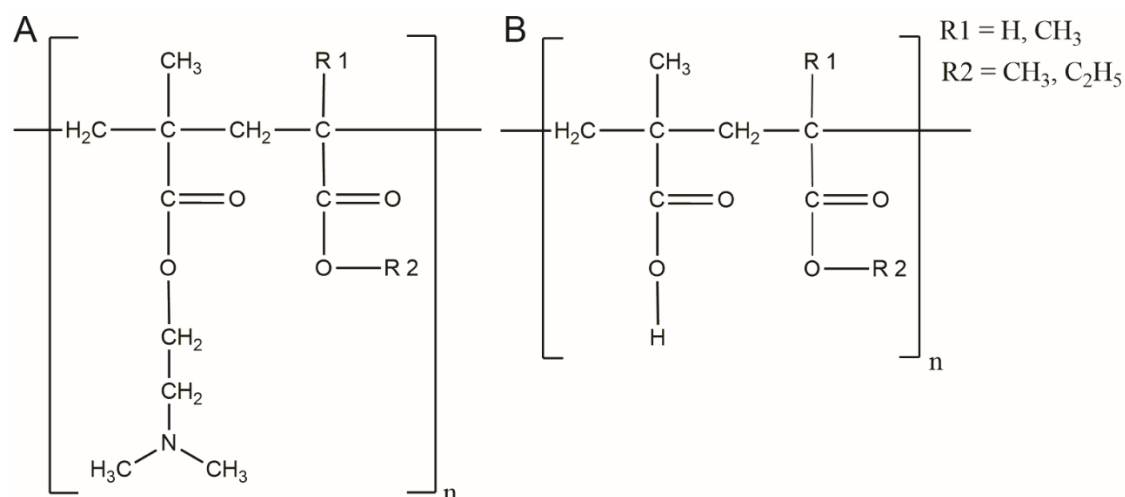
Los implantes de formación *in situ* por intercambio de solventes (IFIS-IS) han atraído un gran interés por parte de la industria farmacéutica, que busca desarrollar tecnologías terapéuticas para un amplio campo de aplicaciones. Este tipo de implantes presenta ventajas sobre las otras opciones ya que, para su formación, no necesita temperaturas críticas (versus implantes termoresponsivos), presencia de iones específicos (versus implantes iones dependientes) o determinados valores de pH (versus implantes pH-dependientes). Los IFIS-IS suelen formarse a partir de un polímero hidrofóbico disuelto en un solvente orgánico con parcial solubilidad acuosa, en conjunto con un principio activo. Al entrar en contacto con los medios fluidos de un organismo, se produce una difusión de moléculas de solvente que se intercambian por otras de agua, causando una transformación sol-gel con la precipitación conjunta *in situ* del polímero y del PA. De esta manera, se forma un depósito polimérico o implante, capaz de liberar de forma controlada la/s droga/s de interés.[116] . Como principal desventaja de estos sistemas se encuentra la ocurrencia de efecto *burst* o liberación explosiva inicial durante la formación *in situ*. La precipitación del polímero, debido al intercambio de solvente, es un proceso dinámico que requiere de un período de tiempo para completarse, luego del cual se formaría el implante completo. Esta etapa corresponde a la síntesis del IFIS-IS y se caracteriza por un marcado movimiento de solvente orgánico hacia la fase acuosa. El PA es capaz de difundir no sólo a través de la red polimérica en formación sino también por el mismo intercambio de solventes. La hidrofiliidad/hidrofobicidad del PA cumple un rol fundamental en la presencia del efecto *burst* ya que puede determinar la tendencia a difundir junto con el solvente orgánico o hacia el medio acuoso de síntesis. Estos movimientos de PA a través de las distintas fases determinan la eficiencia de encapsulación final y producen, o no, una liberación explosiva inicial, fenómeno indeseable cuando se requieren niveles de droga sumamente controlados.[58,59]

El polímero hidrofóbico sintético PLGA es uno de los principales materiales utilizados para la obtención de IFIS-IS. Tiene un largo historial en aplicaciones biomédicas debido a su biocompatibilidad y biodegradabilidad. Se encuentra aprobado por la FDA para aplicación medica parenteral desde hace ya varios años.[59,117,118] Este polímero se fabrica a partir de la co-polimerización de los ácidos láctico y glicólico, cuyas proporciones definirán sus características de cristalinidad e hidrofobicidad. La completa metabolización de este material, mediante hidrólisis de sus enlaces éster, lleva a la

## CAPÍTULO 3

formación de los metabolitos dióxido de carbono y agua, los que pueden ser asimilados por las rutas metabólicas normales. En general y dependiendo de la proporción de sus copolímeros, el PLGA presenta una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) superior a  $37^\circ\text{C}$ , permitiéndole mantener una relativa rigidez en los rangos de temperaturas fisiológicas normales de múltiples organismos. La degradación del PLGA suele llevar a la erosión de los implantes, convirtiéndose en un factor preponderante en las cinéticas de liberación de los PA. Como se mencionó, este fenómeno ocurre a través de la degradación hidrolítica de los enlaces éster que, además, se ve catalizada por la acumulación de los propios grupos ácidos en formación. La extensión de dicho efecto autocatalítico depende en gran medida de la forma y tamaño de la matriz polimérica. [15,16,61,119] Los IFIS-IS basados en PLGA se han utilizado en la liberación controlada de variados grupos de principios activos: proteínas [118], antibióticos [120], analgésicos [59] y opioides [121]. También, la combinación con otros polímeros puede ser una opción adecuada para mejorar los mecanismos de liberación de moléculas y las propiedades reológicas de las matrices poliméricas. Particularmente, los polímeros del tipo Eudragit pueden ser muy buenos candidatos para el diseño de combinaciones o *blends*, lográndose nuevas capacidades para interactuar con el medio acuoso biológico. Estos son polímeros sintéticos obtenidos por polimerización de los ácidos acrílico, metacrílico y/o sus ésteres. Las propiedades fisicoquímicas dependen de los tipos de monómero y sus proporciones en el polímero. Resultan de particular interés aquellos Eudragit con características responsivas según las condiciones de pH circundantes. Entre ellos podemos encontrar a los Eudragit E100 (EuE100) y S100 (EuS100) con capacidad para presentar cargas catiónicas y aniónicas, respectivamente. El EuE100 está basado en di(metil)aminoetil metacrilato, butil metacrilato y metil metacrilato. Mientras que el EuS100 se basa en metacrilato y metil metacrilato en una relación 1:2. La Figura 3.1 muestra las estructuras para los polímeros Eudragit utilizados en el presente capítulo. En el caso del polímero EuE100 (Figura 3.1-A), se encuentra una estructura característica del tipo  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ , capaz de presentar cargas positivas a medida que el valor de pH disminuye. Por otro lado, el S100 (Figura 3.1-B) presenta un grupo ácido y un consecuente aumento de solubilidad a medida que el pH se incrementa.[116] En la bibliografía, pueden encontrarse algunas investigaciones que utilizan matrices poliméricas basadas en *blends* de PLGA y Eudragit, sin embargo, ninguna de ellas trabajó sobre la posible aplicación de estos materiales para la síntesis de implantes de formación *in situ* por intercambio de solventes.[122,123]

### CAPÍTULO 3



**Figura 3.1** – Estructura química de los polímeros Eudragit A) E100 y B) S100.

Cómo se describió en capítulos anteriores, los antibióticos son un grupo de PA de gran interés para su utilización en tecnologías para liberación controlada, que resuelven problemas relacionados con el desarrollo de formulaciones concentradas y el requerimiento de un alto número de dosis. [2,35] Entre los antibióticos más utilizados en tratamientos veterinarios, el florfenicol (FF) presenta los problemas previamente mencionados [68,102,103] Este principio activo es un antibiótico sintético, de amplio espectro, utilizado en veterinaria para el tratamiento de enfermedades en diferentes especies. En la bibliografía, pueden encontrarse diferentes intentos por desarrollar SLCD para la liberación controlada de florfenicol, sin embargo, los resultados reportan bajas eficiencias de encapsulación y rápidas liberaciones del PA.[51–54]

En el presente capítulo se presenta el diseño de sistemas de liberación controlada de FF desde IFIS-IS, para aplicación cutánea, sub-cutánea o intramuscular, utilizando *blends* de los polímeros PLGA y polimetacrilatos de la marca comercial Eudragit. Se estudia las relaciones entre la composición de diferentes formulaciones y los resultados observados en términos de eficiencia de encapsulación y velocidades de liberación de FF. A su vez, se investigan las propiedades fisicoquímicas de los IFIS-IS sintetizados utilizando técnicas como FTIR, DSC y RX. Por otro lado, se evalúa la capacidad antimicrobiana de los implantes en un medio de cultivo con disponibilidad acuosa reducida.

### OBJETIVOS

- Diseñar sistemas poliméricos de liberación controlada de FF basados en implantes de formación *in situ* sintetizados por la técnica de intercambio de solvente (IFIS-IS), utilizando PLGA y poli(metracrilatos) para la composición de las matrices poliméricas.
- Estudiar la relación entre las condiciones iniciales de síntesis y las propiedades específicas de los sistemas: eficiencia de encapsulación, perfiles de liberación *in vitro*, características fisicoquímicas y morfológicas.
- Evaluar las cinéticas de liberación del PA y relacionar los fenómenos observados con las condiciones de síntesis.
- Investigar posibles interacciones fisicoquímicas entre los diferentes componentes de las formulaciones estudiadas.
- Evaluar de forma cualitativa la eficacia de los IFIS-IS con FF para combatir microorganismos en medios de cultivo artificiales semisólidos.



## MATERIALES Y METODOS

### 1. Materiales

PLGA (75:25), PM 6622 Da (Shanghai Easier Industrial Development Co., Ltd.), Florfenicol (FF, 2,2-dicloro-N-[(1R,2S)-3-fluoro-1-hidroxi-1-(4-etilsulfonilfenil)propan-2-yl] acetamida 99.1%, Romikin S.A.), Eudragit<sup>R</sup> E100 PM 47000 Da y S100 PM 125000 Da (Industrias Evonik, Alemania, adquiridos en Etilfarma S.A, Buenos Aires, Argentina), 2-pirrolidona (grado pro-análisis, Sigma-Aldrich, Argentina) y otros reactivos se utilizaron tal como se recibieron. Se utilizó agua ultrapura para todas las emulsiones, soluciones y diluciones.

### 2. Cuantificación de FF

La cuantificación de FF en las soluciones se llevó a cabo utilizando la técnica mencionada en los capítulos previos, utilizando un equipo HPLC (Prominence Serie 20A, Shimadzu) con detección UV por arreglo de diodos (SPD-M20Avp), equipado con una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6×150 mm; 5 µm), bombas LC-20AT y un horno CTO-10Asvp. La temperatura de columna y la longitud de onda de detección se establecieron en 35°C y 224 nm, respectivamente. Como fase móvil se utilizó una mezcla de metanol:agua (50:50 v v<sup>-1</sup>) pH 2.5, con un caudal de 0.75 mL min<sup>-1</sup>. Se realizó una curva de calibrado para FF en fase móvil en el rango de 10-100 mg L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.998).

### 3. Síntesis de implantes poliméricos de formación *in situ*

Se sintetizaron implantes de PLGA para la encapsulación de FF utilizando la metodología de intercambio de solvente. Se co-disolvieron 0.110 – 0.220 g de FF (25 – 50% p p<sup>-1</sup> PLGA) y 0.220 - 0.440 g de PLGA en 1.1 mL de 2-pirrolidona, a 70°C y con agitación constante. En el caso de los implantes con el agregado de Eudragit<sup>R</sup> E100 (EuE100) o S100 (EuS100), a la mencionada solución orgánica se le agregó una masa determinada de dicho polímero para lograr proporciones de 15 y 28 % p p<sup>-1</sup> de PLGA. Para llevar a cabo la formación de los implantes, aproximadamente 0.5 g de la solución orgánica preparada se colocaron cuidadosamente en moldes de vidrio cilíndricos y se pusieron en contacto con 7.0 mL de buffer fosfato 0.01M pH 7.4, a 37° C, durante 24 h. Finalmente, los implantes fueron retirados y los sobrenadantes filtrados y almacenados a 4° C hasta la posterior determinación de la cantidad de FF no encapsulado. La Tabla 3.1 muestra el

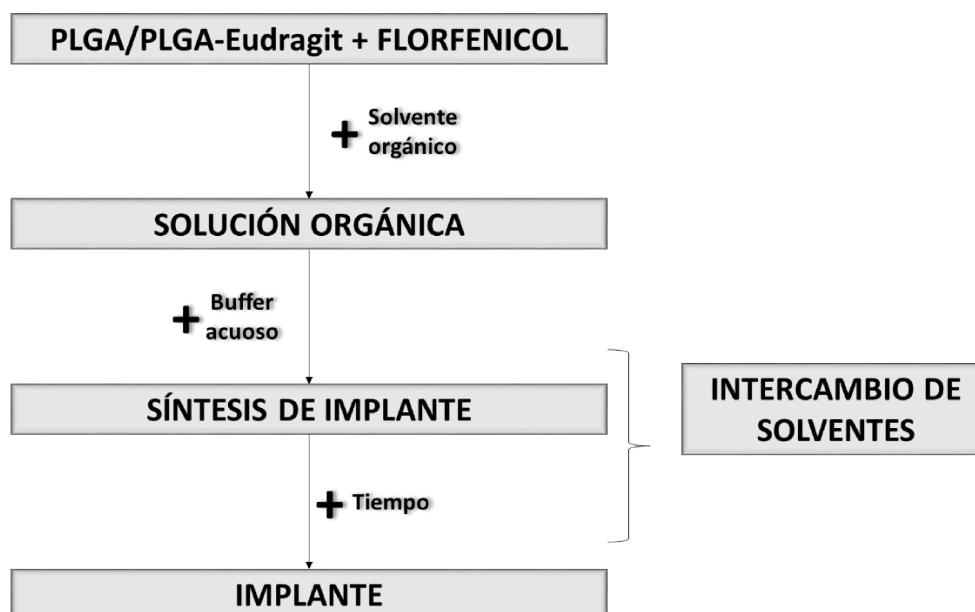
### CAPÍTULO 3

conjunto de formulaciones estudiadas para la síntesis de IFIS-IS mientras que la Figura 3.2 muestra un esquema del procedimiento de síntesis de los implantes estudiados.

**Tabla 3.1** -Formulaciones utilizadas en la síntesis de los IFIS-IS utilizando el solvente 2-pirrolidona.

ID Formulación	Concentración de	Proporción de	Tipo de Eudragit	Proporción de
	PLGA (% p v <sup>-1</sup> )	FF/PLGA (% p p <sup>-1</sup> )		Eudragit/PLGA (% p p <sup>-1</sup> )
PLGA20	20	25	-	-
PLGA20	20	50	-	-
P-25	40	25	-	-
P-50	40	50	-	-
PE15-25	40	25	EuE100	15
PE15-50	40	50	EuE100	15
PE28-25	40	25	EuE100	28
PE28-50	40	50	EuE100	28
PS15-25	40	25	EuS100	15
PS15-50	40	50	EuS100	15
PS28-25	40	25	EuS100	28
PS28-50	40	50	EuS100	28





**Figura 3.2** – Esquema del procedimiento de síntesis de los IFIS-IS a partir de las diferentes formulaciones estudiadas.

#### 4. Eficiencia de encapsulación (EE)

Con el objetivo de evaluar la *EE*, las soluciones filtradas obtenidas durante la síntesis de los implantes fueron analizadas por HPLC utilizando la metodología mencionada anteriormente. Se cuantificó la masa de FF no encapsulado (*mFFne*) y la *EE* se calculó, de forma indirecta, como se mencionó en los capítulos anteriores, según la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{mFFi (g) - mFFne (g)}{mFFi (g)} \times 100$$

donde *mFFi* es la masa de florfenicol al inicio de la síntesis.

#### 5. Perfiles de liberación *in vitro* de FF

Inmediatamente finalizada la etapa de síntesis, y para evaluar las cinéticas de liberación de FF, los implantes se pusieron en contacto con 50 mL de buffer fosfato 0.01M pH 7.4 en viales perfectamente sellados y mantenidos en agitación orbital a 150 RPM y a 37°C. Cada aproximadamente 24-48h, se tomó una muestra de medio de liberación, con reposición de buffer para mantener las *sink-conditions* durante todo el ensayo. Las muestras fueron filtradas y conservadas a 4°C hasta la posterior determinación de la

## CAPÍTULO 3

cantidad de FF liberado utilizando la técnica HPLC antes mencionada. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se graficaron curvas de la cantidad acumulada de antibiótico liberado en función del tiempo. Se realizaron análisis estadísticos comparativos utilizando el test f1-f2 para determinar la presencia de diferencias significativas entre los diferentes perfiles de liberación obtenidos.[124]

### 6. Modelado matemático

Los perfiles de liberación de FF fueron modelados con ecuaciones del tipo orden cero, primer orden, Higuchi y Korsmeyer-Peppas. Las congruencias entre los datos y los modelos fueron aceptadas como adecuadas cuando  $R^2 > 0.9$ .

### 7. Estudio de interacciones fisicoquímicas

#### a. Difracción de Rayos-X

Con el objetivo de conocer el estado físico de los componentes en las diferentes formulaciones, las muestras (0.1-0.2 g) comprimidas se analizaron utilizando un difractor de rayos X *Empyrean Panalytical*. La radiación filtrada se incidió sobre la muestra a 40 kW y 45 mA, en el rango de 5-40°, a una velocidad de 1 grado  $\text{min}^{-1}$ .

#### b. FTIR (Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier)

Para este ensayo, las muestras (3-4 mg) se mezclaron y comprimieron junto con bromuro de potasio hasta obtener discos homogéneos. Se utilizó un espectrofotómetro FTIR-8001 PC (Shimadzu) y se estudiaron las señales en un rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ .

#### c. DSC (Calorimetría diferencial de barrido)

Los termogramas se obtuvieron utilizando un calorímetro diferencial de barrido DSC Q2000 (TA Instruments). Para esto, se colocaron 4-5 mg de la muestra en cápsulas de aluminio herméticamente cerradas, calentadas a una velocidad de 10° C  $\text{min}^{-1}$ , bajo atmósfera de nitrógeno (flujo de 50 mL  $\text{min}^{-1}$ ). Se midió el flujo de calor en un rango de temperatura de 0-200° C.

### 8. Ensayos de efectividad antimicrobiana

Los implantes pueden ser utilizados para combatir el desarrollo de microorganismos de forma local en, por ejemplo, heridas traumáticas o post-quirúrgicas. Con el objetivo de estudiar la eficacia antimicrobiana en un ambiente semi-sólido y con una disponibilidad acuosa reducida, los implantes con diferentes proporciones de Eudragit E100 y una concentración de FF de 50% (p p<sup>-1</sup> PLGA) se colocaron en placas de Petri en contacto

### CAPÍTULO 3

con 50 mL de Agar Mueller-Hinton e inoculado con un cultivo *over night* de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Esta clase de bacteria fue elegida debido a que se encuentra ampliamente reportada su asociación con la infección de heridas, la capacidad para producir *biofilm* en las mismas y la posibilidad de generar una sepsis generalizada [125–127]. Durante 1-12 días, se realizaron registros fotográficos para poder evaluar la evolución del crecimiento bacteriano. Se realizó un ensayo sin principio activo agregado, considerándose como ensayo control de crecimiento positivo.



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

Durante la síntesis de IFIS-IS resulta de importancia identificar dos etapas: el proceso de precipitación del polímero durante el intercambio del solvente orgánico por agua, donde pueden coexistir zonas de matriz polimérica y solución orgánica polimérica, y la posterior liberación del PA propiamente dicha debida a los distintos fenómenos que puedan desarrollarse en relación con la matriz polimérica establecida.[128]

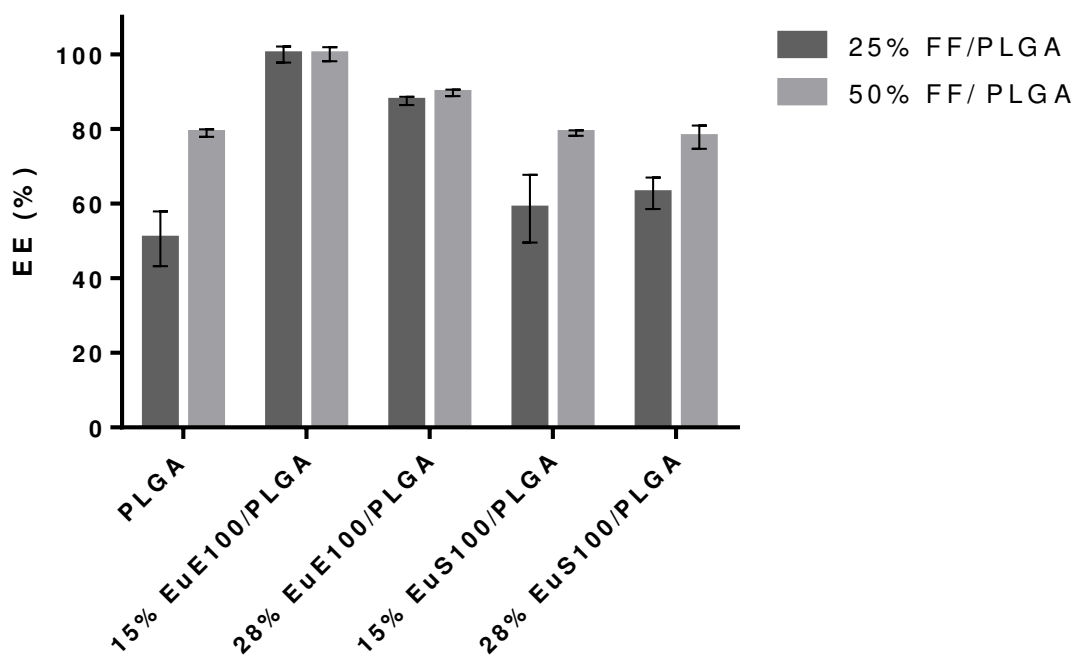
La Figura 3.3 muestra las eficiencias de encapsulación obtenidas para las diferentes formulaciones utilizadas para sintetizar IFIS-IS. La concentración de PLGA en la fase orgánica utilizada se definió teniendo en cuenta que concentraciones de polímero del 20% (p v<sup>-1</sup>) no permitieron la formación correcta de los IFIS-IS, aun cuando se utilizaron diferentes proporciones de FF. Para formulaciones con 40% (p v<sup>-1</sup>) de PLGA como único polímero, el aumento de la proporción de droga de 25% a 50% (p p<sup>-1</sup> de polímero), aumentó la EE del 50.6 al 78.9 %. Esto puede deberse a las altas concentraciones de FF que permiten la formación de una mayor cantidad de depósitos de droga en forma sólida durante el proceso de inversión de fases. Este fenómeno evitaría el efecto *burst* debido al paso necesario de disolución de la droga para su difusión a través del implante.[48] El efecto *burst* es una liberación inicial explosiva de droga, asociado a droga no encapsulada o levemente retenida en la matriz polimérica. Suele estar más relacionado y ser más riesgoso en matrices de formación *in situ* debido a la ausencia de un paso de lavado previo a su implantación para remover el PA no encapsulado. Es un efecto completamente indeseado porque puede causar efectos irritantes locales, niveles plasmáticos de droga tóxicos y reducir la cantidad de droga disponible para ser liberada durante el período de tiempo estipulado. En la bibliografía, existen diferentes intentos para desarrollar implantes de formación *in situ*, basados en PLGA, para sistemas de liberación controlada de fármacos.[58,59,121,128]. En ellos se reporta que el aumento de la viscosidad de la solución polimérica como consecuencia del incremento en la hidrofobicidad, PM y concentración del polímero, como así también por el aumento de la concentración del PA, es un fenómeno capaz de demorar la formación del implante y aumentar la EE (disminución del efecto *burst*). Estos reportes concuerdan con los resultados obtenidos en el presente trabajo cuando se aumenta la concentración del PA (ver Figura 3.3).

Con el objetivo de mejorar las EE y obtener nuevas propiedades en los implantes, se agregaron dos tipos de Eudragit a las formulaciones basadas en PLGA. Cuando se analizan las formulaciones con menor proporción de FF, las EE se incrementaron (99.9 y 87.5 % cuando se adicionó 15 y 28 % de EuE100, y 58.6 y 62.7% cuando se agregó 15 y

### CAPÍTULO 3

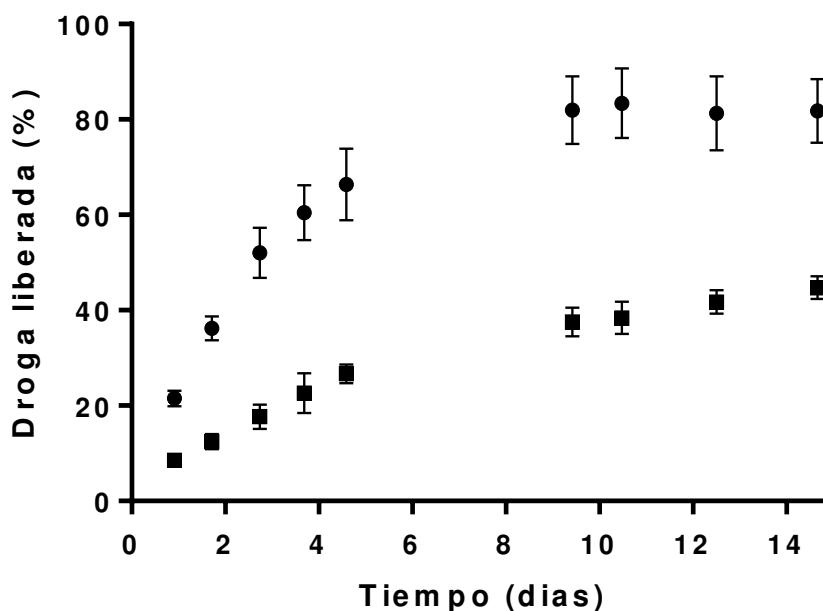
28 % de EuS100, respectivamente) con respecto a las formulaciones basadas sólo en PLGA (50.6 %), resultados que también son respaldados en los diferentes trabajos donde un aumento de la concentración de polímero permite mejorar la retención del PA en los implantes. Cuando se analiza la utilización de una mayor concentración de FF, se observa que las EE aumentaron (para EuE100) o se mantuvieron constantes (para EuS100) con respecto a la utilización de sólo PLGA (78.9%). Sin embargo, las EE disminuyeron con un aumento de EuE100 agregado (100 y 89.6 % para 15 y 28 % de EuE100, respectivamente) o no sufrieron variaciones importantes al agregar EuS100 en diferentes proporciones (78.9 y 77.8 % para 15 y 28 % de EuS100, respectivamente). Este comportamiento un tanto errático con el aumento de la concentración de FF y Eudragit no debería asociarse a un solo factor, sino a una combinación de varios. Poca información se encuentra disponible específicamente sobre la formación de IFIS-IS basados en los *blends* aquí estudiados. En un trabajo publicado por Solorio *et al.* (2012) donde se analizó la formación de IFIS-IS utilizando *blends* de PLGA de diferentes pesos moleculares para la encapsulación de fluoresceína, los autores concluyeron que el efecto de variar el PM de los polímeros utilizados sobre el proceso de inversión de fases durante la precipitación de la matriz es el resultado de la osmolaridad resultante del implante, la hidrofobicidad de los polímeros, la afinidad por el solvente orgánico, entre otros factores.[129] Por mencionar algunas, las características fisicoquímicas de los Eudragit aquí utilizados son diferentes, en cuanto a PM, ionización y solubilidad acuosa a diferentes pH, pudiendo esperarse comportamientos muy dispares durante el proceso de inversión de fases, en comparación a lo esperable de una matriz pura de PLGA.

### CAPÍTULO 3



**Figura 3.3** - Eficiencias de encapsulación obtenidas en la síntesis de IFIS-IS utilizando diferentes proporciones de FF/PLGA y Eudragit/PLGA (Concentración base de PLGA: 40% (p p<sup>-1</sup>) en 2-pirrolidona)

Una vez que se logró la precipitación total de la matriz polimérica, se procedió a estudiar los fenómenos relacionados con la liberación del principio activo. En la Figura 3.4 pueden observarse los perfiles de liberación de FF cuando se utilizaron diferentes proporciones de principio activo en las formulaciones de síntesis. A los 3 días de iniciado el ensayo, la cantidad de FF liberada fue del 50-55% y de 15-20% cuando se utilizó 25 y 50% de FF (p p<sup>-1</sup> PLGA), respectivamente. Esto puede deberse a una mayor presencia de droga sólida cuando se utilizan mayores cantidades de FF, lo que impondría la disolución del principio activo como un paso previo para su posterior difusión a través de la red polimérica del implante.[130]



**Figura 3.4** – Perfiles de liberación de FF desde IFIS-IS sintetizados utilizando las formulaciones (●) P25 y (■) P50.

Los perfiles de liberación de FF para los diferentes IFIS-IS sintetizados a partir de formulaciones con el agregado de EuE100 y EuS100 pueden observarse en las Figura 3.5 y Figura 3.6, respectivamente. Ya que en algunos casos una simple inspección visual no permitió evidenciar posibles diferencias y, con el objetivo de poder determinar estadísticamente si los perfiles cinéticos de liberación son diferentes entre sí, se llevó a cabo un test basado en los parámetros f1-f2. El parámetro f1 (factor de diferencia) mide el error porcentual entre dos curvas a lo largo de los puntos de tiempo ensayados mientras que f2 (factor de similitud) es la transformación logarítmica de la suma del error al cuadrado de las diferencias entre los perfiles en los puntos de tiempo elegidos. El resultado de f1 daría 0 si los perfiles de liberación son idénticos y aumentaría a medida que se diferencian. Por otro lado, f2 resultaría 100 si los perfiles son idénticos y disminuiría a medida que la diferencia entre estos aumenta. En general, valores de f1 entre 0-15 y de f2 entre 50-100 indicarían un alto grado de similitud entre los perfiles comparados.[124] Como el test permite comparar de a pares, se eligió comparar los perfiles con misma carga de FF para evaluar el efecto de la concentración de polímero Eudragit agregado. La Tabla 3.2 muestra los resultados obtenidos para las comparaciones mediante el test f1-f2.



### CAPÍTULO 3

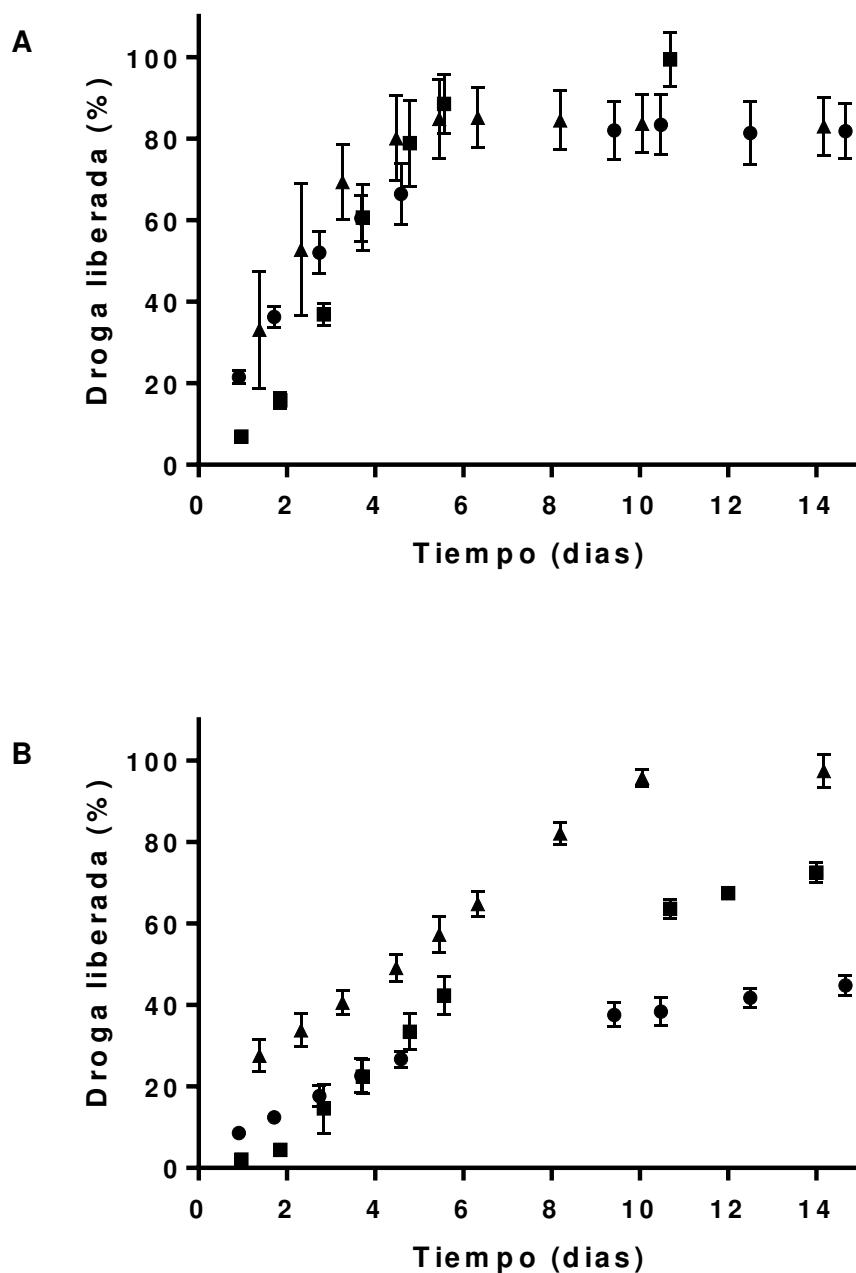
**Tabla 3.2** - Resultados obtenidos para las comparaciones estadísticas entre las cinéticas de liberación de FF obtenidas para las diferentes formulaciones estudiadas.

<b>Cinética 1</b>	<b>Cinética 2</b>	<b>Parámetro f1</b>	<b>Parámetro f2</b>
P25	P50	100.00	25.99
P25	PE15-25	26.49	50.13
P25	PE28-25	13.92	48.70
P50	PE15-50	75.10	30.86
P50	PE28-50	44.72	29.54
P25	PS15-25	46.24	37.82
P25	PS28-25	57.60	36.06
P50	PS15-50	6.04	85.33
P50	PS28-50	16.14	70.19

La Figura 3.5 – A muestra la cantidad de principio activo liberado cuando se usó una proporción de FF de 25% ( $p\ p^{-1}$  PLGA). El perfil presenta una cinética más rápida al inicio para las formulaciones PE-28 y P25, liberando cerca del 50% de FF a los 3 días de iniciado el ensayo frente al 35 % liberado desde la matriz PE-15. No obstante, las diferencias parecieran disminuir a medida que el tiempo de ensayo transcurre. La Figura 3.5 – B muestra los perfiles de liberación cuando se utilizó 50% FF ( $p\ p^{-1}$  PLGA) en las formulaciones de EuE100/PLGA. En este caso puede observarse que a medida que se aumenta la proporción de EuE100, la liberación de FF también se acelera. A los 5 días de iniciado el ensayo, el principio activo liberado fue del 10-20% en el caso de las formulaciones con PLGA y 15% EuE100, mientras que cuando se utilizó una proporción de 28% EuE100 el FF liberado fue del 35-40%. Esta tendencia se acentuó con el progreso de la liberación. Los resultados observados podrían atribuirse por un lado a un efecto plastificante del EuE100 en la matriz de PLGA. Ambos polímeros presentan una  $T_g$

### CAPÍTULO 3

similar, de alrededor de 45-48°C. Ya que las liberaciones fueron llevadas a cabo a 37°C, puede esperarse un considerable relajamiento molecular, permitiendo la difusión del PA a través de la matriz polimérica. Por otra parte, la solubilidad del EuE100 en medios acuosos se ve favorecida a valores de pH menores a 5 debido a la protonación de sus grupos funcionales característicos.[131] En la bibliografía, se pueden encontrar numerosos trabajos que reportan la formación de microambientes ácidos en matrices de tamaños mayores a 25  $\mu\text{m}$ , durante la degradación hidrolítica del PLGA. Los implantes de PLGA presentan, comúnmente, una típica erosión desde el seno de la matriz polimérica. Esto ocurre debido a que los compuestos ácidos generados por la degradación hidrolítica se acumulan y son capaces de catalizar nuevas reacciones de hidrólisis, induciendo la degradación del polímero. Este fenómeno de autocatálisis ácida causa una disminución en los valores de pH en la matriz. En estructuras de menor tamaño, como nanopartículas, éste no se hace evidente debido a que los compuestos ácidos generados son capaces de difundir rápidamente hacia el medio acuoso.[15,16,61] Entonces, debido a la presencia de un ambiente ácido, el Eu100 podría presentar una mayor cantidad de cargas positivas, generando una desestabilización en la matriz debido a fuerzas repulsivas entre cadenas y al proceso de solubilización. Como consecuencia de estos cambios estructurales en el implante, el PA podría difundir y liberarse más rápidamente hacia el medio acuoso.

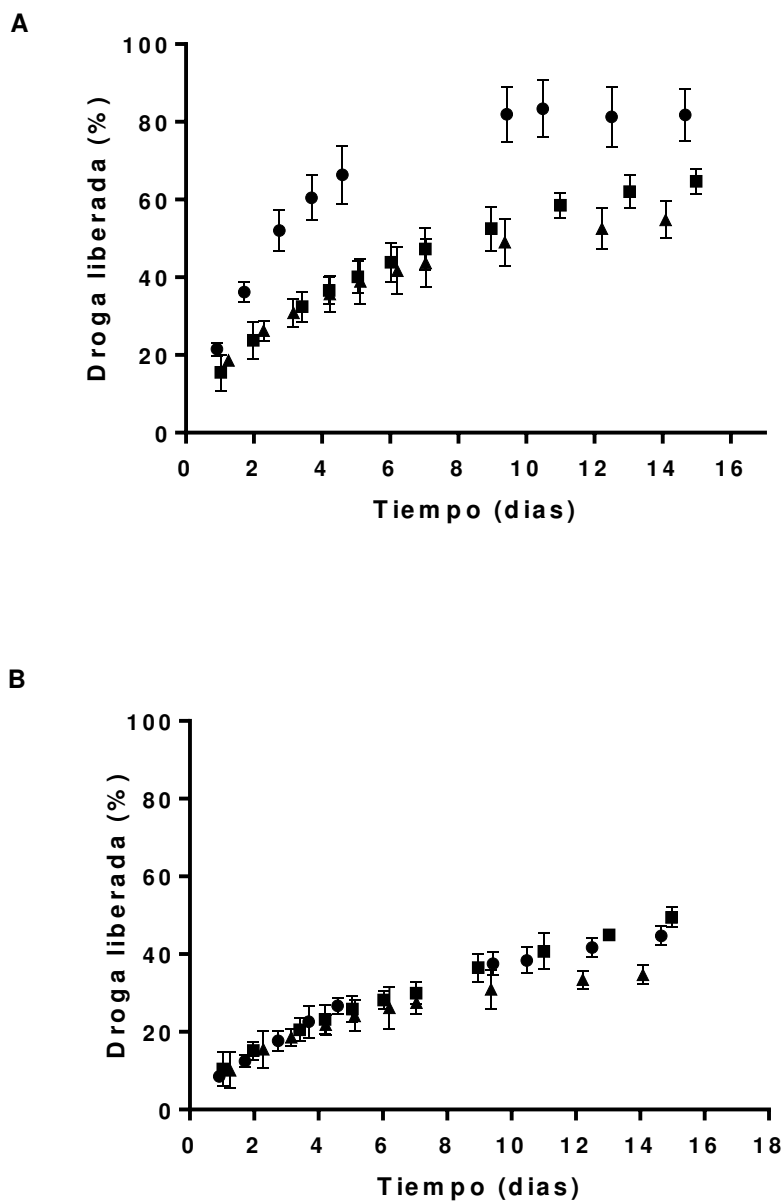


**Figura 3.5** - Perfiles de liberación de FF desde diferentes IFIS-IS sintetizados con EuE100 y utilizando (A) 25% FF/PLGA ( $p\ p^{-1}$ ) y (B) 50% FF/PLGA ( $p\ p^{-1}$ ).  
 (●) PLGA; (■) PE15; (▲) PE28

Por otro lado, cuando se utilizó una proporción de 25% FF ( $p\ p^{-1}$  PLGA), se observa una disminución en la liberación al agregar el EuS100. A los 5 días de iniciado el ensayo, el implante P25 libera 65% de FF mientras que ambos *blends* liberan 38-40% (Figura 3.6 –

### CAPÍTULO 3

A). El mismo efecto se observa para la formulación PS28-50 en comparación con su análoga sin EuS100.



**Figura 3.6** - Perfiles de liberación de FF desde diferentes IFIS-IS sintetizados con EuS100 y utilizando (A) 25% FF/PLGA ( $p\ p^{-1}$ ) y (B) 50% FF/PLGA ( $p\ p^{-1}$ ).

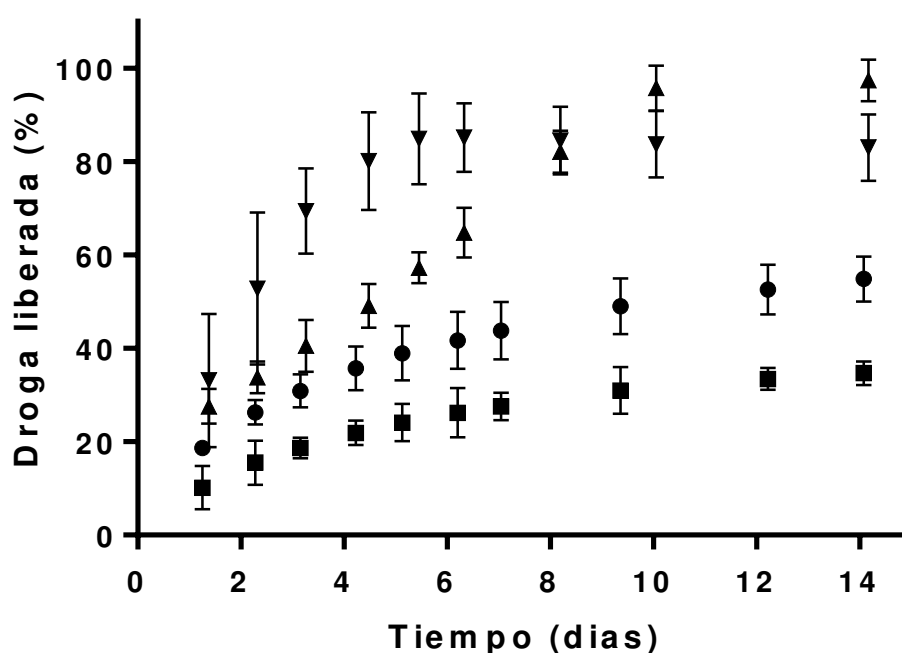
(●) PLGA; (■) PS15; (▲) PS28

Este fenómeno podría explicarse por la rigidez que aporta el polímero Eudragit ( $T_g > 180^\circ\text{C}$ ), demorando el ingreso-egreso de medio acuoso y como consecuencia, la difusión de la droga a través del implante.[116] Además, el EuS100 presenta características aniónicas con un incremento de la solubilidad acuosa a valores de pH superiores a 7. Como se mencionó anteriormente, en este caso habría un comportamiento inverso al del

### CAPÍTULO 3

EuE100 y relacionado con el microambiente ácido generado dentro de los implantes producto de la degradación del PLGA. En la bibliografía, se pueden encontrar diversos intentos por desarrollar y estudiar matrices poliméricas *blend* de PLGA con cierto tipo de Eudragit. Por ejemplo, el diseño de formulaciones basadas en nanopartículas para la administración de capecitabina utilizando matrices con la combinación EuS100-PLGA.[122] El trabajo concluyó que, a pH 7.8 de liberación, el aumento de la proporción de EuS100 logra impulsar la liberación del PA. Otro ejemplo es la síntesis de nanopartículas basadas en el polímero pH dependiente EuL100 (de características similares al EuS100) con PLGA, para la encapsulación y liberación controlada de diclofenac sódico[123]. Nuevamente, el agregado de Eudragit llevó a un aumento de la liberación del PA, tanto cuando se aumentó el pH como al aumentar la proporción de EuL100. No obstante, ambos trabajos utilizaron sistemas basados en nanopartículas donde la acumulación de compuestos ácidos, provenientes de la degradación hidrolítica de PLGA, es nula debido a la difusión de los mismos. Este fenómeno no sería apreciable en los implantes, donde los productos ácidos se acumulan creando un ambiente ácido capaz de mantener en su forma no-ionizada el EuS100 disminuyendo su solubilidad en agua.[15,16,61]

En la Figura 3.7 puede observarse la cinética de acumulación de FF en el medio de liberación cuando se evaluaron IFIS-IS utilizando las mismas proporciones de EuE100 y EuS100 pero diferentes cantidades de FF durante la síntesis. En el caso del EuE100, los implantes PE28-25 y PE28-50 liberan el 60-70% y 35-40% del FF, respectivamente. El aumento de la cantidad de droga sólida en PE28-50, aproximadamente 1.8 veces superior, sería la principal limitante para la difusión del PA. Cuando se utilizó EuS100, los implantes PS28-25 y PS28-50 liberaron el 35-40% y 15-20% de FF, respectivamente. Por un lado, podemos apreciar que el efecto de la proporción de principio activo produce un fenómeno similar en ambos dispositivos poliméricos, relacionado con una mayor cantidad de FF en forma sólida y la necesidad de un paso previo de disolución antes de lograr difundir a través de la matriz. No obstante, se puede observar que la utilización de EuS100 permite ralentizar más la liberación de FF, en ambas proporciones de principio activo utilizadas.



**Figura 3.7** - Perfiles de liberación de FF desde IFIS-IS sintetizados con las formulaciones (▼) PE28-25, (▲) PE28-50, (●) PS28-25 y (■) PS28-50.

La Tabla 3.3 muestra los mejores ajustes para los modelos matemáticos estudiados y las cinéticas de liberación obtenidas. Los resultados indican que la mayoría de los perfiles siguen un modelo de primer orden. Esto indicaría que la evolución de la concentración de la droga a través del tiempo está relacionada con la disolución de partículas de principio activo debido a la interacción superficial con un medio líquido.[26] No obstante, las formulaciones P50 y PE28-50 presentaron un mejor ajuste con un modelo de orden cero. Esto indicaría que la velocidad de liberación sería constante a lo largo del tiempo estudiado, lo que podría deberse a la constante saturación de droga en la matriz polimérica. El principio activo se encuentra saturado y se libera por partición a través de la red polimérica y luego, hacia el medio de liberación. La velocidad constante se debe a que, debido a la saturación, el gradiente de concentración en el sistema se mantiene estacionario. Esto puede aplicarse en un sistema de erosión si se consideran los mismos fenómenos en cada capa de polímero. Este tipo de modelos pueden encontrarse en sistemas transdermales, osmóticos y con recubrimiento. Son deseados porque, modulando la cantidad de principio activo aplicado, puede ecualizarse la dosificación con la eliminación de la droga. Este tipo de modelos resultan de preferencia en el desarrollo de SLCD de forma prolongada debido a la robustez en control y predicción. Por otro lado,

### CAPÍTULO 3

al analizar las formulaciones PS15-25, PS28-25 y PS28-50 se logró el mejor ajuste con el modelo Korsmmeyer-Peppas, con el parámetro  $n > 0.5$ , indicando una posible difusión no-Fickiana (transporte anómalo), donde la liberación de FF depende de procesos de hinchamiento y difusión combinados.[132]

**Tabla 3.3** - Modelos matemáticos con mejor ajuste para las diferentes cinéticas de liberación estudiadas.

ID Formulación	Modelo con mejor ajuste	Ecuación*2	R <sup>2</sup>
P25	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.20 \times t(h)}) - 1)$	0.98
P50	Orden cero	$DL (\%) = 4.12 \times t(h)$	0.99
PE15-25	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.24 \times t(h)}) - 1)$	0.98
PE15-50	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.07 \times t(h)}) - 1)$	0.99
PE28-25	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.28 \times t(h)}) - 1)$	0.93
PE28-50	Orden cero	$DL (\%) = 10.86 \times t(h)$	0.99
PS15-25	Korsm-Peppas*1	$DL (\%) = 28,6 \times (t(h)^{0.23})$	0.99
PS15-50	Primer orden	$DL (\%) = -((-e^{0.05 \times t(h)}) - 1)$	0.99
PS28-25	Korsm-Peppas*1	$DL (\%) = 27.63 \times (t(h)^{0.22})$	0.99
PS28-50	Korsm-Peppas*1	$DL (\%) = 18.02 \times (t(h)^{0.18})$	0.99

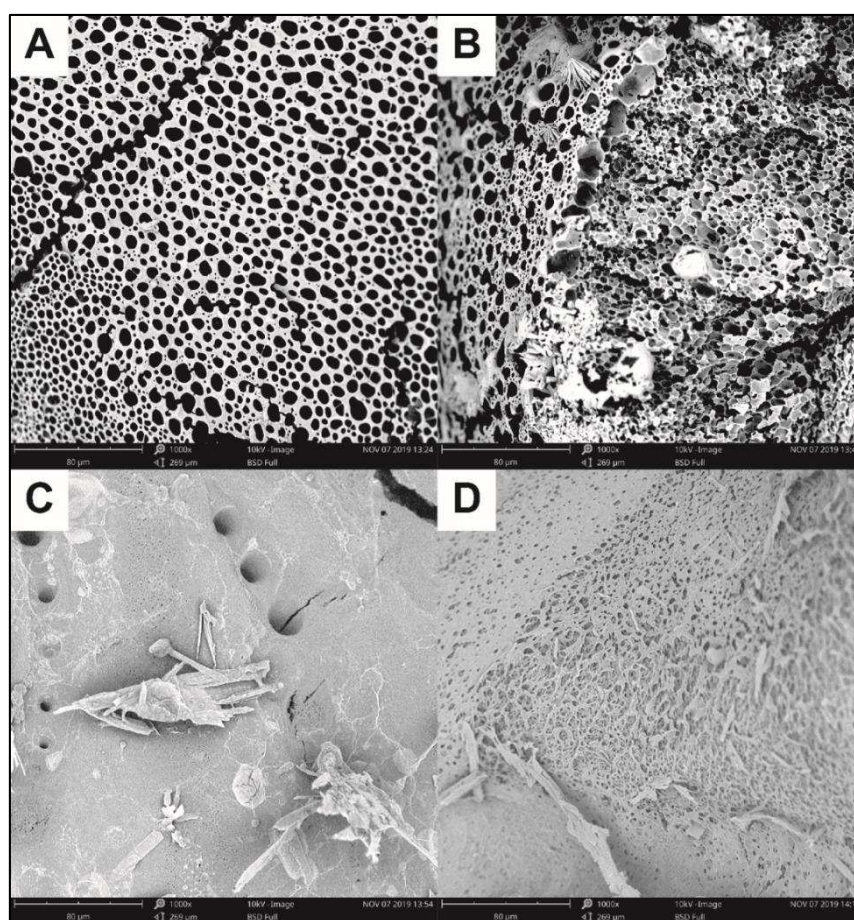
\*1 modelo Korsmmeyer-Peppas; \*2 DL (%) = Droga liberada

Con el objetivo de conocer las características estructurales de los diferentes implantes IFIS-IS sintetizados y su relación con los perfiles de liberación observados, se llevaron a cabo estudios de imágenes mediante SEM.

La Figura 3.8 muestra las fotografías obtenidas para los implantes P25 y P50. Es notable la diferencia en cuanto a densidad de poros en las superficies de los implantes. El implante P25 muestra una superficie (Figura 3.8-A) con una intensa porosidad que se evidencia

### CAPÍTULO 3

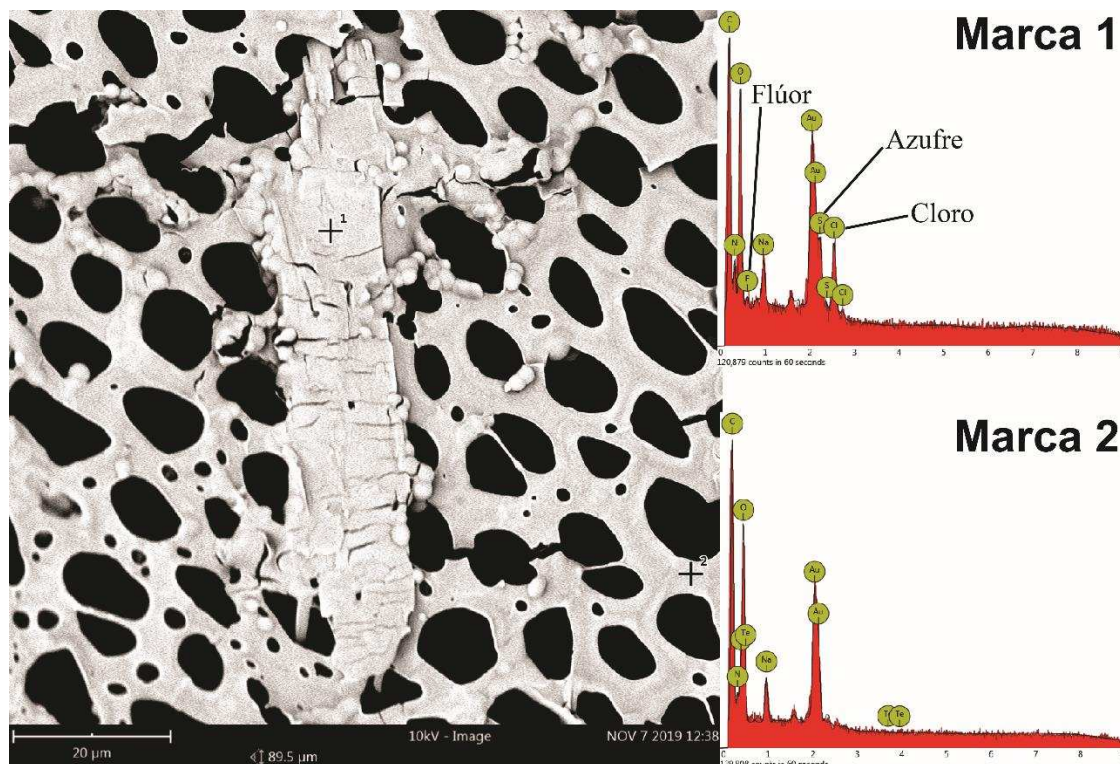
también en el corte transversal estudiado (Figura 3.8-B). En el caso de P50 (Figura 3.8-C,D) se observa una superficie y un interior más compactos como así también una mayor presencia de FF en forma sólida. El aumento de la viscosidad de la formulación P50 para los IFIS-IS produciría una difusión más lenta del solvente orgánico durante la síntesis, pudiendo generar una matriz polimérica más compacta y con una menor porosidad.[58,116] Por otro lado, las estructuras sólidas del principio activo se evidenciaron analizando la composición elemental de la zona en estudio.



**Figura 3.8** – Imágenes obtenidas mediante SEM para (A) superficie e (B) interior de implante P25; y (C) superficie e (D) interior de implante P50. (Barra de escala = 80  $\mu\text{m}$ )

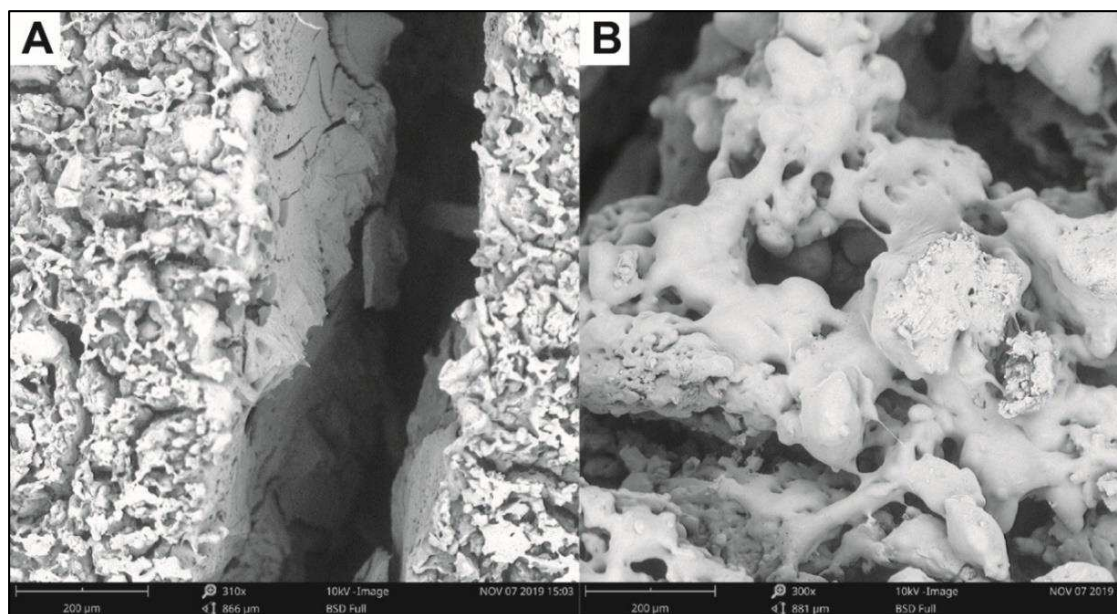
Cómo puede observarse en la Figura 3.9 (Marca 1), las zonas que podrían evidenciar la presencia de FF sólido presentan señales correspondientes con los elementos Flúor (F), Cloro (Cl) y Azufre (S), compuestos característicos de la estructura molecular del principio activo. Por otro lado, las zonas que corresponderían solamente a composición polimérica no muestran los elementos mencionados (Figura 3.9, Marca 2). Esto permitiría confirmar la composición de las estructuras sólidas atribuidas al FF precipitado.





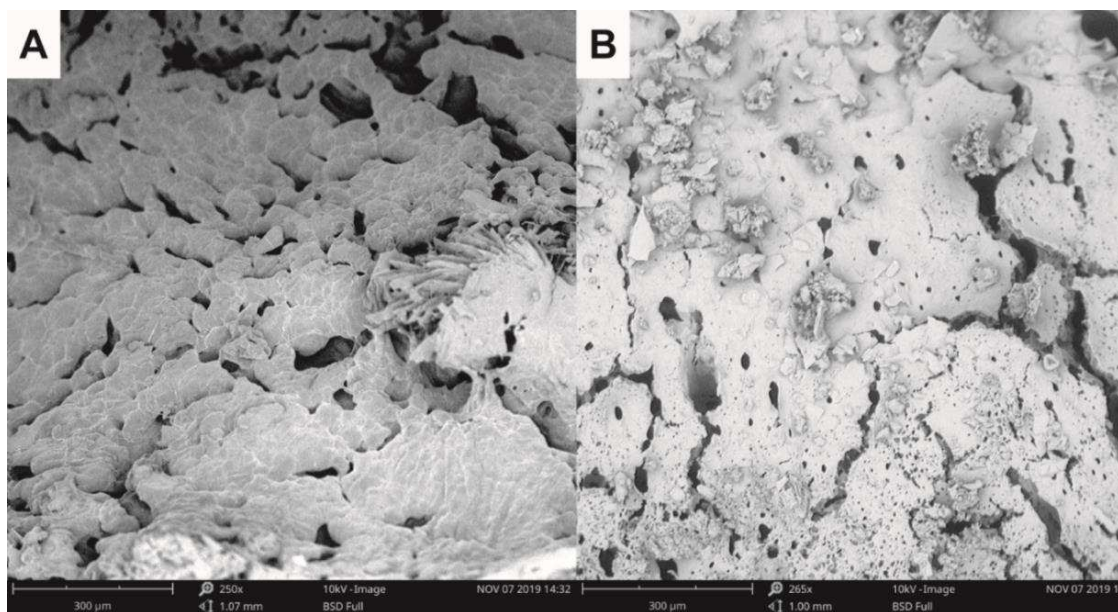
**Figura 3.9** – Análisis elemental sobre diferentes zonas en un implante de PLGA formulado con FF.

Estos resultados se encuentran en concordancia con los perfiles de liberación del principio activo desde las formulaciones P25 y P50, dónde se observa una liberación más rápida en la formulación con una menor cantidad de principio activo, posiblemente asociada a una mayor porosidad de la matriz polimérica y una menor cantidad de FF en forma sólida. En el caso de los implantes sintetizados utilizando EuE100, las imágenes obtenidas pueden observarse en la Figura 3.10. Como se mencionó, un aumento en la cantidad de EuE100 en la formulación produciría un incremento en la liberación del FF. Esto puede asociarse a las diferencias estructurales que pueden apreciarse cuando se comparan los implantes PE15-50 y PE28-50 (Figura 3.10-A y B, respectivamente). El aumento en la cantidad de EuE100 no sólo genera una superficie de alta porosidad, sino que además induce la formación de amplios canales o grietas que atraviesan la estructura del implante de forma transversal. Esta característica permitiría una mayor penetración del medio de liberación y, como consecuencia, podría producir un incremento en la difusión del FF. El implante PE15-50 presenta una matriz más compacta, con menor porosidad, capaz de producir una mayor dificultad para la difusión del PA. Estos hallazgos se encuentran en concordancia con los resultados que surgen de la comparación entre los perfiles de liberación cuando se utilizó una alta proporción de FF y diferentes cantidades de EuE100.



**Figura 3.10** - Imágenes obtenidas mediante SEM de los implantes (A) PE15-50 y (B) PE28-50. (Barra de escala = 200  $\mu\text{m}$ )

La Figura 3.11 muestra las imágenes obtenidas para los implantes sintetizados con EuS100. Como se analizó con anterioridad, al agregar EuS100 se observó en general una disminución en la velocidad de liberación del PA. Los implantes con EuS100 presentan estructuras con una menor cantidad de poros y mayor compactación, lo que podría explicar la ralentización de la liberación de FF al medio acuoso. Por otro lado, si se comparan las estructuras de los implantes PS15-25 y PS28-25 con P25 se pueden notar las diferencias en cuanto a porosidad y compactación. La formulación PS15-25 muestra una estructura menos compacta, lo que puede asociarse a una liberación más rápida del PA debido a un mayor contacto con el medio acuoso de liberación (Ver Figura 3.7).



**Figura 3.11** – Imágenes obtenidas mediante SEM de los implantes (A) PS15-25 y (B) PS28-25. (Barra de escala = 300 µm)

La Figura 3.12 muestra los resultados obtenidos para los estudios de FTIR realizados a los implantes sintetizados, luego de un ciclo de liofilización. La Figura 3.12-A muestra los espectros obtenidos para las formulaciones basadas solamente en el polímero PLGA. Para el FF, las bandas observadas a 3450 y 3320  $\text{cm}^{-1}$  corresponden a las vibraciones de enlaces N-H y O-H, respectivamente. Las señales entre 3000 y 2000  $\text{cm}^{-1}$  se deben a C-H a vibraciones de extensión. Una de las bandas más características de FF es la que se observa a 1680  $\text{cm}^{-1}$  y corresponde a vibraciones de extensión del grupo amida. El espectro de PLGA muestra las bandas correspondientes a C-H entre 3000 y 2000  $\text{cm}^{-1}$  y una pronunciada banda a 1780 debido a las vibraciones del grupo funcional C=O. Si bien no se observan cambios en las posiciones de los picos característicos, se puede apreciar que los estudios permiten confirmar una mayor proporción de principio activo en el caso del implante P50 ya que es notorio el aumento en la intensidad y definición de las bandas características del FF (señaladas mediante flechas en la Figura 3.12-A). La ausencia de interacciones apreciables entre el FF y el PLGA concuerda con los resultados obtenidos en el CAPÍTULO 1 de la presente investigación.

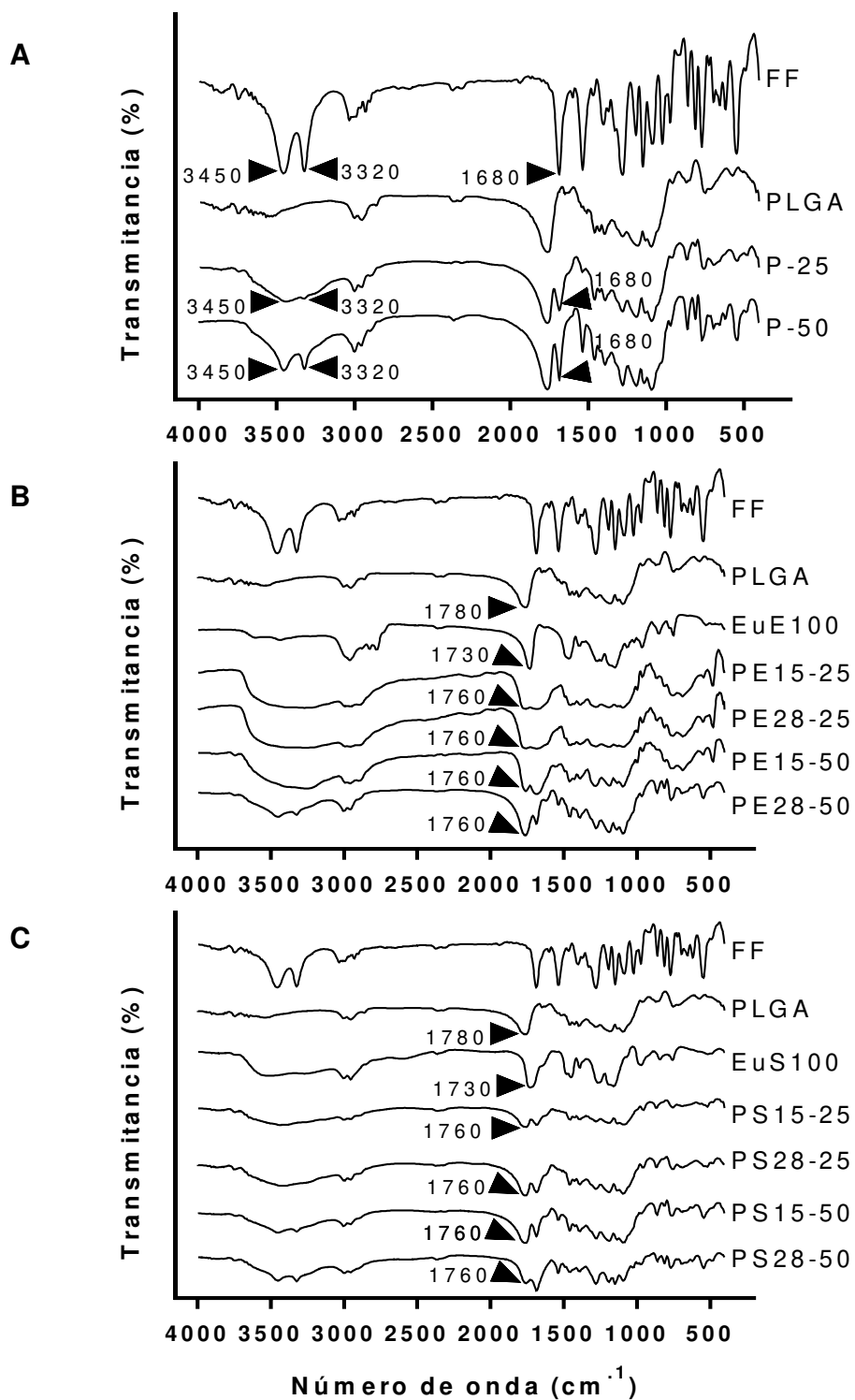
En la Figura 3.12-B pueden observarse los resultados obtenidos para los implantes sintetizados con el agregado de polímero Eudragit E100. Este polímero muestra una banda característica a 1730  $\text{cm}^{-1}$  debido a la presencia de grupos éster. También presenta bandas representativas a 2770 y 2820  $\text{cm}^{-1}$ , que pueden asociarse a grupos dietilamina no ionizados.[133] Señalado por flechas en el gráfico, puede observarse el desplazamiento

### CAPÍTULO 3

que ocurre hacia los  $1760\text{ cm}^{-1}$  de los picos característicos a  $1780$  y  $1730\text{ cm}^{-1}$  de PLGA y el Eu100, respectivamente. Este resultado podría indicar la presencia de interacciones débiles entre los polímeros, confirmando la naturaleza *blend* de la matriz polimérica de los implantes sintetizados.

La Figura 3.12-C muestra los resultados obtenidos para los implantes sintetizados utilizando EuS100 como agregado. En el espectro del Euragit S100 pueden identificarse tres picos principales: a  $2950\text{ cm}^{-1}$  debido a la presencia de grupos oxhidrilos carboxílicos, a  $1730\text{ cm}^{-1}$  por la presencia de funciones tipo éster y a  $1450\text{ cm}^{-1}$  por la presencia de grupos metilos.[134] Al igual que lo observado en el caso de la utilización del EuE100, puede observarse un corrimiento de las bandas hacia la posición  $1760\text{ cm}^{-1}$  de las bandas características observadas a  $1780$  y  $1730\text{ cm}^{-1}$  del EuE100 y el PLGA, respectivamente. De la misma forma, este resultado podría indicar la formación de una matriz polimérica tipo *blend* en los implantes sintetizados.

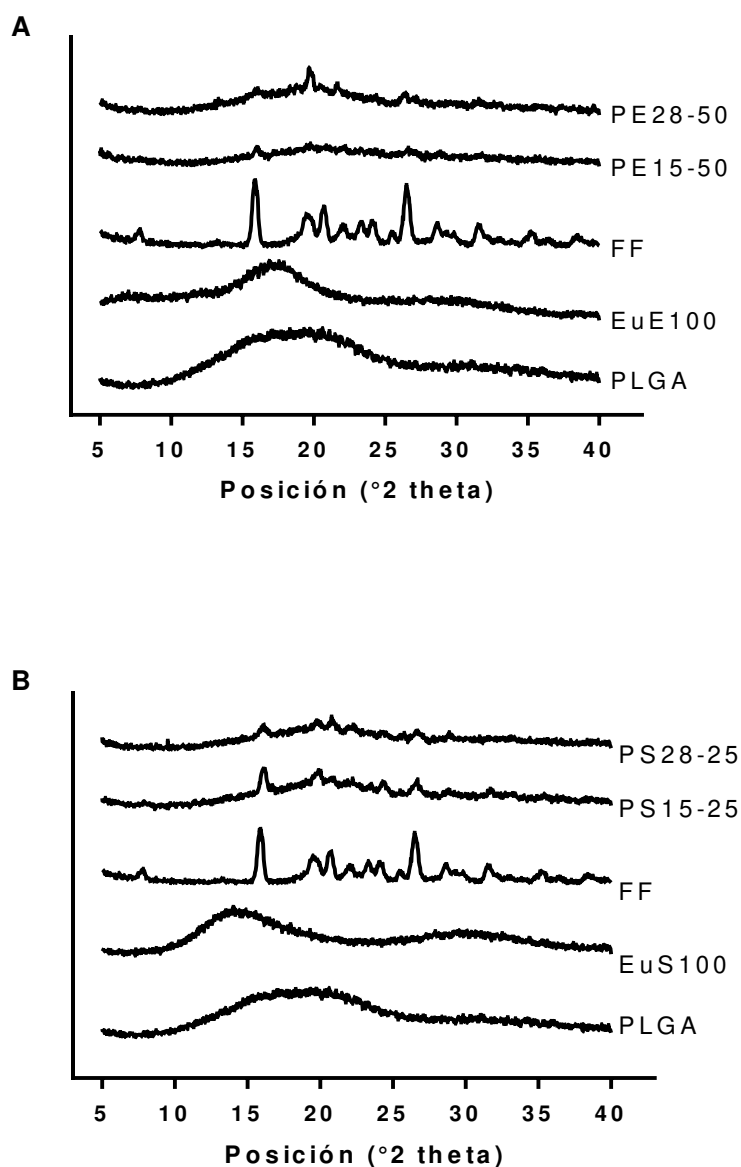
### CAPÍTULO 3



**Figura 3.12** – Resultados obtenidos para los estudios mediante FTIR para las diferentes formulaciones utilizadas en las síntesis de IFIS-IS.

### CAPÍTULO 3

En la Figura 3.13 pueden observarse los resultados de los estudios de DRX para las diferentes formulaciones utilizadas. Se analizaron las formulaciones cuyos perfiles de liberación presentaron diferencias de interés. Las señales características del FF pueden observarse a 8.10, 16.21 y 26.85°. [112]



**Figura 3.13** - Difractogramas obtenidos por difracción de RX para los implantes formulados con (A) EuE100 y (B) EuS100. Se incluyen los estudios para los componentes puros.

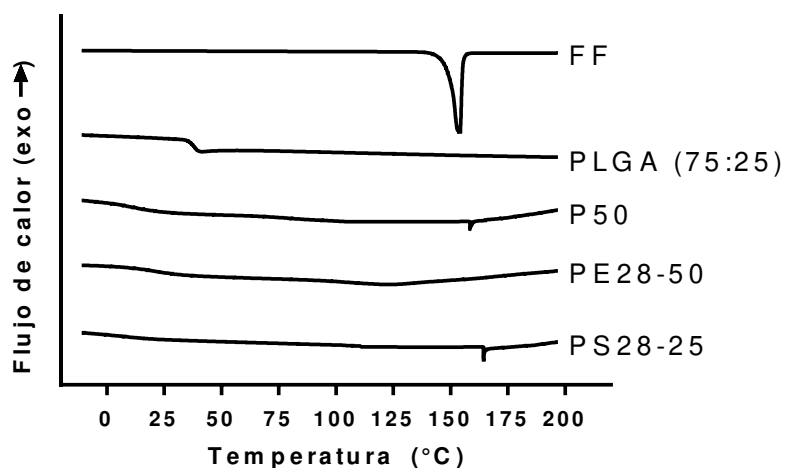
Al introducir el polímero EuE100 (Figura 3.13-A) en las formulaciones se observa una disminución considerable en las señales correspondientes a los cristales de FF. Esto podría indicar que la presencia de este polímero podría inducir la formación parcial de estructuras amorfas durante la síntesis de IFIS-IS y la precipitación del principio

### CAPÍTULO 3

activo.[135] Este fenómeno puede considerarse ventajoso en tanto la utilización de EuE100 permite estabilizar el principio activo en su forma amorfa, evitando su recristalización durante las etapas de síntesis y de liberación.[136] Por otro lado, al agregar EuS100 (Figura 3.13-B) a las formulaciones precursoras de los implantes, los espectros de DRX muestran las señales características de las estructuras cristalinas del FF, indicando que durante la síntesis del IFIS-IS el principio activo cristaliza entre la matriz polimérica amorfa.[30] Las estructuras de tipo amorfa presentan un proceso de disolución más acelerado que en el caso de las redes cristalinas debido a que es un proceso termodinámicamente más favorable. Este fenómeno genera una disminución en los tiempos de liberación del principio activo desde el implante. Estos resultados son congruentes con lo observado en los perfiles de liberación *in vitro*.

Los resultados obtenidos mediante la técnica DSC, para las formulaciones de mayor interés, se muestran en la Figura 3.14. El pico de fusión característico del florfenicol se puede visualizar a los 152° C en el estudio con el principio activo de manera individual.[112,113] Por otro lado, la transición vítrea del PLGA (75:25) utilizado se observa a aproximadamente 37-38°C [137]. La formulación P50 presenta un pico de fusión a los 155°C, este podría asociarse al principio activo, con un corrimiento debido a la posible presencia de interacciones con la matriz polimérica. En la formulación PE28-50 no puede apreciarse el pico característico del FF, lo que estaría en concordancia con las estructuras amorfas del PA, cuando se agrega EuE100 a los IFIS-IS. Por otro lado, en la formulación PS28-25, se puede evidenciar un pico de fusión a los 160°C, asociable a la fusión de los cristales de FF, con un corrimiento térmico posiblemente debido a las interacciones con el *blend* polimérico PLGA-EuS100. Los resultados obtenidos en los ensayos de DSC son consistentes con los obtenidos en los estudios de FTIR y DRX. No se pudieron evidenciar fenómenos térmicos asociados a los polímeros, lo que podría deberse a las proporciones utilizadas en las diferentes formulaciones y los intervalos de temperatura estudiados.

### CAPÍTULO 3



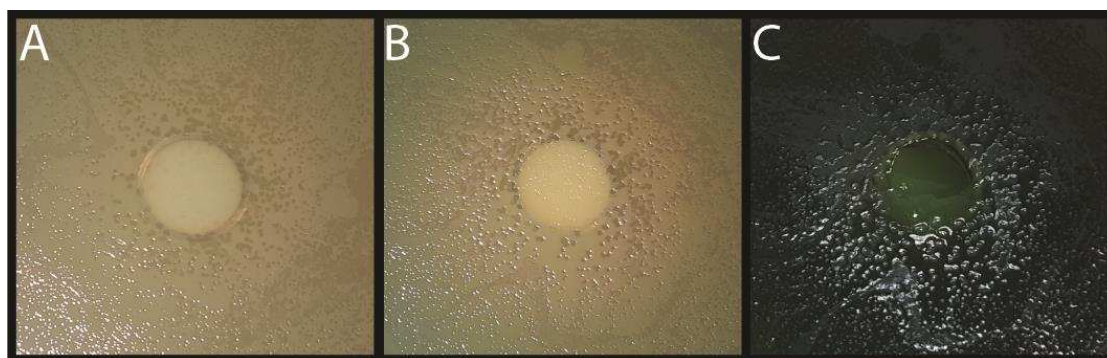
**Figura 3.14** - Resultados obtenidos por DSC para las formulaciones más importantes utilizadas para la síntesis de IFIS-IS.

Para los ensayos microbiológicos se utilizaron las formulaciones con EuE100 agregado y la mayor proporción de FF. Esta decisión se tomó debido a la marcada diferencia que existió entre los perfiles de liberación con diferentes niveles de EuE100.

La Figura 3.15 muestra la evolución de la población bacteriana en un ensayos con un implante de PLGA-EuE100 sin el principio activo florfenicol. Como puede observarse, a las 24 h (Figura 3.15-A), ya se encuentra colonizada tanto la cercanía del implante como la placa en general. Luego, a las 48 h (Figura 3.15-B) se observa tanto un aumento en la densidad de población bacteriana como un comienzo de producción de pigmentación de coloración verde. Esta pigmentación se asocia con una actividad del tipo *quorum sensing*, relacionada con una intensa formación de *biofilm* y establecimiento de la población bacteriana.[138] Ya a los 12 días de iniciado el ensayo (Figura 3.15-C), se observa una clara colonización completa de todo el agar, con una intensa coloración verde y un avance en la colonización sobre el implante mismo. Lo observado podría deberse a la ausencia de principio activo y a la incapacidad de generar un efecto anti-bacteriano por parte de los polímeros utilizados, permitiendo el desarrollo de un *quorum sensing* efectivo, la producción de *biofilm* y la utilización de los componentes presentes para la subsistencia.

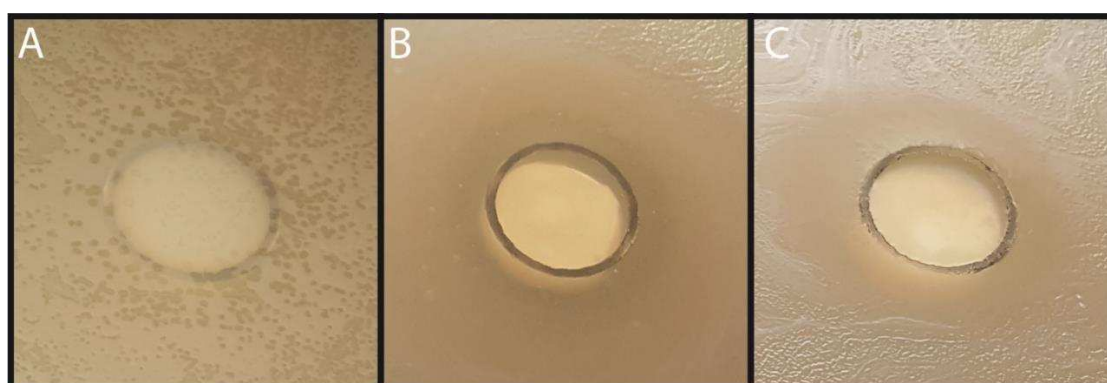


### CAPÍTULO 3



**Figura 3.15** – Evolución del ensayo microbiológico cualitativo cuando se utiliza un implante formulado sin FF.

En la Figura 3.16 puede observarse los resultados obtenidos para los ensayos microbiológicos con los implantes sin FF (Figura 3.16-A), PE15-50 (Figura 3.16-B) y PE28-50 (Figura 3.16-C), luego de 24h de incubación. Es apreciable, la presencia de un halo de inhibición en los casos de los implantes formulados con FF. Además, el implante PE28-50 presenta un halo de inhibición ligeramente superior, lo que puede asociarse a una mayor liberación de FF en las primeras 24h. Esto concuerda con lo observado en los ensayos de liberación *in vitro* en medio líquido. Es también notable, en el caso de ambos implantes formulados, la ausencia de colonización bacteriana en la zona en contacto directo con el IFIS-IS, indicando una inhibición del crecimiento bacteriano en las tres dimensiones del medio agarizado.

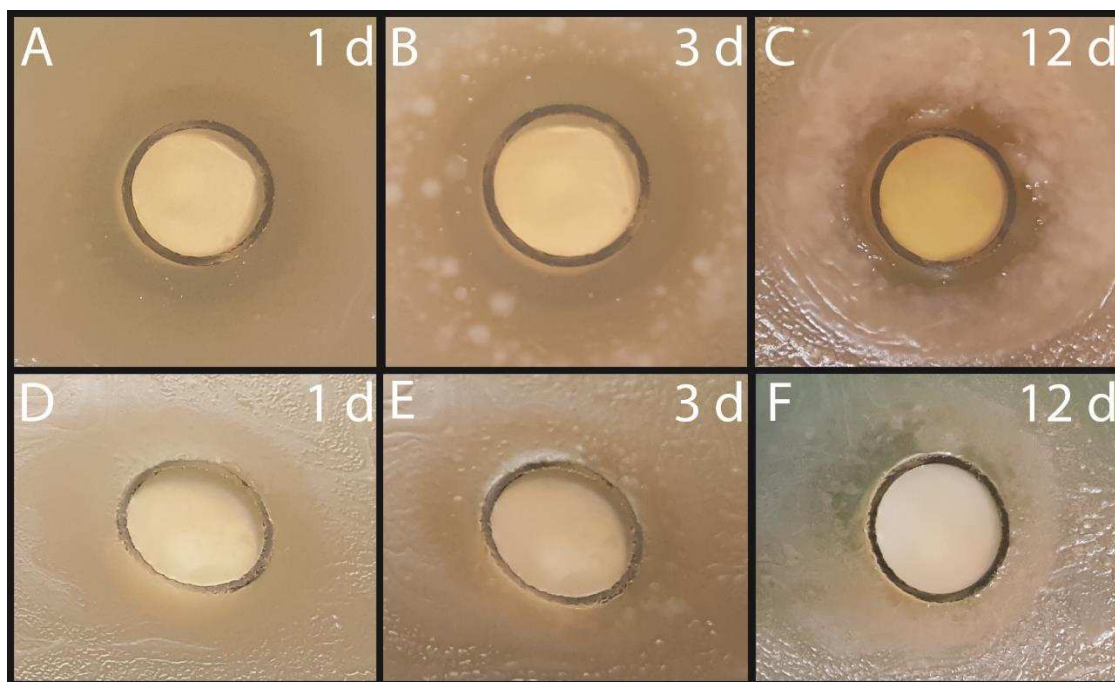


**Figura 3.16** – Resultados de los ensayos microbiológicos cualitativos, a 24hs de iniciados, para los implantes (A) sin FF, (B) PE15-50 y (C) PE28-50.

La Figura 3.17 permite observar la evolución del crecimiento bacteriano, para los implantes PE15-50 y PE28-50, a 1, 3 y 12 días de iniciado el ensayo. Los implantes son capaces de un mantener un halo de inhibición en las primeras 24h, siendo mayor en el

### CAPÍTULO 3

caso del implante PE28-50. En los días posteriores, se puede apreciar un avance en el crecimiento bacteriano sobre las zonas cercanas al implante. Sin embargo, el medio de cultivo que se encuentra en contacto directo con las formulaciones se mantiene libre de crecimiento bacteriano. Si se comparan estos resultados con la formulación sin FF (Figura 3.15), se evidencia una clara inhibición del crecimiento de los microorganismos durante 12 días de ensayo continuo.



**Figura 3.17** – Evolución de los ensayos microbiológicos cualitativos, a 1, 3 y 12 días de iniciados, para los implantes (A-C) PE15-50 y (D-F) PE28-50.

### CONCLUSIONES PRELIMINARES

La utilización de sistemas poliméricos basados en implantes de formación *in situ* para la liberación controlada de florfenicol representa una importante oportunidad para el diseño de terapias con minimización del número de dosis. Por otro lado, la utilización de diferentes tipos de materiales poliméricos para lograr las cinéticas de liberación adecuadas es un campo de amplio interés para el desarrollo de nuevas tecnologías farmacéuticas.

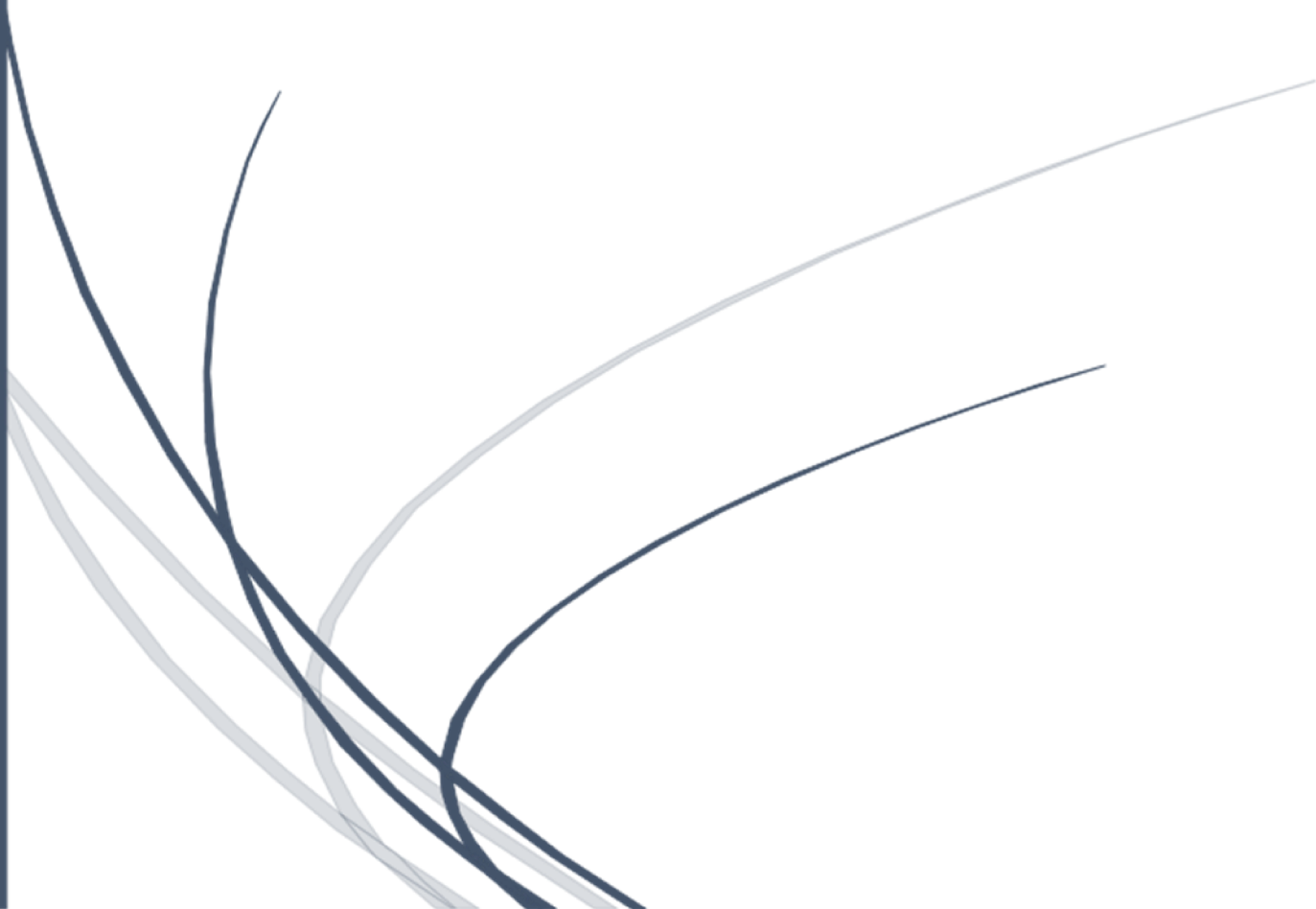
En primer lugar, se estudiaron las condiciones de síntesis de implantes de formación *in situ* por la metodología de intercambio de solvente, utilizando el polímero biocompatible y biodegradable PLGA en combinación con biopolímeros biocompatibles del tipo Eudragit. La combinación de este tipo de materiales permitió un aumento de la encapsulación del principio activo, disminuyendo el efecto *burst* durante la precipitación polimérica.

Luego, se estudiaron los perfiles de liberación de FF en un medio acuoso. Cuando se utilizó el polímero catiónico Eudragit E100 y al aumentar la cantidad del mismo, la liberación del principio activo se vio favorecida. Este fenómeno pudo deberse, principalmente, a que la acumulación de productos ácidos provenientes de la degradación del PLGA fueron capaces de inducir la solubilización del Eu100 por disminución del pH, desestabilizando la matriz polimérica e incrementando la liberación del PA. Por otro lado, la presencia de cargas positivas en la matriz polimérica podría generar fuerzas repulsivas con el FF. Por el contrario, cuando se utilizó el Eudragit aniónico S100, la liberación de FF se vio ralentizada. Esto puede explicarse si se tiene en cuenta que la acumulación de productos ácidos de la degradación hidrolítica del PLGA son capaces de disminuir la solubilidad del EuS100 por disminución del pH, estabilizando la matriz polimérica y demorando la liberación del PA.

Los estudios cualitativos de eficacia microbiológica permitieron evidenciar que los IFIS-IS, son capaces de inhibir el desarrollo de la cepa bacteriana *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Se comprobó que los IFIS-IS sin principio activo no tienen la capacidad antimicrobiana y que, una vez introducido el FF en las formulaciones, estas son capaces de mantener una zona libre de microorganismos durante un plazo de hasta 12 días, en un medio agarizado con una disponibilidad acuosa reducida (semi-sólido).



# CONCLUSIONES GENERALES





## CONCLUSIONES GENERALES

La liberación controlada de drogas ha ganado una notoria atención en las últimas décadas. Se ha convertido en una importante plataforma tecnológica para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas debido a la posibilidad de resolver problemáticas relacionadas con el número de dosis y los efectos secundarios de los principios activos. Además, resulta una importante oportunidad para la disminución de costos en la industria farmacéutica ya que permite el reposicionamiento de principios activos, evitando las altas erogaciones asociadas al desarrollo de nuevos fármacos.

La utilización de polímeros para el desarrollo de este tipo de sistemas se ha convertido en un foco de gran interés en el ámbito científico-tecnológico. La versatilidad de los polímeros permite atender las múltiples demandas que el campo de la medicina humana y veterinaria requieren. La posibilidad de generar matrices poliméricas con las geometrías y las características fisicoquímicas necesarias impulsan el desarrollo de los sistemas de liberación controlada basadas en este tipo de materiales.

La encapsulación y liberación controlada de antibióticos es un campo de gran interés en las industrias de sanidad humana y animal. Entre los diferentes PA, el florfenicol surge como un candidato para utilizarse en este tipo de tecnologías debido a diversas complicaciones relacionadas con la preparación de formulaciones eficaces y la necesidad de una dosificación múltiple. Por otro lado, su bajo peso molecular, su característica lipofílicidad y su leve hidrofílicidad lo vuelven un interesante candidato como droga modelo para el diseño de sistemas de liberación controlada versátiles.

El presente trabajo de investigación permitió comparar diferentes sistemas poliméricos, compuestos por materiales sintéticos y naturales, para la liberación controlada del antibiótico florfenicol. Se diseñaron sistemas en diferentes escalas de tamaño y con variadas geometrías, generándose diversas opciones en cuanto a las vías de administración: vía parenteral, para el caso de las nano- y micropartículas; vía oral al utilizar *beads* o esferas de diámetro milimétrico; y vía muscular o dérmica en el caso de los implantes de formación *in situ*.

Por otro lado, la combinación de diversos tipos de polímeros con la adopción de diferentes geometrías y escalas de tamaño, permitió obtener características específicas en términos de eficiencia de carga y velocidad de liberación del principio activo. Mientras que en el caso de las nano- y micropartículas de PLGA se obtuvieron bajos porcentajes de encapsulación y rápidas liberaciones de florfenicol, la utilización de sistemas de mayor tamaño, ya sea utilizando *blends* alginato-Eudragit o PLGA-Eudragit, permitieron aumentar las eficiencias de encapsulación como también lograr liberaciones más

## CONCLUSIONES GENERALES

controladas y extendidas en el tiempo. Además, se lograron características diferenciadas como la responsividad ante distintas condiciones de liberación. Estos resultados permiten vislumbrar la posibilidad de combinar polímeros ampliamente reportados en la bibliografía para obtener nuevas posibilidades en tecnologías de liberación controlada. No obstante, se deben tener en cuenta las particularidades de las metodologías de síntesis ya que ciertas características como las fuerzas de homogeneización y los solventes utilizados cumplen un rol fundamental en la determinación de las propiedades de los sistemas preparados.

También, a través de estudios específicos, se pudieron correlacionar las características fisicoquímicas y morfológicas de los diferentes sistemas con los fenómenos involucrados en las eficiencias de encapsulación y las velocidades de liberación del principio activo estudiado. En el caso del florfenicol, la posibilidad de trabajar con altas cargas del PA permiten modular las cinéticas de liberación a través de la imposición de pasos de disolución de las estructuras sólidas de la droga. Por otro lado, debido al pequeño tamaño molecular del florfenicol y a su leve afinidad por el medio acuoso, las interacciones con las matrices poliméricas resultan débiles y no serían la clave en las cinéticas de liberación observadas, ganando preponderancia la disposición y tortuosidad de la red polimérica cómo así también sus características hidrofílicas e hidrofóbicas, propiedades que afectan directamente el proceso difusivo de la droga en la matriz.

Para evaluar posibles fenómenos de sinergismo PA-polímeros y confirmar que durante los diferentes procesos de síntesis el PA no sufría modificaciones o interacciones que le impidieran actuar frente a las diferentes clases de microorganismos, se llevaron a cabo estudios de eficacia microbiológica. En todos los casos se pudo verificar la inalterabilidad del florfenicol, confirmando la viabilidad de los métodos desarrollados para el caso de esta droga. Además, se pudieron correlacionar los resultados de los ensayos microbiológicos con las diferentes características de los sistemas diseñados. Tanto en medios de cultivos sólidos como líquidos, los diferentes sistemas mostraron su aplicabilidad tecnológica pudiendo combatir los microorganismos con eficacia y en diferentes escalas temporales. Todos los sistemas fueron capaces de liberar el florfenicol a una velocidad, al menos suficiente, para combatir el crecimiento microbiano. Estos resultados permiten acercarse a posibles aplicaciones y avanzar en ensayos de eficacia posteriores con mayor certeza.



## CONCLUSIONES GENERALES

### **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Si bien el presente trabajo de investigación profundizó ampliamente en el desarrollo y caracterización de diversos sistemas poliméricos para la liberación controlada de florfenicol, se proponen como tareas futuras el diseño de terapias y sus respectivas pruebas *in vivo* como etapas ineludibles para verificar la aplicabilidad de los sistemas. Por otro lado, se vuelve de suma importancia profundos estudios de mercado para conocer la viabilidad de la producción en escala y la implementación económica de un producto de forma eficaz.

En términos académicos y tecnológicos, se propone investigar sobre modificaciones químicas, tanto en los polímeros como en el principio activo, generando nuevas propiedades en los sistemas desarrollados.



# BIBLIOGRAFÍA

- [1] H Patel, DR Panchal, U Patel, T Brahmabhatt, M Suthar (2011) Matrix Type Drug Delivery System : A Review. *JPSBR*. 1 143–151.
- [2] G Winzenburg, C Schmidt, S Fuchs, T Kissel (2004) Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 1453–66.
- [3] BK Lee, YH Yun, K Park (2015) Smart nanoparticles for drug delivery: Boundaries and opportunities. *Chem. Eng. Sci.* 125 158–164.
- [4] A Burgess, K Shah, O Hough, K Hynynen (2016) HHS Public Access. 15 477–491.
- [5] M. Hans, A. Lowman (2002) Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 6 319–327.
- [6] Y Fu, WJ Kao (2010) Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 7 429–444.
- [7] TR Hoare, DS Kohane (2008) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer (Guildf)*. 49 1993–2007.
- [8] P Gupta, K Vermani, S Garg (2002) Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov. Today*. 7 569–579.
- [9] SA Abouelmagd, B Sun, AC Chang, YJ Ku, Y Yeo (2015) Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: Are we doing it right? *Mol. Pharm.* 12 997–1003.
- [10] S Boimvaser, RN Mariano, LN Turino, JR Vega (2016) In vitro bulk/surface erosion pattern of PLGA implant in physiological conditions: a study based on auxiliary microsphere systems. *Polym. Bull.* 73 209–227.
- [11] M Lu, T Wang, X Li, W Zhou, X Chen (2015) Preparation, characterisation and antibacterial activity of a florfenicol-loaded solid lipid nanoparticle suspension. *IET Nanobiotechnology*. 9 355–361.
- [12] DH Mobarak, S Salah, S a Elkheshen (2014) Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: optimization of technique and process variables. *Pharm. Dev. Technol.* 19 891–900.
- [13] Y Sun, DW Scruggs, Y Peng, JR Johnson, AJ Shukla (2004) Issues and challenges

## BIBLIOGRAFÍA

- in developing long-acting veterinary antibiotic formulations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 1481–1496.
- [14] MJ Rathbone, MN Martinez (2002) Modified release drug delivery in veterinary medicine. *Drug Discov. Today.* 7 823–829.
- [15] HK Makadia, SJ Siegel (2011) Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 3 1377–1397.
- [16] TG Park (1995) Degradation of poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres: Effect of copolymer composition. *Biomaterials.* 16 1123–1130.
- [17] T Casalini, F Rossi, S Lazzari, G Perale, M Masi (2014) Mathematical modeling of PLGA microparticles: From polymer degradation to drug release. *Mol. Pharm.* 11 4036–4048.
- [18] MR Rubio, ES Ghaly (1994) In-vitro release of acetaminophen from sodium alginate controlled release pellets. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20 1239–1251.
- [19] Y Tang, SS Venkatraman, FYC Boey, L Wang (2007) Sustained release of hydrophobic and hydrophilic drugs from a floating dosage form. *Int. J. Pharm.* 336 159–165.
- [20] MK Chourasia, SK Jain (2003) Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 6 33–66.
- [21] AK Anal, D Bhowmik, H Gopinath, BP Kumar, S Duraivel, KPS Kumar, G Borkow, J Gabbay, RC Zatcoff, P Costa, JM Sousa Lobo, WI Higuchi, H Sciences, S Dash, PN Murthy, L Nath, P Chowdhury, HK Shaikh, R V Kshirsagar, SG Patil, X Tian, Z Zhang, S Wang, Y Diao, Z Zhao, D Lv, S Ummadi, B Shrivani, NGR Rao, MS Reddy, B Sanjeev, SM Taghizadeh, A Soroushnia, F Mohamadnia (2010) Modeling and comparison of dissolution profiles. *Med. Hypotheses.* 13 123–133.
- [22] JMS Costa, P., & Lobo (2001) Modelling and Comparison of Dissolution Profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 123–133.
- [23] S Fredenberg, M Wahlgren, M Reslow, A Axelsson (2011) The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems - A review. *Int. J. Pharm.* 415 34–52.
- [24] HA Andretta (2003) Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de distintos modelos. *Lat. Am. J. Pharm.* 22 355–363.
- [25] S Dash, PN Murthy, L Nath, P Chowdhury (2010) Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol. Pharm.* 67 217–23.
- [26] CK Sackett, B Narasimhan (2011) Mathematical modeling of polymer erosion :

## BIBLIOGRAFÍA

- Consequences for drug delivery. *Int. J. Pharm.* 418 104–114.
- [27] C Busatto, J Pessoa, I Helbling, J Luna, D Estenoz (2017) Effect of particle size, polydispersity and polymer degradation on progesterone release from PLGA microparticles: Experimental and mathematical modeling. *Int. J. Pharm.* 536 360–369.
- [28] LN Turino, RN Mariano, LN Mengatto, JA Luna (2015) In vitro evaluation of suspoemulsions for in situ -forming polymeric microspheres and controlled release of progesterone. *J. Microencapsul.* 32 538–546.
- [29] Z Rahman, AS Zidan, MJ Habib, M a Khan (2010) Understanding the quality of protein loaded PLGA nanoparticles variability by Plackett-Burman design. *Int. J. Pharm.* 389 186–94.
- [30] NK Thakral, AR Ray, DK Majumdar (2010) Eudragit S-100 entrapped chitosan microspheres of valdecoxib for colon cancer. 2691–2699.
- [31] F Arriagada, G Günther, I Zabala, J Rubio-Retama, J Morales (2019) Development and Characterization of Florfenicol-Loaded BSA Nanoparticles as Controlled Release Carrier. *AAPS PharmSciTech.* 20 202.
- [32] N Alvis-Guzman, F De la Hoz-Restrepo, H Pinzon-Redondo (2017) Economic impact of infections and antibiotics. *Sepsis, Third Ed.* 11–24.
- [33] WA Adedeji (2016) the Treasure Called Antibiotics. *Ann. Ibadan Postgrad. Med.* 14 56–57.
- [34] KM Overbye, JF Barrett (2005) Antibiotics: Where did we go wrong? *Drug Discov. Today.* 10 45–52.
- [35] AW Smith (2005) Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 1539–1550.
- [36] I Ahmed (2002) Pharmaceutical challenges in veterinary product development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 871–882.
- [37] C Esperbent, M Migliorati (2017) Bacterias multirresistentes : una amenaza oculta que crece. *Rev. Investig. Agropecu.* 43 6–10.
- [38] S Schwarz, C Kehrenberg, TR Walsh (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 17 431–437.
- [39] AR Nisha (2008) Antibiotic Residues - A Global Health Hazard. *Vet. World.* 1 375–377.

## BIBLIOGRAFÍA

- [40] IFPMA (2017), The Pharmaceutical Industry and Global Health: Facts And Figures - 2017.
- [41] B Park, J Lim, M Kim, Y Hwang, H Yun (2008) Pharmacokinetics of florfenicol and its metabolite , florfenicol amine , in dogs. *Res. Vet. Sci.* 84 85–89.
- [42] MG Papich (2016) Florfenicol. *Saunders Handb. Vet. Drugs.* 327–329.
- [43] A Anadón, A Martínez, M Martínez, A Ríos, V Caballero, A Irma, MR Larrañaga-Martínez (2008) Plasma and Tissue Depletion of Florfenicol and Florfenicol-amine in Chickens. *J. Agric. Food Chem.* 56 11049–11056.
- [44] KL Garrison, S Sahin, LZ Benet (2015) Few Drugs Display Flip-Flop Pharmacokinetics and These Are Primarily Associated with Classes 3 and 4 of the BDDCS. *J. Pharm. Sci.* 104 3229–3235.
- [45] S Schwarz, C Kehrenberg, B Doublet, A Cloeckaert (2004) Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol. Rev.* 28 519–542.
- [46] HX Jiang, ZL Zeng, ZL Chen, JJ Liu, KF Fung (2006) Pharmacokinetics of florfenicol in pigs following intravenous, intramuscular or oral administration and the effects of feed intake on oral dosing. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29 153–156.
- [47] CF Wei, SK Chang, JH Shien, HC Kuo, WY Chen, CC Chou (2016) Synergism between two amphenicol of antibiotics, florfenicol and thiamphenicol, against *Staphylococcus aureus*. *Vet. Rec.* 178 319.
- [48] Q Zhang, SS Tang, MY Qian, L Wei, D Zhou, ZJ Zhang, JK He, QJ Zhang, P Zhu, XL Xiao (2016) Nanoemulsion formulation of florfenicol improves bioavailability in pigs. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 39 84–89.
- [49] C Michel, B Kerouault, C Martin (2003) Chloramphenicol and florfenicol susceptibility of fish-pathogenic bacteria isolated in France: Comparison of minimum inhibitory concentration, using recommended provisory standards for fish bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 95 1008–1015.
- [50] M Switała, R Hrynyk, A Smutkiewicz, K Jaworski, P Pawlowski, P Okoniewski, T Grabowski, J Debowy (2007) Pharmacokinetics of florfenicol, thiamphenicol, and chloramphenicol in turkeys. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 30 145–150.
- [51] M Song, Y Li, A Ning, S Fang, B Cui (2010) Silica nanoparticles as a carrier in the controlled release of florfenicol. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 20 349–352.
- [52] X Kou, Q Li, J Lei, L Geng, H Deng, G Zhang, G Ma, Z Su, Q Jiang (2012) Preparation of molecularly imprinted nanospheres by premix membrane

## BIBLIOGRAFÍA

- emulsification technique. *J. Memb. Sci.* 417–418 87–95.
- [53] C Rogel, N Mendoza, J Troncoso, J González, C Von Plessing (2011) Formulation and characterization of inclusion complexes using hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and florfenicol with chitosan microparticles. *J. Chil. Chem. Soc.* 56 574–579.
- [54] Z Ling, L Yonghong, S Changqing, L Junfeng, Z Li, J Chunyu, L Xianqiang (2017) Preparation, characterization, and pharmacokinetics of tilmicosin- and florfenicol-loaded hydrogenated castor oil-solid lipid nanoparticles. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 40 293–303.
- [55] RA Pinto, PM Torres, JE Luengo, CP Gomez, JM Troncoso, M Schneider, CG Von Plessing (2014) Development and characterization of PLGA nanoparticles loaded with florfenicol. *Lat. Am. J. Pharm.* 33 1–17.
- [56] LN Turino, B Stella, F Dosio, JA Luna, AA Barresi (2018) Nanoparticles obtained by confined impinging jet mixer: poly(lactide- co -glycolide) vs. Poly- $\epsilon$ -caprolactone. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 6 934–941.
- [57] T Feczko, J Tóth, G Dósa, J Gyenis (2011) Influence of process conditions on the mean size of PLGA nanoparticles. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 50 846–853.
- [58] A Patel, T Ansari, P Vimal, M Goyani, A Deshmukh, B Akbari (2015) Review on PLGA Based Solvent Induced In- situ Forming Implant. *Inven. Spreading Knowl.* 2015 1–14.
- [59] Y Sun, H Jensen, NJ Petersen, SW Larsen, J Østergaard (2018) Concomitant monitoring of implant formation and drug release of in situ forming poly (lactide-co-glycolide acid) implants in a hydrogel matrix mimicking the subcutis using UV–vis imaging. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 150 95–106.
- [60] Sonam, H Chaudhary, V Kumar (2014) Taguchi design for optimization and development of antibacterial drug-loaded PLGA nanoparticles. *Int. J. Biol. Macromol.* 64 99–105.
- [61] C Busatto, J Pesoa, I Helbling, J Luna, D Estenoz (2017) Heterogeneous hydrolytic degradation of poly(lactic- co -glycolic acid) microspheres: Mathematical modeling. *J. Appl. Polym. Sci.* 134 45464.
- [62] RM Mainardes, RC Evangelista (2005) PLGA nanoparticles containing praziquantel: Effect of formulation variables on size distribution. *Int. J. Pharm.* 290 137–144.
- [63] RH Staff, D Schaeffel, A Turshatov, D Donadio, HJ Butt, K Landfester, K Koynov,

## BIBLIOGRAFÍA

- D Crespy (2013) Particle formation in the emulsion-solvent evaporation process. *Small*. 9 3514–3522.
- [64] E Cohen-Sela, M Chorny, N Koroukhov, HD Danenberg, G Golomb (2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control. Release*. 133 90–95.
- [65] JM Barichello, M Morishita, K Takayama, T Nagai (1999) Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 25 471–476.
- [66] H Murakami, M Kobayashi, H Takeuchi, Y Kawashima (1999) Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 187 143–52.
- [67] RA Jain, CT Rhodes, AM Railkar, AW Malick, NH Shah (2000) Controlled delivery of drugs from a novel injectable in situ formed biodegradable PLGA microsphere system. *J. Microencapsul.* 17 343–362.
- [68] T Feczko, J Tóth, G Dósa, J Gyenis (2011) Optimization of protein encapsulation in PLGA nanoparticles. *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 50 757–765.
- [69] X Li, S Xie, Y Pan, W Qu, Y Tao, D Chen, L Huang, Z Liu, Y Wang, Z Yuan (2016) Preparation, characterization and pharmacokinetics of doxycycline hydrochloride and florfenicol polyvinylpyrrolidone microparticle entrapped with hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes suspension. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 141 634–642.
- [70] JM Hayes, J Eichman, T Katz, R Gilewicz (2003) Stability of florfenicol in drinking water. *J. AOAC Int.* 86 22–29.
- [71] LA Clementi, JR Vega, LM Gugliotta (2010) Particle size distribution of multimodal polymer dispersions by multiangle dynamic light scattering. Solution of the inverse problem on the basis of a genetic algorithm. *Part. Part. Syst. Charact.* 27 146–157.
- [72] GA Islan, N Duran, PC Tornello, GA Abraham, GR Castro (2016) Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 143 168–176.
- [73] LM Gugliotta, JR Vega, eds. (2010), Measurement of Particle Size Distribution of Polymer Latexes, Santa Fe.
- [74] DK Sahana, G Mittal, V Bhardwaj, MNV Ravi Kumar (2008) PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on



## BIBLIOGRAFÍA

- Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug. *J. Pharm. Sci.* 97 1530–1542.
- [75] C Wischke, SP Schwendeman (2008) Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. *Int. J. Pharm.* 364 298–327.
- [76] H Murakami, M Kobayashi, H Takeuchi, Y Kawashima (2000) Further application of a modified spontaneous emulsification solvent diffusion method to various types of PLGA and PLA polymers for preparation of nanoparticles. *Powder Technol.* 107 137–143.
- [77] T Feczko, J Tóth, J Gyenis (2008) Comparison of the preparation of PLGA-BSA nano- and microparticles by PVA, poloxamer and PVP. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 319 188–195.
- [78] HS Mansur, CM Sadahira, AN Souza, AAP Mansur (2008) FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Mater. Sci. Eng. C.* 28 539–548.
- [79] P Lan, L Jia (2006) Thermal properties of copoly(L-lactic acid/glycolic acid) by direct melt polycondensation. *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.* 43 1887–1894.
- [80] T Govender, S Stolnik, MC Garnett, L Illum, SS Davis (1999) PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: drug loading and release studies of a water soluble drug. *J. Control. Release.* 57 171–85.
- [81] OI Corrigan, X Li (2009) Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *Eur. J. Pharm. Sci.* 37 477–485.
- [82] P Zakeri-Milani, BD Loveymi, M Jelvehgari, H Valizadeh (2013) The characteristics and improved intestinal permeability of vancomycin PLGA-nanoparticles as colloidal drug delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 103 174–181.
- [83] C Rodrigues de Azevedo, M von Stosch, MS Costa, AM Ramos, MM Cardoso, F Danhier, V Pr at, R Oliveira (2017) Modeling of the burst release from PLGA micro- and nanoparticles as function of physicochemical parameters and formulation characteristics. *Int. J. Pharm.* 532 229–240.
- [84] CSJ Campbell, MB Delgado-Charro, O Camus, S Perera (2016) Comparison of drug release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres and novel fibre formulations. *J. Biomater. Appl.* 30 1142–1153.
- [85] (N.d.) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database.

## BIBLIOGRAFÍA

- Oxytetracycline hydrochloride, CID=54680782.
- [86] (N.d.) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Tilmicosin, CID=5282521.
- [87] (N.d.) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Florfenicol, CID=114811.
- [88] AN Ford, DW Pack, RD Braatz (2011) Multi-Scale Modeling of PLGA Microparticle Drug Delivery Systems. *Comput. Aided Chem. Eng.* 29 1475–1479.
- [89] GA Islan, GR Castro (2014) Tailoring of alginate-gelatin microspheres properties for oral Ciprofloxacin-controlled release against *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Deliv.* 21 615–626.
- [90] GA Islan, A Mukherjee, GR Castro (2015) Development of biopolymer nanocomposite for silver nanoparticles and Ciprofloxacin controlled release. *Int. J. Biol. Macromol.* 72 740–750.
- [91] DW Lee, SJ Hwang, JB Park, HJ Park (2003) Preparation and release characteristics of polymer-coated and blended alginate microspheres. *J. Microencapsul.* 20 179–192.
- [92] A Ghaffari, K Navaee, M Oskou, K Bayati, M Rafiee-Tehrani (2007) Preparation and characterization of free mixed-film of pectin / chitosan / Eudragit® RS intended for sigmoidal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 67 175–186.
- [93] AO Solak, SM Dyankova (2014) Composite Films from Sodium Alginate and High Methoxyl Pectin - Physicochemical Properties and Biodegradation in Soil. *Ecol. Balk.* 6 25–34.
- [94] PR Hari, T Chandy, CP Sharma (1996) Chitosan/calcium-alginate beads for oral delivery of insulin. *J. Appl. Polym. Sci.* 59 1795–1801.
- [95] L Xing, C Dawei, X Liping, Z Rongqing (2003) Oral colon-specific drug delivery for bee venom peptide: Development of a coated calcium alginate gel beads-entrapped liposome. *J. Control. Release.* 93 293–300.
- [96] S Thakral, NK Thakral, DK Majumdar (2013) Eudragit®: a technology evaluation. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10 131–149.
- [97] K Kaur, K Kim (2009) Studies of chitosan/organic acid/Eudragit® RS/RL-coated system for colonic delivery. *Int. J. Pharm.* 366 140–148.
- [98] KP Seremeta, DA Chiappetta, A Sosnik (2013) Poly( $\epsilon$ -caprolactone), Eudragit® RS 100 and poly( $\epsilon$ -caprolactone)/Eudragit® RS 100 blend submicron particles for the sustained release of the antiretroviral efavirenz.

## BIBLIOGRAFÍA

- Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 102 441–449.
- [99] S Sepúlveda-Rivas, HF Fritz, C Valenzuela, CA Santiviago, JO Morales (2019) Development of Novel EE / Alginate Polyelectrolyte Complex Nanoparticles for Lysozyme Delivery: Physicochemical Properties and In Vitro Safety. *Pharmaceutics*. 11 1–19.
- [100] JW Scannell, A Blanckley, H Boldon, B Warrington (2012) Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov*. 11 191–200.
- [101] Y Liu, L Guo, M Zloh, Y Zhang, J Huang, L Wang (2018) Relevance of Breast Cancer Resistance Protein to Pharmacokinetics of Florfenicol in Chickens: A Perspective from In Vivo and In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci*. 19 1–14.
- [102] P Sidhu, A Rassouli, J Illambas, T Potter, L Pelligand, A Rycroft, P Lees (2014) Pharmacokinetic-pharmacodynamic integration and modelling of florfenicol in calves. *J. Vet. Pharmacol. Ther*. 37 231–242.
- [103] S Wang, N Chen, Y Qu (2011) Solubility of florfenicol in different solvents at temperatures from (278 to 318) K. *J. Chem. Eng. Data*. 56 638–641.
- [104] Z Sun, H Hao, C Xie, Z Xu, Q Yin, Y Bao, B Hou, Y Wang (2014) Thermodynamic Properties of Form A and Form B of Florfenicol.
- [105] J Shah, T Ahmed Qureshi, T Sayed, Q Ali Shah, I Bux Kalhorro, M Arain, M Saeed, F Siyal, Z Ahmed Bhutto (2016) Evaluation of Therapeutic and High Doses of Florfenicol on Some Hematological Indexes in Goat. *Asian J. Anim. Vet. Adv*. 11 637-642.
- [106] M Mancini, M Moresi, R Rancini (1999) Mechanical properties of alginate gels: empirical characterisation. *J. Food Eng*. 39 369–378.
- [107] SM Mitchell, JL Ullman, AL Teel, RJ Watts (2015) Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin. *Chemosphere*. 134 504–511.
- [108] J Klein, J Stock, K Vorlop (1983) Pore Size and Properties of Spherical Ca-Alginate Biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 18 86–91.
- [109] C Maderuelo, A Zarzuelo, JM Lanao (2011) Critical factors in the release of drugs from sustained release hydrophilic matrices. *J. Control. Release*. 154 2–19.
- [110] N Velings, M Mestdagh (1995) Physico-Chemical Properties of Alginate Gel Beads. *Polym. Gels Networks*. 3 311–330.
- [111] GA Islan, IP De Verti, SG Marchetti, GR Castro (2012) Studies of Ciprofloxacin Encapsulation on Alginate / Pectin Matrixes and Its Relationship with

## BIBLIOGRAFÍA

- Biodisponibility. 1408–1420.
- [112] Z Sun, H Hao, C Xie, Z Xu, Q Yin, Y Bao, B Hou, Y Wang (2014) Thermodynamic Properties of Form A and Form B of Florfenicol. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53 13506–13512.
- [113] B Marciniec, M Stawny, M Hofman, M Naskrent (2008) Thermal and spectroscopic analysis of florfenicol irradiated in the solid-state. *J. Therm. Anal. Calorim.* 93 733–737.
- [114] CK Kim, EJ Lee (1992) The controlled release of blue dextran from alginate beads. *Int. J. Pharm.* 79 11–19.
- [115] VR de Ocenda, S Almeida-Prieto, A Luzardo-Álvarez, JL Barja, FJ Otero-Espinar, J Blanco-Méndez (2017) Pharmacokinetic model of florfenicol in turbot (*Scophthalmus maximus*): establishment of optimal dosage and administration in medicated feed. *J. Fish Dis.* 40 411–424.
- [116] RRS Thakur, HL McMillan, DS Jones (2014) Solvent induced phase inversion-based in situ forming controlled release drug delivery implants. *J. Control. Release.* 176 8–23.
- [117] R Astaneh, M Erfan, H Moghimi, H Mobedi (2009) Changes in morphology of in situ forming PLGA implant prepared by different polymer molecular weight and its effect on release behavior. *J. Pharm. Sci.* 98 135–145.
- [118] RE Eliaz, J Kost (1999) Characterization of a polymeric PLGA-injectable implant delivery system for the controlled release of proteins.
- [119] JM Anderson, MS Shive (2012) Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 72–82.
- [120] M Ramchandani, D Robinson (1998) In vitro and in vivo release of ciprofloxacin from PLGA 50 : 50 implants. 54 167–175.
- [121] S Koocheki, SS Madaeni, P Niroomandi (2011) Development of an enhanced formulation for delivering sustained release of buprenorphine hydrochloride. *Saudi Pharm. J.* 19 255–262.
- [122] P Sonia, S Mattha, U Mansha, G Arti, P Hetal, Y Jitendra (2017) Cell Line and Augument Cellular Uptake Study of Statistically Optimized Sustained Release Capecitabine Loaded Eudragit S100/PLGA(poly(lactic- co-glycolic acid)) Nanoparticles for Colon Targeting. *Curr. Drug Deliv.* 14 887–899.
- [123] M Cetin, A Atila, Y Kadioglu (2010) Formulation and In vitro Characterization of Eudragit ® L100 and Eudragit ® L100-PLGA Nanoparticles Containing

## BIBLIOGRAFÍA

- Diclofenac Sodium Formulation and In vitro Characterization of Eudragit® L100 and Eudragit® L100-PLGA Nanoparticles Containing Diclofenac Sodi. *AAPS PharmSciTech.* 11 1250–1256.
- [124] IM Helbling, JCD Ibarra, JA Luna (2016) The Use of Cellulose Membrane to Eliminate Burst Release from Intravaginal Rings. *AAPS J.* 18 960–971.
- [125] GA Islan, ME Ruiz, JF Morales, ML Sbaraglini, A V. Enrique, G Burton, A Talevi, LE Bruno-Blanch, GR Castro (2017) Hybrid inhalable microparticles for dual controlled release of levofloxacin and DNase: Physicochemical characterization and in vivo targeted delivery to the lungs. *J. Mater. Chem. B.* 5 3132–3144.
- [126] KH Turner, J Everett, U Trivedi, KP Rumbaugh, M Whiteley (2014) Requirements for *Pseudomonas aeruginosa* Acute Burn and Chronic Surgical Wound Infection. *PLoS Genet.* 10 e1004518.
- [127] A Cross, JR Allen, J Burke, G Duce, A Harris, J John, D Johnson, M Lew, B MacMillan, P Meers, R Skalova, R Wenzel, J Tenney (1983) Nosocomial Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*: Review of Recent Trends. *Clin. Infect. Dis.* 5 S837–S845.
- [128] M Parent, C Nouvel, M Koerber, A Sapin, P Maincent, A Boudier (2013) PLGA in situ implants formed by phase inversion: Critical physicochemical parameters to modulate drug release. *J. Control. Release.* 172 292–304.
- [129] L Solorio, AM Olear, JI Hamilton, RB Patel, AC Beiswenger, JE Wal-, H Zhou, AA Exner (2012) Noninvasive Characterization of the Effect of Varying PLGA Molecular Weight Blends on In Situ Forming Implant Behavior Using Ultrasound Imaging. *Theranostics.* 2 1064–1077.
- [130] F Karp, LN Turino, D Estenoz, GR Castro, GA Islan (2019) Encapsulation of florfenicol by in situ crystallization into novel alginate- Eudragit RS® blended matrix for pH modulated release. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 54 101241.
- [131] CN Patra, R Priya, S Swain, G Kumar Jena, KC Panigrahi, D Ghose (2017) Pharmaceutical significance of Eudragit®: A review. *Futur. J. Pharm. Sci.* 3 33–45.
- [132] Mathematical models of drug release, en: Strateg. to Modify Drug Release from Pharm. Syst., Elsevier, , p. 63–86.
- [133] VL Romero, P Pons, JL Bocco, RH Manzo, FL Alovero (2012) Eudragit® E100 potentiates the bactericidal action of ofloxacin against fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 334 102–110.

## BIBLIOGRAFÍA

- [134] P Pawar, P Sharma, A Chawla, R Mehta (2013) Formulation and in vitro evaluation of Eudragit® S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 4 31.
- [135] H Valizadeh, A Nokhodchi, N Qarakhani, P Zakeri-Milani, S Azarmi, D Hassanzadeh, R Löbenberg (2004) Physicochemical Characterization of Solid Dispersions of Indomethacin with PEG 6000, Myrj 52, Lactose, Sorbitol, Dextrin, and Eudragit® E100. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 30 303–317.
- [136] C Goddeeris, T Willems, K Houthoofd, JA Martens, G Van den Mooter (2008) Dissolution enhancement of the anti-HIV drug UC 781 by formulation in a ternary solid dispersion with TPGS 1000 and Eudragit E100. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 70 861–868.
- [137] A Prudic, AK Lesniak, Y Ji, G Sadowski (2015) Thermodynamic phase behaviour of indomethacin/PLGA formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 93 88–94.
- [138] R Smith (2003) *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol.* 6 56–60.